



T.C.

KIRIKKALE ÜNİVERSİTESİ

FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

**KAEMPFEROL YÜKLENMİŞ ALJİNAT/HYALURONİK ASİT
MİKROKÜRELERİN ÜRETRAL DARLIK MODELİNDE
ETKİNLİĞİNİN İN VİTRO VE İN VİVO ARAŞTIRILMASI**

BÜŞRA MORAN BOZER

BİYOLOJİ ANABİLİM DALI

DOKTORA TEZİ

DANIŞMAN

Prof. Dr. Mustafa TÜRK

KIRIKKALE-2021



T.C.

KIRIKKALE ÜNİVERSİTESİ

FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

**KAEMPFEROL YÜKLENMİŞ ALJİNAT/HYALURONİK ASİT
MİKROKÜRELERİN ÜRETRAL DARLIK MODELİNDE
ETKİNLİĞİNİN İN VİTRO VE İN VİVO ARAŞTIRILMASI**

BÜŞRA MORAN BOZER

BİYOLOJİ ANABİLİM DALI

DOKTORA TEZİ

DANIŞMAN

Prof. Dr. Mustafa TÜRK

KIRIKKALE-2021

Büşra MORAN BOZER tarafından hazırlanan “KAEMPFEROL YÜKLENMİŞ ALJİNAT/HYALURONİK ASİT MİKROKÜRELERİNİN ÜRETRAL DARLIK MODELİNDE ETKİNLİĞİNİN İN VİTRO VE İN VİVO ARAŞTIRMASI” adlı tez çalışması aşağıdaki jüri tarafından OY BİRLİĞİ ile Kırıkkale Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Biyoloji Anabilim Dalında DOKTORA TEZİ olarak kabul edilmiştir.

Danışman: Prof. Dr. Mustafa TÜRK
Biyomühendislik A.B.D,
Kırıkkale Üniversitesi

İmza.....

Bu tezin, kapsam ve kalite olarak Doktora Tezi olduğunu onaylıyorum/onaylamıyorum
Başkan : Prof. Dr. Siyami KARAHAN
Histoloji Emriyoloji A.B.D,
Kırıkkale Üniversitesi

İmza.....

Bu tezin, kapsam ve kalite olarak Doktora Tezi olduğunu onaylıyorum/onaylamıyorum
Üye : Prof. Dr. Akın YILMAZ
Tıbbi Biyoloji A.B.D,
Hitit Üniversitesi

İmza.....

Bu tezin, kapsam ve kalite olarak Doktora Tezi olduğunu onaylıyorum/onaylamıyorum .
Üye : Prof. Dr. H. Ayşegül TAYLAN ÖZKAN
Tıbbi Mikrobiyoloji A.B.D,
TOBB Ekonomi Üniversitesi

İmza.....

Bu tezin, kapsam ve kalite olarak Doktora Tezi olduğunu onaylıyorum/onaylamıyorum
Üye : Prof. Dr. İlhami TÜZÜN
Biyoloji A.B.D,
Kırıkkale Üniversitesi

İmza.....

Tez Savunma Tarihi: 17/08/2021
Jüri tarafından kabul edilen bu tezin Doktora Tezi olması için gerekli şartları yerinegetirdiğini onaylıyorum.

Prof. Dr. Recep ÇALIN
Fen Bilimleri Enstitüsü Müdürü

ÖZET

KAEMPFEROL YÜKLENMİŞ ALJİNAT/HYALURONİK ASİT MİKROKÜRELERİNİN ÜRETRAL DARLIK MODELİNDE ETKİNLİĞİNİN İN VİTRO VE İN VİVO ARAŞTIRMASI

Kırıkkale Üniversitesi

Fen Bilimleri Enstitüsü

Biyoloji Anabilim Dalı, Doktora Tezi

Danışman: Prof. Dr. Mustafa TÜRK

Ağustos 2021, 214 sayfa

Üretral darlık fibrotik skar oluşumu ile karakterize, patolojik olarak üretra epitelinde dejenerasyon gösteren ve hastalarda sık tekrar eden bir hastalıktır. Hastalığın etiyoloji ve epidemiyolojisi aydınaltılsa da etkin bir tedavi klinikte halen uygulanamamaktadır. Yapılan bu tez çalışmasında üretral darlık tedavisinde skar oluşumunu engelleme ve yeniden epitelizasyonu sağlama potansiyeli bulunan kaempferolün tek başına ve aljinat/hyaluronik asit (HA) mikrokürelerine yüklenen kaempferolün etkisi in vitro ve in vivo yöntemler ile araştırılmıştır. Bu amaç doğrultusunda kaempferol yüklenen aljinat/HA mikroküreleri sentezlenerek kontrollü salım çalışmaları yapılmıştır. Hazırlanan mikrokürelerin karakterizasyonu için SEM, TGA, FT-IR ve HPLC kullanılmıştır. İn vitro çalışmalar için primer hücre kültürü ile elde edilen üretra epitel hücreleri üzerinde ve L929 fibroblast hücrelerinde; kaempferol yüklenmiş mikroküreler (KYMK), kaempferol yüklenmemiş mikrokürelerin (MK), kaempferolün ve klinikte tedavi amacıyla sık kullanılan mitomycin-c (mit-c)'nin sitotoksik etkilerini belirlemek için MTT ve WST-1 testleri yapılmıştır. Apoptoz ve nekrozun belirlenmesi için double staining yöntemi uygulanmıştır. Hücre proliferasyonlarına etkilerinin konsantrasyona bağlı belirlemek için x-CELLigence-Gerçek Zamanlı Hücre Analiz Sistemleri kullanılmıştır. Hazırlanan materyallerin genotoksik/karsinojenik/mutajenik etkilerini belirlemek amacıyla; mikronükleus ve AMES testleri yapılmıştır. Ayrıca kaempferol ve kaempferol yüklü mikrokürelerin kanda pıhtılaşma faktörlerine (PF-4, Ne/ELA, TAT, FPA ve β -TG) etkisi ELİSA yöntemi ile hemolitik etkisi hemoliz testi ile belirlenmiştir. İn-vitro testler ile etkin dozun belirlenmesini takiben sıçanlarda üretral darlık oluşturulmuş ve hazırlanan kaempferol yüklenen ve yüklenmeyen mikroküreler, kaempferol ve mit-c deneklere uygulanmıştır. Uygulamanın ardından sakrifikasyonu yapılan deneklerin üretra

dokularında yapılan hematoksilin&eosin boyaması ile inflamasyon, bazal membran bütünlüğü ve skar durumu değerlendirilmiş, masson trikrom boyama ile kolajen seviyeleri belirlenmiştir. Yapılan immunohistokimyasal boyamalar ile fibronektin, kolajen tip 1 ve tip 4'ün protein ekspresyonları belirlenmiştir.

Sentezlenen mikrokürelerin 10. güne kadar salım yaptığı ve boyutlarının $525 \pm 15 \mu\text{m}$ olduğu tespit edilmiştir. MTT ve WST-1 sitotoksik sonuçları birbiri ile paralellik göstermiştir. Kaempferol, KYMK ve MK'nın üretra epitel hücreleri üzerinde uygulanan konsantrasyonlarda in vitro sitotoksik etki göstermediği ancak klinikte kullanılan mit-c'nin sistotoksik etki gösterdiği tespit edilmiştir. KYMK ve kaempferolün L929 hücreleri üzerinde in vitro sitotoksik etki gösterdiği belirlenmiştir fakat mit-c'nin bir etki göstermediği tespit edilmiştir. Üretra epitel hücrelerinde ve L929 fibroblast hücrelerinde KYMK, MK ve kaempferolün apoptotik indeksinin yüksek iken mit-c'nin nekrotik indeksinin yüksek olduğu tespit edildi. Kaempferol, KYMK ve MK'nın genotoksik bir etki göstermediği ancak mit-c'nin genotoksik etki gösterdiği tespit edildi. Hücre yapışma testlerinde; üretra epitel hücrelerinin KYMK'lar üzerinde tutunma oranının L929'dan daha fazla olduğu tespit edildi. HE boyamalarında üretra dokusuna uygulanan kaempferol, KYMK ve MK'nın bazal membran yapısında onarım gösterdiği ancak mit-c'nin bu tip bir etkinin olmadığı, KYMK ve kaempferolün üretra epitelizasyonunda artış gösterdiği ve darlık alanının yeniden yapılandırılarak onarıldığı tespit edildi. Masson trikrom boyama ile kolajen seviyeleri darlık kontrol grupları ile karşılaştırıldığında; KYMK ve kaempferol uygulanan gruplarda ciddi azalma gösterirken mit-c' ve MK'da hafif azalma gösterdiği tespit edildi. Kolajen tip 1 ve tip 4 seviyeleri kaempferol ve KYMK'larda hafif pozitiflik gösterirken; mit-c ve MK uygulanan gruplar ve darlık olmayan kontrol grubunda şiddetli-orta pozitiflik gösterdiği tespit edildi.

Yapılan in vitro ve in vivo testler sonucunda kaempferol ve kaempferol yüklenen aljinat/hyaluronik asit mikrokürelerinin üretral darlık tedavisinde mit-c'den daha etkin olduğu ve klinik çalışmalarda kullanılabileceğini göstermektedir. Ayrıca kaempferol yüklenen mikrokürelerin kontrollü salım göstermesi, aljinat ve hyaluronik asit içeriği sebebiyle kaempferole oranla daha etkin sonuçlar gösterdiği tespit edilmiştir.

Anahtar kelimeler: üretral darlık, kaempferol, kontrollü salım, hyaluronik asit, aljinat, sitotoksikite, genotoksikite, immunohistokimya, biyomalzeme, biyouyumluluk

ABSTRACT

IN VITRO AND IN VIVO INVESTIGATION OF THE EFFICACY OF KAEMPFEROL LOADED ALGINATE/HYALURNIC ACID MICROSPHERES IN A MODEL OF URETHRAL STRICTURE

Kırıkkale University

Graduate School of Natural and Applied Sciences

Department of Biology, Ph.D. Thesis

Supervisor: Prof. Dr. Mustafa TURK

August 2021, 214 pages

Urethral stricture is a disease characterized by fibrotic scar formation, pathologically degeneration of the urethral epithelium, and frequently recurring in patients. Although the etiology and epidemiology of the disease have been clarified, an effective treatment still cannot be applied in the clinic. In this thesis study, the effect of kaempferol, which has the potential to prevent scar formation and re-epithelialization in the treatment of urethral stricture, alone or loaded into alginate/hyaluronic acid (HA) microspheres, was investigated by in vitro and in vivo methods. For this purpose, kaempferol loaded alginate / HA microspheres were synthesized and controlled release studies were carried out. SEM, TGA, FT-IR and HPLC were used for the characterization of the prepared microspheres. For in vitro studies; on urethral epithelial cells which obtained by primary cell culture and L929 fibroblast cells; kaempferol loaded microspheres (KLMS), kaempferol unloaded microspheres (MS), kaempferol and for treatment of clinical common used mitomycin-C (mit-C) with MTT and WST-1 test to determine cytotoxic effects were performed. Double staining method was applied to determine apoptosis and necrosis. x-CELLigence-Real-Time Cell Analysis Systems were used to determine the effects on cell proliferation depending on the concentration. The materials prepared genotoxic / carcinogenic / mutagenic effects in order to determine; AMES and micronucleus tests were conducted. In addition, the effects of kaempferol and kaempferol loaded microspheres on blood coagulation factors (PF-4, Ne/ELA, TAT, FPA and β -TG) were determined by ELISA method and hemolytic effect by hemolysis test. Following the determination of the effective dose by in-vitro tests, urethral stricture was created in rats and the prepared kaempferol loaded and unloaded microspheres, kaempferol and mit-c were applied to the subjects. After the application, inflammation, basement membrane integrity and scar status were evaluated with hematoxylin&eosin staining on the urethra tissues of the subjects who were sacrificed, and collagen levels were determined by Masson trichrome staining. Protein expressions of fibronectin, collagen type 1 and type 4 were determined by immunohistochemical staining.

It was determined that the synthesized microspheres were released until the 10th day and their size was $525 \pm 15 \mu\text{m}$. MTT and WST-1 cytotoxicity showed similar results with each other. It was determined that Kaempferol, KLMS and MS didn't show cytotoxic effect in vitro at the concentrations applied to urethral epithelial cells, but mit-c, which was used clinically, showed a cytotoxic effect. It was determined that

KLMS and kaempferol showed cytotoxic effects on L929 cells in vitro, but mit-c did not show any effect. It was determined that the apoptotic index of KLMS, MS and kaempferol was high in urethral epithelial cells and L929 fibroblast cells, but the necrotic index of mit-c was higher. It was determined that kaempferol, KLMS and MS didn't show a genotoxic effect, but mit-c had a genotoxic effect. In cell adhesion tests; it was determined that the adhesion rate of urethral epithelial cells on KLMS's was higher than L929. In HE stainings, it was determined that kaempferol, KLMS and MS applied to the urethra tissue repaired the basal membrane, but mit-c didn't show such an effect, KLMS and kaempferol increased the epithelialization of the urethra and the stricture area was repaired by restructuring. When the collagen levels were compared with stricture control groups with Masson trichrome staining; It was determined that mit-c' and MS decreased slightly, while it showed a serious decrease in the groups that were KLMS and kaempferol. Collagen type I and type IV levels show mild positivity in kaempferol and KLMSs; It was determined that the mit-c and Ms applied groups and the control group without stricture showed strong-moderate positivity.

As a result of in vitro and in vivo tests, kaempferol and alginate/hyaluronic acid microspheres loaded with kaempferol are more effective than mit-c in the treatment of urethral stricture, therefore they can be used in clinical studies. In addition, it was determined that microspheres loaded with kaempferol showed more effective results than kaempferol due to the controlled release, alginate and hyaluronic acid content.

Key words: urethral stricture, kaempferol, controlled release, hyaluronic acid, alginate, cytotoxicity, genotoxicity, immunohistochemistry

TEŞEKKÜR

Doktora eğitimim boyunca bilgisiyle bana her zaman yol gösteren, akademik bilgi, birikim, tecrübesi ve desteğini hiçbir zaman esirgemeyen kıymetli tez danışmanım Sayın Prof. Dr. Mustafa TÜRK'e, deneysel çalışmalarımı yürüttüğüm KÜBTUAM imkânlarını kullanımına sunduğu ve tez çalışmamın histolojik değerlendirmelerinde bilgisine başvurduğum KÜBTUAM müdürü Sayın Prof. Dr. Siyami KARAHAN'a teşekkürlerimi sunarım. Doktora eğitimim boyunca bilgi ve tecrübeleriyle tezime katkı sağlayan tez izleme komitesi üyesi Hititi Üniversitesi Öğretim Üyesi Sayın Prof. Dr. Akın YILMAZ hocama, tez yazımı süresince motivasyonumu kaybetmememi sağlayan ve emeklerini benden esirgemeyen TOBB Ekonomi Ünivesitesi Öğretim Üyesi Sayın Prof. Dr. H. Ayşegül TAYLAN ÖZKAN hocama, tıbbi ve klinik konulardaki bilgisini benimle paylaşmaktan çekinmeyen değerli kız kardeşim Dr. Dilara MORAN'a, doktora eğitimim boyunca desteğini esirgemeyen HÜBTUAM Müdürü Sayın Prof. Dr. İrfan KURTBAŞ hocama teşekkürü borç bilirim.

Doktora sürecimde yaşadığım her türlü zorlukta ve mutlulukta maddi manevi desteklerini esirgemeyen çok sevgili dostlarım Canan ÇAKIR ÇOBAN'a, Selay YEBREM'e, Meryem GENÇ'e, Cansu Ekin Gümüş'e, Çağla KAYIŞOĞLU'na, Dr. Djursun KARASARTOVA'ya, in vivo deneylerde yardımcı olan Araş. Gör. Dr. Yaşar ŞAHİN'e, her türlü desteği için FBE öğrenci işlerinden Bahar YASEMİN SERT'e teşekkür ederim.

Hayatımın her anında saygı ve sevgiyle yanımda olan, desteklerini esirgemeyen canım MORAN aileme, eğitim hayatım boyunca maddi manevi desteğini esirgemeyen canım halam Necla MORAN'a, biricik çekirdek ailem eşim ve oğlum Ali Burhan'a teşekkür ederim.

İÇİNDEKİLER DİZİNİ

ÖZET	iv
ABSTRACT	vi
TEŞEKKÜR	viii
İÇİNDEKİLER DİZİNİ	ix
ÇİZELGELER DİZİNİ	xiii
ŞEKİLLER DİZİNİ	xiv
SİMGE VE KISALTMALAR DİZİNİ	xvii
1. GİRİŞ VE AMAÇ	1
2. GENEL BİLGİLER	3
2.1 Erkeklerde Üretra Embriyolojisi, Histolojisi, Anatomisi ve Fizyolojisi	3
2.1.1 Embriyolojisi.....	3
2.1.2 Üretranın Histolojisi.....	3
2.1.3 Üretranın Anatomik Yapısı	4
2.1.4 Fizyoloji	6
2.2 Üretra Darlığı	6
2.2.1 Epidemiyolojisi	6
2.2.2 Etiyoloji.....	8
2.2.3 Üretra Patofizyolojisi	9
2.2.4 Tanı	9
2.2.5 Tedavi.....	10
2.2.5.1 Endoskopik Tedaviler	11
2.2.5.2 Cerrahi Rekonstrüksiyonlar	13
2.2.6 Üretral Darlık Tedavilerinde Önceden Yapılan Çalışmalar.....	14
2.3 Kontrollü Salım Sistemleri.....	17
2.3.1 Kontrollü Salım sistemlerinde olması gerekli özellikler.....	19
2.3.2 Kontrollü Salım Sistemlerinin Avantaj ve Dezavantajları.....	19
2.3.3 Kontrollü Salım Sağlayan Sistemlerde Formülasyonu Etkileyen Parametreler	21
2.3.4 Kontrollü Salım Sistemlerinin Kullanım Alanları	23
2.3.5 Kontrollü Salım Sistemlerinin Sınıflandırılması.....	24
2.4 Mikroküreler.....	27
2.4.1 Mikrokürelerin Oluşturulmasında Kullanılan Polimerler	29
2.4.2 Mikrokürelerin Oluşturulmasında kullanılan Polimerlerde Aranılan Özellikler.....	30
2.4.3 Mikrokürelerin Oluşturulmasında Kullanılan Yöntemler	31
2.4.4 Püskürtürerek Kurutma ve Dondurma Yöntemleri	33
2.5 Kaempferol.....	34
2.6 Hyaluronik Asit (Hyaluronan)	37
2.7 Aljinat.....	39
2.8 Tıbbi Cihazlar ve İlaçlar için İn Vitro Biyouyumluluk Testleri.....	42
2.8.1 Sitotoksikite Testleri.....	42
2.8.2 Genotoksikite Testleri.....	44
2.8.3 AMES Test Mekanizması	44
2.9 İn Vitro Genotoksikite de Mikronükleus Testi Mekanizması	48
2.9.1 İn Vitro Kan Testleri	49
2.9.1.1 Hemolitik Etki Testi Mekanizması	49
2.9.2 Pıhtılaşma Faktörleri ile Diğer İn Vitro Kan Testleri	50

2.10 Literatür Özeti/ Literatürde Üretral Darlık ve Kaempferol ile Yapılmış Çalışmalar.....	55
3. MATERİYAL VE YÖNTEM.....	59
3.1 Kullanılan Cihazlar ve Kimyasallar	59
3.1.1 Cihazlar	59
3.1.2 Kimyasallar ve malzemeler.....	59
3.2 Deneysel Çalışmalarda Kullanılan Çözeltiler ve Solüsyonların Hazırlanışı..	60
3.2.1 Besiyeri Hazırlanması	60
3.2.2 Double Staining Çalışma Solüsyonunun Hazırlanması	61
3.2.3 MTT Çalışma Solüsyonunun Hazırlanması	61
3.2.4 Aljinat Çözeltisinin Hazırlanması	61
3.2.5 Hyaluronik Asit Çözeltisinin Hazırlanması	61
3.2.6 Hyaluronik Asit-Aljinat Çözeltisinin Hazırlanması.....	61
3.2.7 Çapraz Bağlayıcı Çözeltisinin Hazırlanması.....	62
3.2.8 H ₂ O ₂ Blokajı Solüsyonu Hazırlanışı	62
3.2.9 Antijen Retrieval Solüsyonunun Hazırlanışı.....	62
3.2.10 0.005 M Tris Tamponunun Hazırlanışı	62
3.2.11 Drabkin Solüsyonu Hazırlanışı	62
3.2.12 Vogel-Boner (VB) Medium E (50X) Hazırlanışı.....	62
3.2.13 %40'lık Glukoz Çözeltisi Hazırlanışı	62
3.2.14 Histidin Çözeltisinin Hazırlanışı	63
3.2.15 Biotin Çözeltisi Hazırlanışı	63
3.2.16 0.02 N NaOH Çözeltisi Hazırlanışı.....	63
3.2.17 Ampisilin Çözeltisinin Hazırlanışı	63
3.2.18 HCl Çözeltisi Hazırlanışı	63
3.2.19 Tetrasiklin Çözeltisi Hazırlanışı.....	63
3.2.20 Kristal Viyole Çözeltisi Hazırlanışı	63
3.2.21 Minimal Glukoz Agarlı (MGA) Besi Yeri Hazırlanışı	63
3.2.22 MGA + Histidin (H) Besi Yeri Hazırlanışı	64
3.2.23 MGA + Biotin (B) Besi Yeri Hazırlanışı	64
3.2.24 MGA + Histidin + Biotin (HB) Besi Yeri Hazırlanışı	64
3.2.25 MGA + Histidin + Biotin + Ampisilin (HBA) Besi Yeri Hazırlanışı ...	64
3.2.26 MGA + Histidin + Biotin + Ampisilin + Tetrasiklin (HBAT) Besi Yeri Hazırlanışı	65
3.2.27 Nutrient Agar Besi Yeri Hazırlanışı.....	65
3.2.28 Sıvı Besi yeri (Nutrient Broth) Hazırlanışı	65
3.2.29 Histidin-Biyotin çözeltisi (0.5 mM) Hazırlanışı	65
3.2.30 Üst Agar Hazırlanışı.....	65
3.2.31 Sodyum Fosfat, Monobazik Çözeltisi Çözeltisinin Hazırlanışı	66
3.2.32 Sodyum Fosfat, Dibazik Çözeltisinin Hazırlanışı	66
3.2.33 Sodyum Fosfat Tamponu Hazırlanışı.....	66
3.2.34 Tuz Çözeltisi (KCl + MgCl ₂) Hazırlanışı.....	66
3.2.35 0.1 M NADP Çözeltisi Hazırlanışı.....	66
3.2.36 Glukoz-6-Fosfat Çözeltisi Hazırlanışı.....	66
3.3 Hücre Kültürü Testleri (In Vitro Testler).....	66
3.3.1 Hücre İzolasyonu	66
3.3.2 Hücre Sayımı.....	67
3.3.3 Hazırlanan Mikrokürelerin Toksisitesinin Belirlenmesi	67
3.3.3.1 MTT Testi	67
3.3.3.2 WST-1 Testi.....	68

3.3.4	İkili Boyama Metodu İle Apoptoz ve Nekrozun Belirlenmesi	69
3.3.5	Gerçek Zamanlı Hücre Analiz Sistemi (xCELLigence RTCA) ile Hücre Proliferasyonunun Belirlenmesi.....	70
3.3.6	Mikronükleus testi (OECD 487) ile genotoksisitenin belirlenmesi	72
3.4	Hazırlanan Mikrokürelere L929 ve Üretra hücrelerinin Yapışma Testi	73
3.5	Diğer İn Vitro Biyouyumluluk Testleri.....	74
3.5.1	AMES Mutajenite Testi ile Mutojenik Etkinin Belirlenmesi	74
3.5.1.1	Ames Testi Yapılışı.....	74
3.6	Hemolitik Etki Testi	77
3.6.1	Hesaplama Yöntemi	78
3.7	Pıhtılaşma Faktörlerine Etkinin Belirlenmesi	78
3.7.1	PF 4'e Kaempferol Yüklenen ve Yüklenmeyen Mikrokürelere Etkisi..	78
3.7.2	BTG'ye Kaempferol Yüklenen ve Yüklenmeyen Mikrokürelere Etkisi	79
3.7.3	FPA'ya Kaempferol Yüklenen ve Yüklenmeyen Mikrokürelere Etkisi	80
3.7.4	TAT'a Kaempferol Yüklenen ve Yüklenmeyen Mikrokürelere Etkisi .	80
3.7.5	Ne-Ela'ya Kaempferol Yüklenen ve Yüklenmeyen Mikrokürelere Etkisi	81
3.8	Kaempferolün GAG Oluşumunun Üretra Epitel ve L929 Fibroblast Hücrelerinde Toluidine Blue ile Belirlenmesi	81
3.9	Deney Hayvanları (İn Vivo) Testler.....	82
3.9.1	Dokuların Tespit ve Takibi	83
3.9.2	Hematoksilen Eosin Testi	85
3.9.3	İmmünohistokimya Testi	86
3.9.4	Masson Trikrom Boyama.....	87
3.9.4.1	Masson Trikrom Boyama Prosedürü	88
3.10	Hazırlanan Mikrokürelere Karakterizasyon Testleri	88
3.10.1	Taramalı Elektron Mikroskopu (SEM) Analizi	88
3.10.2	Diferansiyel termal analiz (DTA) ölçümleri	89
3.10.3	Diferansiyel taramalı kalorimetre (DSC)	89
3.10.4	Hazırlanan Mikrokürelere kullanılan Mit-c ve Kaempferolün HPLC Analizleri.....	89
4.	BULGULAR	91
4.1	Mikrokürenin Sentezlenmesi ve İlaç Salım Testleri	91
4.2	İlaç Salım Süresinin Hesaplanması	92
4.3	Hazırlanan Mikrokürelere SEM Karakterizasyonu	94
4.4	Hazırlanan Mikrokürelere FT-IR Karakterizasyonu.....	95
4.5	Hazırlanan Mikrokürelere TGA Analizleri.....	96
4.6	Hazırlanan Mikrokürelere kullanılan Mit-c ve Kaempferolün HPLC Analizleri	98
4.7	Hazırlanan Mikrokürelere L929 ve Üretra hücrelerinin Yapışma Testi	99
4.8	Primer Dokudan Üretra Epitel Hücrelerinin İzolasyonu.....	100
4.9	İlaç Yüklenmiş ve Yüklenmemiş Mikrokürelere, Kaempferol ve Mit-c Uygulanan Üretra Epitel Hücrelerinin Toksisitesinin MTT ile Belirlenmesi	103
4.10	İlaç Yüklenmiş ve Yüklenmemiş Mikrokürelere, Kaempferol ve Mit-c Uygulanan L929 Fibroblast Hücrelerinin Toksisitesinin MTT ile Belirlenmesi	106
4.11	İlaç Yüklenmiş ve Yüklenmemiş Mikrokürelere, Kaempferol ve Mit-c Uygulanan Üretra Hücrelerinin Toksisitesinin WST-1 ile Belirlenmesi	110

4.12 İlaç Yüklenmiş ve Yüklenmemiş Mikrokürelerin, Kaempferol ve Mit-c Uygulanan L929 Fibroblast Hücrelerinin Toksisitesinin WST-1 ile Belirlenmesi	114
4.13 Toluidine Blue Boyama	117
4.14 İkili Boyama Metodu İle Apoptotik ve Nekrotik İndeks Sonuçları	118
4.15 Gerçek Zamanlı Hücre Analiz Sistemi (xCELLigence RTCA) ile Hücre Proliferasyonu Sonuçları	139
4.16 İn Vitro Genotoksisite (Mikronükleus Testi) Sonuçları.....	143
4.16.1 L929 Hücrelerinde Kaempferol, Mit-c, İlaç Yüklenmiş ve İlaç Yüklenmemiş Mikrokürelerin Genotoksisite Sonuçları.....	143
4.16.2 Üretra Epitel Hücrelerinde Kaempferol, Mit-c, İlaç Yüklenmiş ve İlaç Yüklenmemiş Mikrokürelerin Genotoksisite Sonuçları.....	144
4.16.3 CHO Hücrelerinde Kaempferol, Mit-c, İlaç Yüklenmiş ve İlaç Yüklenmemiş Mikrokürelerin Genotoksisite Sonuçları.....	145
4.16.4 AMES Testi ile Kaempferol, Mit-c, İlaç Yüklenmiş ve İlaç Yüklenmemiş Mikrokürelerin Sonuçları	149
4.17 Hazırlanan Mikrokürelerin Hemolitik Etkilerinin Belirlenmesi	150
4.18 Kanda Pıhtılaşma Faktörleri Testi.....	152
4.18.1 BTG ELİSA Testi Sonuçları.....	153
4.18.2 FPA ELİSA Testi Sonuçları.....	154
4.18.3 Ne-Ela ELİSA Testi Sonuçları.....	155
4.18.4 Ne-Ela ELİSA Testi Sonuçları.....	156
4.18.5 TAT ELİSA Testi Sonuçları	157
4.19 Deney Hayvanları Uygulamaları.....	158
4.20 Hematoksilen Eosin Boyama sonuçları.....	162
4.21 Masson Trikrom Boyama Sonuçları	163
4.22 İmmünohistokimya Boyama Sonuçları.....	165
5. TARTIŞMA VE SONUÇ	169
KAYNAKLAR	185
ÖZGEÇMİŞ	213

ÇİZELGELER DİZİNİ

ÇİZELGE

Sayfa

2.1. Üretra darlık etiyojisi	8
2.2. Kontrollü salım sistemlerinin formülasyonunu etkileyen parametreler.....	21
2.3. Kontrollü salım sistemlerinin sınıflandırılması.....	25
2.5. Mikrokürelerin oluşturulmasında kullanılan polimerler	30
2.6. AMES testinde kullanılan suşlar ve genetik özellikleri	46
4.1 Günlere göre okunan absorbands değerleri.....	93
4.2. Hazırlanan kimyasalların ve mikrokürelerin üretra epitel hücreleri üzerindeki MTT sitotoksikite testi sonucundaki sitotoksik etkileri ve % canlılık değerleri.....	104
4.3. Hazırlanan kimyasalların ve mikrokürelerin L929 fibroblast hücreleri üzerindeki MTT sitotoksikite testi sonucundaki sitotoksik etkileri ve % canlılık değerleri.....	107
4.4. Hazırlanan kimyasalların ve mikrokürelerin üretra epitel hücreleri üzerindeki WST-1 Testi sonucundaki sitotoksik etkileri ve % canlılık değerleri.....	111
4.5. Hazırlanan kimyasalların ve mikrokürelerin L929 Fibroblast hücreleri üzerindeki WST-1 Testi sonucundaki sitotoksik etkileri ve % canlılık değerleri	115
4.6. Mitomisin-c uygulanmış üretra hücrelerine ait apoptotik indeks sonuçları (Mit-c: mitomisin-c)	120
4.7. Kaempferol uygulanmış üretra hücrelerine ait apoptotik indeks sonuçları	122
4.8. Kaempferol yüklenmiş kürelerin uygulandığı üretra hücrelerine ait apoptotik indeks sonuçları	125
4.9. Kaempferol yüklenmemiş kürelerin uygulandığı üretra hücrelerine ait apoptotik indeks sonuçları	127
4.10. Mitomisin-c uygulanmış L929 hücrelerine ait apoptotik indeks sonuçları.....	129
4.11. Kaempferol uygulanmış L929 hücrelerine ait apoptotik indeks sonuçları	132
4.12. Kaempferol yüklenmiş kürelerin uygulandığı L929 hücrelerine ait apoptotik indeks sonuçları	134
4.13. Kaempferol yüklenmemiş kürelerin uygulandığı L929 hücrelerine ait apoptotik indeks sonuçları	137
4.14. Genotoksikite testi yapılan CHO, üretra epitel ve L929 fibroblast hücrelerinin CBPI ve %mikronükleus değerleri.....	148
4.15. Okunan absorbands değerleri (MK: Kaempferol içermeyen mikroküre, KYMK: Kaempferol yüklenmiş mikroküre)	151
4.16. Uygulama sonrası MK, KYMK'nın % hemoliz değerleri	152
4.17. Uygulama sonrası BTG miktarları.....	153
4.18. Uygulama sonrası FPA miktarları.....	154
4.19. Uygulama sonrası Ne/Ela miktarları.....	155
4.20. Uygulama sonrası PF-4 miktarları	156
4.21. Uygulama sonrası TAT miktarları	157
4.22. İmmunohistokimya değerlendirme sonuçları.....	166

ŞEKİLLER DİZİNİ

ŞEKİL

Sayfa

2.1. Üretranın histolojik yapısı.....	4
2.2. Üretranın anatomik yapısı.....	5
2.3. Üretral travmaya bağlı mukozal hasar sonrası meydana gelen değişiklikler, tam kat spongiyofibrozis ve darlık gelişimi aşamaları.....	8
2.4. Sürekli, geleneksel ve kontrollü salım sistemleri için etken maddenin plazma konsantrasyonundaki değişikliklerin terapötik alan üzerine etkisi	18
2.5. Polimerik matristen üç tip kontrollü ilaç salımı örneği.....	25
2.6. Depo membran sistemi örnekleme	27
2.7. Kaempferolün yapısı	34
2.8 Hemostatik Sistem	51
2.9 Primer Hemostaz	52
4.1 Mikrokürelerin hazırlanma aşaması.....	92
4.2 Günlere göre okunan absorbans değerleri.....	93
4.3. Hyalurnik asit (HA) mikroküresinin SEM görüntüleme resimleri	94
4.4. Kaempferol yüklenen mikrokürenin SEM görüntüleme resimleri.....	95
4.5. Kaempferol yüklenen ve yüklenmeyen mikrokürelerin FT-IR spektrum okumasında pik değerleri	96
4.6. Kaempferol, boş mikroküre ve kaempferol yüklenen mikrokürelerin TGA grafikleri.....	97
4.8. Kaempferole ait HPLC kromatogramı	98
4.9. L929 fibroblast hücrelerinin kaempferol yüklenmemiş ve kaempferol yüklenen mikrokürelere ait hücre yapışma resimleri.....	99
4.10. Üretra epitel hücrelerinin kaempferol yüklenmemiş ve kaempferol yüklenen mikrokürelere ait hücre yapışma resimleri.....	100
4.11. Erkek sıçandan üretranın çıkarılması	101
4.12. Primer kültür ile elde edilen üretra epitel hücreleri	102
4.13. Uygulanan kaempferol ve Mit-c'nin üretra epitel hücrelerinde MTT Testi sonucundaki canlılık düzeyleri (Mit-c: Mitomycin-c).....	105
4.14. Hazırlanan mikrokürelerin üretra epitel hücrelerinde WST-1 Testi sonucundaki canlılık düzeyleri.....	105
4.15. Uygulanan kaempferol ve Mit-c'nin üretra epitel hücrelerinde MTT Testi sonucundaki canlılık düzeyleri (Mit-c: Mitomycin-c).....	108
4.16. Uygulanan kaempferol ve Mit-c'nin L929 hücrelerinde MTT Testi sonucundaki canlılık düzeyleri (K: Doğrudan uygulanan kaempferol, Mit-c: Mitomycin-c)	108
4.17. Uygulanan kaempferol ve Mit-c'nin üretra epitel hücrelerinde WST-1 Testi sonucundaki canlılık düzeyleri (Mit-c: Mitomycin-c).....	113
4.18. Hazırlanan mikrokürelerin üretra epitel hücrelerinde WST-1 Testi sonucundaki canlılık düzeyleri (KYMK: Kaempferol Yüklenmiş Mikroküre, MK: ilaç yüklenmemiş mikroküre).....	113
4.19. Uygulanan kaempferol ve Mit-c'nin L929 hücrelerinde WST-1 Testi sonucundaki canlılık düzeyleri (Mit-c: Mitomycin-c).....	116
4.20. Hazırlanan mikrokürelerin L929 hücrelerinde WST-1 Testi sonucundaki canlılık düzeyleri (KYMK: Kaempferol Yüklenmiş Mikroküre, MK: ilaç yüklenmemiş mikroküre)	116

4.21 Toluiden blue boyama ile GAG'ların gösterilmesi.....	118
4.22. Mitomisin-c uygulanmış üretra hücrelerine ait DAPI ve FITC filtrelerindeki görüntüleri.....	121
4.23. Kaempferol uygulanmış üretra hücrelerine ait DAPI ve FITC filtrelerindeki görüntüleri.....	124
4.24. Kaempferol yüklenen mikrokürelerin DAPI ve FITC filtresindeki görüntüleri.....	126
4.25. Kaempferol yüklenmeyen mikrokürelerin uygulandığı üretra epitel hücrelerinin apoptoz-nekroz görüntüsü	129
4.26. L929 Hücre hattında Mit-c uygulanmış hücrelerin apoptoz-nekroz boyama görüntüleri.....	131
4.27. L929 Hücre hattında kaempferol uygulanan hücrelerin apoptoz-nekroz boyama görüntüleri	133
4.28. L929 hücre hattında Kaempferol yüklenmiş mikrokürelerin (KYMK) apoptoz-nekroz boyama görüntüleri	136
4.29. L929 hücre hattında Kaempferol yüklenmemiş boş kürelerin apoptoz-nekroz görüntüleri	138
4.30. Kaempferolün konsantrasyonlarının L929 Fibroblast hücre proliferasyon grafığı	139
4.31. Mit-c konsantrasyonlarının L929 fibroblast hücre proliferasyon grafığı.....	140
4.32. KYMK, MK, Mit-c ve kontrol grubunun L929 hücre proliferasyon grafığı (KYMK: Kaempferol Yüklenmiş Mikroküre, MK: ilaç yüklenmemiş mikroküre, Mit-c: Mitomycin-c).....	140
4.33. KYMK, kaempferol ve kontrol grubunun L929 hücre proliferasyon grafığı (KYMK: Kaempferol Yüklenmiş Mikroküre, K: kaempferol).....	141
4.34 Kaempferol yüklenmemiş mikrokürelerin L929 hücrelerinde proliferasyon grafığı.....	141
4.35 Kaempferolün üretra epitel hücrelerinde hücre proliferasyon grafığı.....	142
4.36. Üretra epitel hücrelerinde mit-c, kaempferol, kaempferol yüklenen ve yüklenmeyen mikrokürelerin hücre proliferasyon grafığı	142
4.37. Fibroblast hücrelerine uygulanan kaempferol ve mit-c'nin PI ile boyanmasının genotoksisite fotoğrafları.....	144
4.38. Üretra epitel hücrelerine uygulanan kaempferol ve mit-c'nin PI ile boyanmasının genotoksisite fotoğrafları.....	145
4.39. CHO hücrelerine uygulanan kaempferol ve mit-c'nin PI ile boyanmasının genotoksisite fotoğrafları	146
4.40. Uygulama yapılmamış kontrol gruplarına ait hücrelerin PI ile boyanmasının genotoksisite fotoğrafları.....	147
4.41. Kaempferolün Ames testi ile geri dönen koloni sayıları.....	149
4.42. Kaempferol yüklü mikrokürelerin(KYMK) farklı konsantrasyonlardaki Ames testinde geri dönen koloni sayıları.....	149
4.43. Boş mikrokürelerin Ames testinde geri dönen koloni sayıları.....	150
4.44. Mit-c uygulaması sonucunda Ames testinde geri dönen koloni sayıları.....	150
4.45. Kalibrasyon katsayısının belirlenmesi grafığı.....	150
4.46. BTG için referans standartın konsantrasyona bağlı absorbans grafığı	153
4.47. FPA için referans standartın konsantrasyona bağlı absorbans grafığı	154
4.48. NE-Ela için referans standartın konsantrasyona bağlı absorbans grafığı.....	155
4.49. PF-4 için referans standartın konsantrasyona bağlı absorbans grafığı.....	156
4.50. TAT için referans standartın konsantrasyona bağlı absorbans grafığı.....	157
4.51. Kullanılan ameliyathane.....	158

4.52. Katater etrafına uygulanmış numunelerin SEM görüntüsü.....	159
4.53. Sıçanların ameliyat masasına yatırılması ve penisin çıkarılması.....	160
4.54. Katatere kaplanmış malzemelerin sıçanlara uygulanması	161
4.55. Üretra dokularında yapılan HE boyaması görüntüleri	163
4.56. Masson Trikrom(MT) boyaması yapılan üretra dokuları.....	164
4.57. İmmunohistokimya yöntemi ile boyanan Col-1, Col-IV ve Fibronektinin görüntüleri.....	167



SİMGE VE KISALTMALAR DİZİNİ

ANOVA:	Varyans Analizi
CO₂:	Karbondioksit
COL-I:	Kollajen Tip I
DMEM:	Dulbecco's Modified Eagle Medium
DMSO	Dimetil sülfoksit
ECM:	Extracellular matrix
EDTA:	Etilendiamin Tetra Asetik Asit
ELİSA:	Enzim bağlantılı immün analiz
FBS:	Fetal bovine serum
FITC:	Yeşil floresan
GAG:	Glikozaminoglikan
HA:	Hyalüronik asit
HE	Hematoksilen Eosin
IC₅₀:	İnhibisyon Konsantrasyonu
IHC:	İmmünohistokimya
KYMK:	Kaempferol Yüklene Mikroküre
L929:	Fibroblast Mouse C3 / An connective tissue (Fare)
MK:	Mikroküre
MN:	Mikronükleus
MT:	Masson Trikrom
MTT:	3-(4,5-Dimethyl-2-thiazolyl)-2,5-diphenyl-2 Htetrazolium.bromid
PBS:	Phosphate buffered saline
PI:	Propidium İyodit
RTCA:	Gerçek zamanlı hücre analiz sistemi
TGF-β:	Transforming growth factor- β
WST-1:	(2-(4-Iodophenyl)-3-(4-nitrophenyl)-5-(2,4-disulfophenyl)- 2H-tetrazolium, Na-salt)

1. GİRİŞ VE AMAÇ

Üretral darlık üroloji kliniğinde en sık rastlanılan ve tam tedavisi henüz yapılamayan bir hastalıktır. Üretra kanalının gelişimi erkekte ve kadında embriyolojide farklılık göstererek başlayan ve şekillenen bir süreçtir. Üretral darlık en sık erkek hastalarda gözükmemekte ve hayat konforunu etkilememektedir. Üretra kanalı; idrarın atılmasını ve seksüel sıvıların çıkışının olduğu erkek bireylerde epidemiyolojik ya da etiyolojik sebeplerle darlık gelişmesi durumunda daralmakta ve sıvı çıkışının kesikli olmasına, enfeksiyonlara ve ağrıya sebep olmaktadır.

Klinikte tercih edilen cerrahi operasyonlar ya da ilaç tedavileri geçici çözüm sağlasa da hastanın kliniğe sık ziyaretini gerektirmektedir. Bu sebeple üretral darlığın bertaraf edilmesi, tekrar etmemesi ve kolay uygulanabilir bir yöntem ile tedavi edilmesi ihtiyacı ortaya çıkmaktadır. Kullanılacak olan tedavi yönteminin kolay uygulanabilir olması, hastaya ağrı, acı hissi bırakmaması, hasta ile uyumlu olacak malzemelerin kullanılması, kalıcı çözüm sunması ve kullanılacak olan etken maddenin hastada; genotoksik ve sitotoksik etkisinin olmaması kan etkileşiminde hemolitik ya da pıhtılaşma faktörlerini etkilememesi gerekmektedir. Klinikte kullanılan ilaç ve etken maddeler incelendiğinde hastada genotoksik hasarı olabilecek, sitotoksik etkisinin diğer hücre ve dokular açısından yüksek olduğu gözlemlenmiştir.

Yapılan bu çalışma ile birlikte klinikte daha önce kullanılmamış ve skar/fibrozisli alanlarda inhibe edici etkisi bilenen kaempferol doğrudan ve kontrollü ilaç salımı yapan mikroküreler ile uygulanacaktır. Kontrollü ilaç salımı son yıllarda ilaçların kanda terapötik alanda kalmasını sağladığı ve tek seferde uygulanabilme kolaylığı sağlaması nedenleri ile sık tercih edilmektedir. Ayrıca hazırlanacak mikrokürelerin içeriğinde bulunan aljinat ve hyalurnik asitin biyouyumlu ve biyoparçalanabilir malzemeler olması sebebiyle de kullanım kolaylığı sağlayacağı düşünülmektedir.

Hastalığı tedavi edebilmek adına atılacak adımlarda hastalığın epidemiyoloji, etiyoloji ve histolojisinin iyi bilinmesi gerekmektedir. Tüm bu sebepler göz önünde bulundurulduğunda yapılan bu tez çalışmasında kontrollü salım yapan kaempferol

yüklenen mikroküreler sentezlenecek ve salım miktarına göre uygulama gün sayısı belirlenecektir. Hazırlanan mikrokülerin SEM, FT-IR, HPLC ve TGA cihazları ile karakterizasyonu ve boyutları belirlenecektir. Hazırlanan mikrokürelerin ve kaempferolün sitotoksik, genotoksik, hemolitik ve pıhtılaşma faktörlerine etkileri incelenecektir. İn vitro testlerin ardından deney hayvanları (erkek sıçanlar) üzerinde tramvatik olarak adlandırılan, dışarıdan müdahale ile üretral darlık oluşturulacaktır. Oluşturulan üretral darlığın yer edinmesinin ardından hazırlanan kaempferol yüklü mikroküreler ve kaempferol uygulanacak ve salım süresine göre belirlenen tedavi süresinin sonunda denekler kurbanıye edilecek ve darlık durumunun kontrolü hematoksilen eosin, masson trikrom ve immunohistokimyasal boyamalar ile tespit edilecektir. Üretral darlık oluşan alanda artan kollajen tip I, kollajen tip IV ve fibronektin seviyeleri semikantitatif bir yöntem olan immunohistokimya yöntemi ile fenotipik olarak incelenecektir.

Üretra kanalında darlık durumunda meydana gelen bazal membrandaki bozunma, epitel tabakasında meydana gelen atipi, fibrokistik alanın artması durumları göz önünde bulundurularak değerlendirmeler yapılacaktır. Yapılacak tüm bu çalışmalar ile hazırlanan mikrokürelerin uygulama sırasında dayanıklı olması, kontrollü salım göstermesi, biyouyumlu olması ve kanda gerek hemolitik gerekse pıhtılaşma faktör değerlerinde artışa sebep olamaması, üretra epitelinin normal histolojik yapısına dönmesi ve fibroblast açısından zengin darlık alanın ortadan kalkması amaçlanmaktadır.

Aşağıdaki bölümlerde sağlıklı erkek üretrasının epidemiyolojik, anatomik ve histolojik yapıları, üretral darlık ve tedavi yöntemleri detaylı olarak açıklanmıştır. Ayrıca kullanılacak olan kaempferol, aljinat ve hyalurnik asit hakkında detaylı bilgiler ile yapılacak testlerin amaçları ve gereklilikleri de detaylı olarak irdelenmiştir.

2. GENEL BİLGİLER

2.1 Erkekde Üretra Embriyolojisi, Histolojisi, Anatomisi ve Fizyolojisi

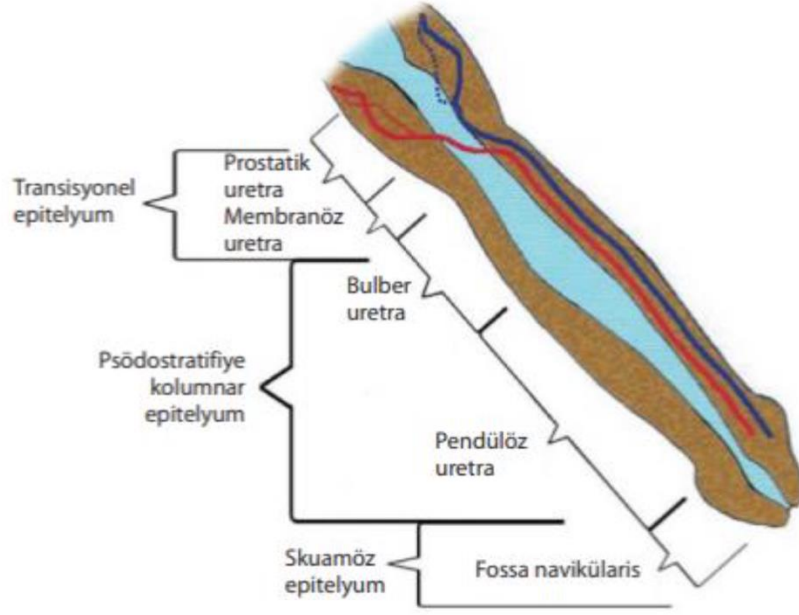
2.1.1 Embriyolojisi

Genital organların anatomik yapısı erkek ve dişi bireylerde farklı olduğundan, embriyolojik gelişim sırasında da önemli farklılıklar gözlenmektedir. Dış genital bölgenin erkek yönünde farklılaşması hipofiz bezinden salgılanan lüteinleştirici hormona cevap olarak üretilen testesteronun etkisi ile olmaktadır. Farklılaşmanın ilk adımı genital yapılar ile anüs arasındaki mesafenin artmaya başlamasıdır. Daha sonra penisin uzaması penil üretral yarıktan penil üretranın oluşumu ve prepisyumun (sünnet derisi) gelişimi ile devam etmektedir. Gebeliğin 8. haftasında dış genital farklılaşma başlamamıştır, penisin alt kısmında üretral oyuk iki üretral kabartının arasında bulunur. 12. haftada koronal sulkus (yatay oluk) shaft belirip penil shaftı glans penisten ayırır. Üretral katlantılar penil shaftın ventralinde orta hatta tamamen birleşirler. Gebeliğin 16. Haftasında glanüler üretra belirir. Sünnet derisi üçüncü ayın sonuna doğru glansın tabanından, koronadan dışa doğru kabarık bir çizgi olarak oluşur ve glansı dairesel saracak şekilde glans epiteliyle birleşerek büyür (1-2).

2.1.2 Üretranın Histolojisi

Üretra hem idrar hem de erkeklerde semeni eksternal üretral açıklıktan dış ortama taşıyan fibromuskuler yapıdan oluşan bir tüptür. Üretranın uzunluğu, yapısı ve işlevi erkek ve kadınlarda farklıdır. Genel olarak; prostatik üretra mesane boyunundan yaklaşık 3-4cm kadar uzanarak prostat bezinin içinden geçmektedir, transyonel epitelle döşelidir (alt üriner sistemin lümenini döşeyen epiteldir). Genital sisteme ait ejakülator kanalları bu bölümün posterior duvarına ve birçok prostat kanalları da bu bölüme açılmaktadır.

Memranöz üretrada transizyonel epitel sona ermektedir. Bu bölüm ya çok katlı ya da psödostratifiye silindirik epiteli ile döşelidir. Penil üretra ise distal kısmı hariç psödostratifiye silindirik epiteli (yalancı çok katlı epitel) ile döşelidir. Distal kısımda bu epitel yerini yassı epitele bırakır ve bu epitel de penis derisi ile devam etmektedir (şekil 2.1)



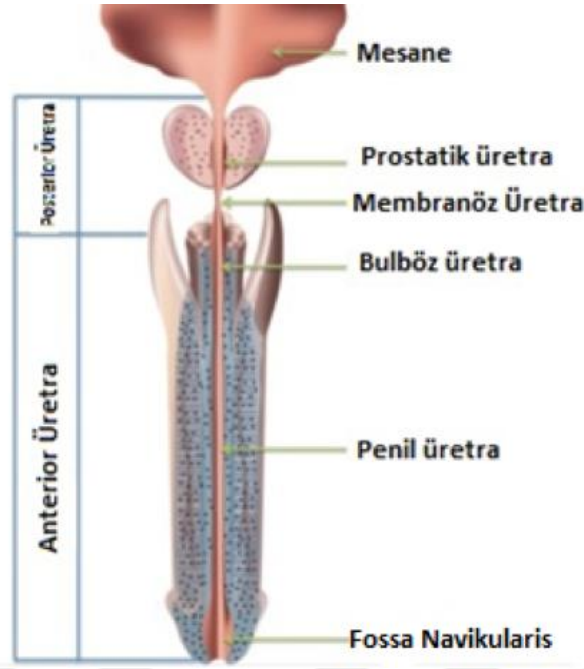
Şekil 2.1. Üretranın histolojik yapısı (3)

2.1.3 Üretranın Anatomik Yapısı

Erkek üretrası yaklaşık olarak 18 cm uzunluğundadır. Posterior (arka kısımda bulunan) üretra ve anterior üretra olarak iki kısma ayrılır. Posterior üretra ortalama 3 cm'lik kısmı oluştururken, anterior (ön kısımda bulunan) üretra ortalama 15 cm'lik kısmı oluşturur (Şekil 2.2.). Üretranın çapı her yerde aynı değildir, üç geniş dört dar kısmı bulunmaktadır.

Üretranın bölümleri;

- Posterior Üretra
 - Prostatik Üretra
 - Membranöz Üretra
- Anterior Üretra
 - Bulböz Üretra
 - Pandülöz üretra
 - Fossa Nasikularis



Şekil 2.2. Üretranın anatomik yapısı

Ön üretranın fossa navikularis, pendülöz (penil) üretra ve bulböz üretra olarak üç bölümü, arka üretranın ise membranöz üretra ve prostatik üretra olarak iki bölümü vardır.

Fossa navikularis: Glans penis içinde spongioz dokuyla tamamen sarılmış ve penil üretranın ikinci geniş kısmıdır. Distal ucu eksternal meatus olarak adlandırılır ve yaklaşık olarak 6 mm genişliği ile üretranın en dar yeridir.

Pendülöz(penil) üretra: Glans penis ile suspansör ligament arasında korpus spongiosum içinde yer alır. Penisin serbest hareket edebilen bölümü içindedir, üretranın en uzun segmentidir, yaklaşık 15 cm uzunluktadır. Üretra epitelinin en öndeki bölümü hariç, çok sayıda küçük müköz ve submüköz dokudaki foleküllerin ağzları bulunur ayrıca farklı boyutlarda çok sayıda lakün adı verilen çıkmazlar vardır. Olası bir katater yerleştirilmesi durumunda kateterin ucu bu çıkmazlara takılabilir ve skar oluşumu söz konusu olabilir.

Bulböz üretra: Bu bölüm; ön üretranın suspansör ligament ile membranöz üretra arası en yakın segmenti olmakla birlikte üretranın en geniş bölümüdür ve iğ şeklinde genişleme yapmaktadır. Yapı kalın bir spongioz doku ile sarıdır ve spongioz doku bulbospongioz kasla çevrilmiştir.

Arka üretra; membranöz üretra: Üretranın en kısa ve genişleme yeteneği en az olan

kısımdır. Bulböz üretraya en yakınında istemli dış sfinkter kaslarını bulunduran kas yapılı membranöz üretra bulunur. Bu sfinkter kadınlarda 1-2 mm, erkeklerde 6 mm kalınlığındadır. Membranöz üretranın her iki yanından kavernöz sinirler geçer. Ayrıca yapısındaki kasların fizyolojik yapısı yavaş kasılan kas liflerini içerir, kasılma uzun süre kalabilir. Üretrayı kapatmaya ve üriner kontinansı sağlamaya aktif olarak katkıda bulunur.

Prostatik Üretra: Membranöz üretradan mesane boynuna kadar ortalama 3-4 cm uzunluğundaki bölümdür. Puboprostatik ligamentler ile pubise sabitlenmiştir. Prostatik üretra, üretranın en geniş ve gerektiğinde en fazla genişleyebilen bölümüdür.

Prostatik ve membranöz üretra mesane epiteli ile devam eder ve transisyonel (değişim gösteren) epitel ile kaplıdır. Üretral submukoza damar açısından çok zengindir, pendülöz üretrada çok sayıda submukoz bezler yer alır ve bu bezler kadınlarda Skene erkeklerde ise Littre olarak adlandırılır.

2.1.4 Fizyoloji

Üretra, idrarın mesaneden sonra geçtiği ve vücut içinde bulunduğu son kısım olarak işeme fizyolojisinde temel rolü almaktadır. Bireyin işemesi sırasında, idrarın basınçlı şekilde dışarı atılması için mesane kasılmaları ile koordine şekilde üretral düz kasta gevşeme meydana gelmektedir. İşemeyi takiben, üretral düz kas kasılarak kas tonusunu yeniden kazanır ve mesane gevşeyerek istirahat durumuna döner. Üretral düz kas hücreleri mekanik kuvveti ve elektrik sinyalizasyonunu organize ederek, üniter biçimde koordine bir şekilde birbirlerine mekanik olarak bağlantılıdır ve iyon kanalları sinyal iletiminde rol alır.

İşeme fizyolojisi dışında üretranın erkekte seksüel fizyolojide de rolü vardır. Ejekülasyonda pelvik taban kasları ve bulbokavernöz kasların ritmik kontraksiyonuyla birlikte üretral sfinkter gevşer böylece ejakülat üretradan dışarı atılmaktadır.

2.2 Üretra Darlığı

2.2.1 Epidemiyolojisi

Üretra darlığı (ÜD), etyolojiden bağımsız olarak üretra yaralanması sonucu skar dokusu oluşumu ve üretral lümenin daralmasıyla ortaya çıkan bir patolojidir. Bu yaralanma, herhangi bir travma sonucu ya da üretral bir enflamasyon sonucu ortaya

çıkabileceği gibi cerrahi işlemler sonrasında da oluşabilir. WHO konsensusu üretrayı anatomik olarak tanımlandığı gibi 5 parçaya değil, 2 parçaya (ön ve arka üretra) ayırmıştır. Ön üretrada gelişen herhangi bir patoloji korpus spongiosum subepitelyal dokusunda skar oluşturur. Gelişen skar dokusunun kasılmasıyla organ duvarları birbirine yaklaşır ve üretra lümeni daralır. Bu darlığa; üretral striktür denir. Bunun tersine posterior arka üretrada olan üretral darlık (prostatik ve membranöz üretra), striktür olarak isimlendirilmez. Posterior üretral darlıklar, posterior üretrada oluşan tıkanmaya bağlı bir süreçtir ve fibroze neden olur. Sıklıkla o alanda oluşabilen travmaya bağlı distraksiyon etkisi veya radikal prostatektomi sonucu oluşur. Edinilmiş üretral darlık erkeklerde sık olmasına rağmen kadınlarda nadirdir. Proksimal olgu darlıklarında, başlangıç tedavisi dilatasyon ve internal üretrotomi olmakla birlikte hastaların çoğunda açık üretroplasti gerekmektedir. Açık cerrahi sonrasında bile geç darlıklar görmek olasıdır (5-7).

Üretra darlığı tedavi edilmediği durumlarda akut üriner retansiyon, hidronefroz ve buna bağlı olarak ilerleyen dönemlerde böbrek yetmezliği gibi ciddi komplikasyonlara neden olmakla birlikte prostatit, epididimoorşit (epididim ve testis iltihabının aynı anda olması), periüretral apse, enfeksiyon, mesane taşı, fistül gibi diğer komplikasyonlara da sebep olabilmektedir. Yapılan çalışmalar özellikle 55 yaş ve üzeri erkek bireylerde bu hastalığın sıklığı belirgin olarak artmakta olduğu gösterilmektedir (8,9).

Üretra darlığı patogenezi incelendiğinde üretrada meydana gelebilecek bir hasar sonrası üretranın normal mukoza epiteli skuamöz metaplazi ile yer değiştirmekte ve epitelde bulunan küçük çatlaklardan içeri doğru sızan idrar, zaman içerisinde korpus spongiosum (penis içerisinde üretrayı çevreleyen süngerimsi doku) da invaze ederek fibrotik reaksiyonlara neden olmaktadır. Bu tekrarlayan açılmalar ve reaksiyonlar zamanla altta oluşan spongiyofibrozu arttırarak darlık gelişimine neden olur (Şekil 12). Fibrozis tabakası kalınlaşır ve zaman içinde darlık tıkanma ile devam eder, idrar yapmada problemin artması ile fibrozis tabakasının kalınlaşması doğru orantılı olarak ilerlemektedir (Şekil 2.3).



Şekil 2.3. Üretral travmaya bağlı mukozal hasar sonrası meydana gelen değişiklikler, tam kat spongiyofibrozis ve darlık gelişimi aşamaları

2.2.2 Etiyoloji

Üretral darlıkların etiyolojisi idiyopatik, iatrojenik, travmatik ve inflamatuvar olarak 4 ana başlık altında toplanmaktadır. İdiyopatik ve iatrojenik sebepler bulber üretral darlıklarında, iyatrojenik ve inflamatuvar sebepler ise penil üretral darlıklarında en sık saptanan sebeplerdir (10,11). Üretral darlıkların etiyolojisinin yüzdesel dağılımları Tablo 2’de belirtilmiştir (12).

Çizelge 2.1. Üretra darlık etiyolojisi

Penil Üretra Darlıkları	Yüzde	Bulber Üretra Darlıkları	Yüzde
İdiyopatik	15%	İdiyopatik	40%
İyatrojenik	40%	İyatrojenik	35%
İnflamasyon- enfeksiyon	40%	İnflamasyon	10%
Tramvatik	5%	Tramvatik	15%

İdiyopatik nedenden kaynaklı darlıklar daha çok genç hastalarda görülmektedir. Bu durum çocuklukta geçirilen ve genelde fark edilmeyen travmalara veya embriyolojik

gelişimde füzyon bölgelerinde darlık gelişmesine bağlanmıştır. Yaşlılardaki ise azalmış kan akımı ve iskemiye bağlanmıştır (154). İatrojenik üretra darlıkları ise; tıbbi olarak üretral girişimlerin artması ile tüm üretral darlıklar içinde önemli pay sahibi olmuştur. Darlık nedenleri içinde önemli bir bölümü görüldüğü gibi yapılan tıbbi girişimler sonunda ortaya çıkmaktadır. Üretra yoluyla yapılan birçok girişim sonucu darlıklar ortaya çıkabilir; katerizasyonlar, geçirilmiş hipospadias cerrahileri, transüretral prostat rezeksiyonları, radikal prostat cerrahileri, sistoskopi gibi girişimler darlığa yol açabilirler. Uzun süreli kalıcı kateterlerin üretral darlık gelişimiyle yakından ilişkili olduğu gözlemlenmiştir. Kısa üretral darlık tedavisinde uygulanan internal üretrotomi operasyonu sonucu da darlık görülebilmektedir. Post-enfeksiyöz inflamatuvar reaksiyona bağlı gelişen inflamatuvar üretral darlıklar ise tüm darlıkların %15'ini oluşturur. Geçmişte daha önemli paya sahip olan gonokoksik (cinsel yolla bulaşan) enfeksiyona bağlı gelişen darlıklar günümüzde nadir görülmektedir. Darlık tek bir enfeksiyondansa tedavi edilmemiş kronik tekrarlayan enfeksiyonlar sonucu oluşmaktadır. Fizik muayene ile tanı koyulabilmesi önemlidir. Travmatik üretra darlığı genelde ata biner tarzda oluşan darbelerle bulber üretra travmasına bağlı gelişir. Penil üretra darlığına daha nadir rastlanmasının sebebi penisin mobil olması ve travmaya daha az maruz kalmasıdır.

2.2.3 Üretra Patofizyolojisi

Üretra darlıklarının oluşmasındaki temel patofizyolojik olay; herhangi bir şekilde zedelenmiş, tramvatik nedenler, enstürümantel girişimler, enfeksiyöz nedenler ya da cerrahi girişimlerdir (1).

2.2.4 Tanı

Üretral darlığı olan erkek bireyler polikliniğe çoğunlukla idrar yapmakta zorlanma, idrar akımında azalma (damlama şeklinde) ve idrarı tam boşaltamama gibi tıkanmalı işeme şikâyetleri ile başvurmaktadırlar. Ayrıca üretral darlığa bağlı olarak gelişen ve sık tekrar eden idrar yolu enfeksiyonu, epididimoorşit (epididimin ve testisin enfeksiyon ajanına, lokal travmaya veya geçirilmiş cerrahiye bağlı gelişen enfeksiyon hastalığı veya inflamatuvar reaksiyondur), prostatit, hematüri (idrarda kan görülmesi) veya mesane taşı gibi üretra darlığının neden olduğu komplikasyonlarla gelen hasta sayısı da oldukça fazladır (26). Başlangıç seviyesindeki darlıklarda fizik muayenede çok fazla bulgu yoktur ancak ileri derecede fibrosis gelişen hastalarda fibrotik üretra

dokusu palpasyon (elle yapılan muayene) yapılarak saptanabilmektedir.

Üretral darlık değerlendirmelerinde tanı aracı olarak ilk basamak; idrar akım ölçümleri, üriner ultrasonografi, idrar kültürü ve rezidüel idrar tayindir. İdrar akım ölçümlerinde obstruktif patern saptanır. Yapılacak olan kültür testi idrar yolları enfeksiyonunu değerlendirme açısından önemlidir. Ultrasonografide incelemeler ile mesane duvarında kalınlaşma ve rezidü idrar saptanabilir. Üretra darlığı şüphesi olan hastalarda darlığın yerini ve uzunluğu belirlemek ve başka darlıklar olup olmadığını net olarak anlayabilmek adına üretrografi adına üretrografi (hastaya ilaç verilerek çekilen radyolojik olarak görüntüleme) çekilmelidir. Fleksibl sistoskopların yaygınlaşması ve lokal anestezi ile kısa sürede yapılabilme avantajı olması önemlidir. Sistoskop darlığı geçebilir ve darlık hakkında doğrudan görüş sağlayabilir (13). Ayrıca penil yüzeyel ultrasonografide üretra darlığının saptanmasında fibrozisin uzunluğu, yerleşim bölgesi ve şiddeti açısından tedaviye yönelik yapılacak işlemlerin planlanması açısından kıymetli bilgiler verebilme ve tedaviyi kolaylaştırabilmektedir (14,15).

2.2.5 Tedavi

Üretra darlığı tedavisinin planlamasında darlığın lokalizasyonu, uzunluğu, dansitesi ve derinliği büyük önem taşımaktadır. Tedavi seçenekleri hastayla detaylı bir şekilde konuşulmalı ve hastanın da durumuna göre en uygun tedavi seçeneği planlanmalıdır.

Üretra darlığı tedavisi endoskopik ve açık cerrahi yöntemler olmak üzere iki ana başlıkta toplanmaktadır. Hangi tedavi yönteminin uygulanacağı, hastalığın ciddiyeti, başarı oranları ve tekrarlama olasılıklarını değerlendirerek planlanmaktadır. Tedavi planlanırken kısa darlıklar için öncelik endoskopik tedavidir ancak bunda başarı sağlanamazsa ya da girişim başarısız olursa farklı yaklaşımlar tercih edilir. Genel anlamda tedavi şekilleri aşağıda belirtilmiştir.

- Endoskopik tedaviler (Dilatasyon ve İnternal üretrotomi)
 - Üretral dilatasyon
 - İnternal üretromi
 - Lazer üretromi
 - Üretral stentler

- Cerrahi Rekonstrüksiyonlar
 - Anastomotik onarımlar (uç uca ekleme)
 - Greft üretroplastiler
 - Flep üretroplastiler (yama üretroplasti)

2.2.5.1 Endoskopik Tedaviler

✓ Dilatasyon

Özellikle spongiyoz dokunun tutulmadığı sadece epitelyal darlığı olan hastalarda en sık ve en eski kullanılan tedavi şeklidir (16).

Bu tedavide asıl amaç spongiyofibrosis gelişmeden skar dokusunu gererek darlık bölgesini açmak. Başlangıç seviyesindeki darlıklar için etkili bir çözüm olabilmekte iken ileri seviyelerde etkili olmadığı görülmüştür. Bu çözümün başarısı; darlığın uzunluğu, lokalizasyonu ve spongiyofibrosis derecesiyle alakalıdır. Kısa darlıklarda başarı oranı yüksekken darlık boyu uzadıkça başarı oranı düşmektedir, uzun dönem başarısı ise %30-70 arasındadır. Dezavantajı uzun darlıkta etkili olamamasının yanı sıra dilatasyon esnasında yanlış yol(pasaj) oluşumu gibi travmatik üretra yaralanmaları gelişebilir (17). Üretral dilatasyon yöntemi lokal olarak uygulanabildiği için özellikle operasyon istemeyen ve/veya fazla sayıda yan hastalığı nedeni anestezi alamayan hastalarda tercih edilebilir (9), (18,19).

✓ İnternal Üretrotomi

Transüretral yoldan girilerek dar olan üretral bölge soğuk üretrotom bıçağı ile saat 12 hizasından kesilerek mümkünse sağlıklı dokuya ulaşana kadar darlık bölgesi kesilmelidir. İşlem sonrası darlık alanındaki epitel sekonder yara iyileşmesine bırakılır. Epitelizasyon sonrası darlık bölgesindeki iyileşme lümeni daralmadan tamamlanmışsa ve idrar akımı yüksek kalibrede sağlanırsa üretrotomi başarılı olarak kabul edilir (20).

Bu tedavi şeklide genelde bulber üretrada ve 1 cm'den küçük darlıklarda başarılı olmaktadır. İnternal üretrotominin başarı oranları ile ilgili oldukça fazla çalışma olsada; yetersiz takip süreleri, hekimlerin başarı kriterlerinin farklı olması, darlık uzunluk ve lokalizasyonlarının farklı olması ve olguların primer ya da nüks olması sebebiyle başarı oranları değişkenlik göstermektedir. İnternal üretrotominin daha

başarılı sonuçlar verdiği hasta grubu bulber üretra lokalizasyonlu, 1 cm'den küçük, tek, primer, spongiyofibrozin eşlik etmediği ve geniş kalibrasyona sahip darlıklar olarak belirlenmiştir (21-24).

İnvaziv bir yöntem olmaması, kolay uygulanabilir olması, hastanede kalış süresinin kısa olması, ucuz ve tekrarlanabilir olması internal üretrotominin önemli avantajlarından; hastanın daha önceden geçirilmiş internal üretrotomi öyküsü varlığı, darlık alanının 2 cm'den büyük ve multiple olması, işlem öncesi idrar yolu enfeksiyonu varlığı veya inflamatuvar kökenli olması, penil veya membranöz üretra darlıkları ve yaygın spongiyofibrozin eşlik etmesi gibi faktörler de dezavantajları arasındadır. Operasyon sonrası rekürrens %30-50 arasında yüksek bir orana sahiptir (21-23, 25-27). Ayrıca internal üretrotomi sonrası; perinal hematom, üretral kanamalar, yapılmış derininsizyonlarda fistül gelişimi ve erektil disfonksiyon gelişimi görülebilmektedir (28). İnternal üretrotomi ve üretral dilatasyon ile ilgili yapılan çalışmalar, her iki yönteminde kısa ve orta dönem etkinliklerinin, tekrarının ve başarı oranının benzer olduğunu göstermiştir (29).

✓ **Lazer Üretromi**

Üretral darlığın bulunduğu alan lazer probu kullanılarak normal dokuya ulaşana kadar kesilir ve skar dokusu uzaklaştırılır. Bu amaç için farklı lazerler kullanılabilir, farklı lazerlerin kullanılması; farklı seviyelerde yakma meydana getirmesi ve değişik derinliklerde doku penetrasyonuna sahip olmaları özelliklerine göre seçilir. Bu tedavi şekli de özellikle kısa ve çok derin olmayan darlıklarda başarı göstermektedir (43).

Tedavinin dezavantajları arasında; hematüri, üriner sistem enfeksiyonları, dizüri, üriner retansiyon, üriner ekstrevasiyon ve fistül bulunmaktadır. İnternal üretrotomi ile karşılaştırıldığında benzer başarı oranlarına sahip oldukları görülmektedir (30,31)

✓ **İnternal Stentler**

Özellikle sık tekrarlayan üretral darlıkların tedavisinde internal üretrotomi ve dilatasyon sonrasında dar bölgenin daralmasını engellemek için sık kullanılan bir yöntemdir. Kısa süreli stentler olduğu gibi kalıcı stentler de bulunmaktadır. Tedavide kişinin yapısına ve uygulanan yöntemine göre farklı stentler seçilebilmektedir, bu stentler darlık bölgesine endoskop yardımıyla yerleştirilmektedir. Ancak anterior üretra darlığı tedavisinde stent kullanımı son derece sınırlıdır. Konforsuzluk, stentlerde yer değiştirme, stentte taşlaşma, spongiyofibrozis derecesinde artma,

tekrarlayan idrar yolu enfeksiyonları, perineal huzursuzluk, idrar kaçırma, üriner retansiyon, hematüri ve ereksiyonda rahatsızlık gibi komplikasyonlar dezavantajları arasında bulunmaktadır (32).

2.2.5.2 Cerrahi Rekonstrüksiyonlar

Üretra darlığı tedavisinde cerrahi rekonstrüksiyonlarda temel amaç fibrotik alanı çıkartmaktır. Fibrotik alanın çıkarılmasıyla uç uca eklemeler, flepler ve greftler seçilebilmektedir. Hangi ameliyat yönteminin seçileceğine striktürün etyolojisine, yerine ve uzunluğuna, darlık alanı sayısına, sfinktere yakınlık derecesine, fistül, yanlış pasaj veya divertikül gibi komplikasyonların eşlik edip etmemesine göre karar verilir. Seçilecek cerrahi yöntemler kombine olarak uygulanabileceği gibi aynı prosedürün birkaç seans tekrarlanması şeklinde de olabilmektedir (33). Bu yöntemlerin tamamı üretroplasti ya da cerrahi rekonstrüksiyon olarak adlanılmaktadır. Tedavi metodları ve uygulama şekilleri değerlendirilirken uzun dönemde tekrarlama sıklığı ve komplikasyon gibi tıbbi parametreler değerlendirilmekle beraber maliyet etkinlik oranları da değerlendirilmektedir. Yapılan çalışmalarda saptanan sonuçlarda üretroplastilerin rekürrens ve maliyet açısından çok daha olumlu sonuçlar verdiği gösterilmektedir. Uzun dönem başarı oranlarına bakıldığında; üretroplastilerin başarı oranları %85-90 iken üretrotomi yöntemleri ise %20-30 arasında başarı oranına sahiptir (34, 35). Üretroplastiler üretral darlıkların tedavisinde hala altın standart tedavi olarak kabul edilmektedir (34) (36).

✓ Anastomotik Onarımlar (Uç Uca Ekleme)

Bu tedavi yöntemi uç uca anastomoz üretroplastisi özellikle bulbar üretradaki 2cm'den küçük darlıklar için uygulanan ve endoskopik tedaviye göre bu işleme uygun vakalarda % 80-95 arasında değişen uzun süreli başarı oranına sahip bir tedavi yöntemidir (37-39). Darlık alanı mümkünse darlığın her iki ucunu 1'er cm, spongiyofibrozis alanını da içine alacak şekilde tamamen çıkartılır, geriye kalan normal üretra uçları biribiri üzerine getirilerek birleştirilir (anastomoz edilir). Bu cerrahi prosedür özellikle darlık bölgesi spongiyofibrozis alanıyla birlikte tamamıyla çıkarılmış, anastomoz geniş ve/veya gergin olmadan yapılmış olması başarı oranı arttırır (40, 41).

2 cm'den daha uzun darlık alanlarında uç uca anastomoz üretroplastisi uygulanması durumunda penis ve üretranın vasküler ve nöronal yapısında bozulma, ameliyat

sonrası dönemde geçici erektil disfonksiyon, penis boyunda kısalma gibi dezavantajlı semptomlar gözlemlenebilir (42).

✓ **Greft Üretroplasti**

Darlık alanı 2 cm'den daha uzun olan ve anastomoz yapılması gerginlik oluşturma ihtimali olan hastalarda greft üretroplasti tercih edilir. Greft materyali olarak penil deri, skrotal deri (testis torbası derisi), ağız mukozası (yanağa doğru olan bukkal veya dil), mesane mukozası ve rektal mukoza kullanılabilir. En çok tercih edilen greftler ağız mukozasıdır; hastadan elde edilme kolaylığı, saçlı deri içermemesi, dayanıklı olması ve yüksek başarı oranları tercih edilme sebeplerindendir (24, 43-45). Greftler ventral ya da dorsal yüzden yerleştirilebilmektedir, seçilecek olan yöntem darlığın durumuna göre seçilir. Her iki tekniğinde kendine göre avantajları ve dezavantajları bulunmakla beraber birçok çalışmada aralarında çok da fark olmadığı belirtilmektedir (58, 59). Yapılan çalışmalar ventral yoldan greftlemenin teknik olarak daha kolay olduğunu, üretra mobilizasyonunun ve diseksiyonunun daha az yapılması nedeniyle komplikasyon oranlarının daha düşük olduğu belirtilmekle beraber dorsal yoldan greftlemede divertikül oluşum riskinin az olduğu, doku kanlanmasına daha uygun olduğu ve daha geniş çaplı üretra elde edilebildiği belirtilmektedir (9, 46-48).

✓ **Flep (Yama) Üretroplasti**

Flep üretroplasti uygulaması da tıpkı greftler gibi striktür alanı uzunsa tercih edilen ve bazı doku transfer teknikleri kullanılarak yapılan bir yöntemdir. Flep üretroplastisinde genel olarak uygun uzunluk ve genişlikteki penil deri tercih edilmektedir. Yama olarak alınan komşu dokulardan kendi damarları ile beraber kaldırılarak uygulanır. Bu uygulama genelde tek seansta gerçekleşebilmektedir (49).

Üretral darlığın en temel sebebi olan fibrozis oluşumu mekanizması birçok çalışmada değerlendirilmiş ve TGF-B nin etkinliği gösterilmiştir (50).

2.2.6 Üretral Darlık Tedavilerinde Önceden Yapılan Çalışmalar

Üretral darlık ülkemizde sık görülmesine rağmen etkili ve kalıcı bir tedavi yöntemi hala bulunamamıştır. Uygulanan cerrahi ve endoskopik yöntemlerin dışında lokal ilaç tedavi çalışmaları da yapılmakta ve her yöntem birbiriyle karşılaştırılmaktadır. Böylece kalıcı ve etkin bir tedavi yöntemin geliştirilebilmesi mümkün olabilecektir. Üretral darlıkta tekrarın en büyük sebebi fibrosiz oluşumudur, tekrarın olması dışında

bazı hasta gruplarında darlık seviyesinin küçük olması kalıcı olarak çözüm sağlamaya çalışılan yöntemler geliştirilmesine sebep olmaktadır. Son yıllarda anti-fibrotik etkisi bulunan enjeksiyon yöntemleri darlık hastaları için ilgi çekici olmaya başlamıştır; bu yöntem üretral darlıkta yer alan fibrotik skar dokularının çözülmesi amacıyla içerisine bazı maddelerin enjekte edilmesi ve böylece internal üretrotomi sonrası rekürrens oranlarının azaltılması da hedeflenmiş ve bu amaçla çalışmalar yapılmıştır. Bu amaçla ilaç uygulamalarında yaygın olarak mitomicin-c, tadofil ve docetaxel kullanılmaktadır. Kullanılan ve en fazla ümit vadeden madde olarak 'Mitomisin C' öne çıkmıştır (51). Uygulanan diğer bir madde olan 'Triamsinalon' isimli madde enjeksiyonu sonuçları da olumlu olarak bulunmuştur. Ancak bu konudaki çalışmalar çok kısıtlı hasta sayısı ile yapılmıştır ve takip süreleri çok uzun değildir. Bu konuda yapılacak daha geniş hasta grubuna ve prospektif randomize çalışmalara ihtiyaç vardır (52,53).

Son zamanlarda en çok dikkat çeken yöntemlerden birisi de doku yamaları olmuştur; Sayharman ve ark. (2002) tarafından yapılan bir çalışmada 20 erişkin melez erkek köpekte defekt oluşturulmuş ve bu bölgelere ven grefti kullanılmış; bu uygulama sonucunda %61.1 herhangi bir komplikasyon görülmemiş, komplike üretral darlıkta tercih edilebilir bir yöntem olarak belirtmişlerdir. Ancak denek sayısının azlığı verilerin sadece histopatolojik olarak incelenmiş olması, klinik zorluklar gibi sebeplerle mekanizma tam olarak aydınlatılamamıştır (54,55). Ayrıca yapılan bu çalışmalarda uygulanan yöntem ve sonuçların değerlendirilmesi moleküler düzeylere inmemiştir dolayısıyla mekanizmanın işleyişi hakkında tam bilgi sahibi olunamamaktadır.

Moradi ve ark. (2016) tarafından yapılan bir çalışmada mitomisin C hidrojel formunda hazırlanmış ve üretral darlık hastalığı bulunan 40 hastaya uygulanmış ve hastalarda Mitomisin C enjeksiyonu ile ilgili önemli bir komplikasyon görülmemiştir. Ayrıca direk enjeksiyona bağlı yan etkileri minimize etmek ve daha uygun sonuçlar elde etmek için ilaç formülünde hidrojel olarak hazırlanıp uygulanmıştır. Mitomisin C hidrojel formu üretral darlığı önleyen anti-fibrotik etkiye sahip olduğu ve lokal olarak normal üretra hücrelerine herhangi bir yan etkisinin olmadığını belirtmişlerdir (56).

Tabassi ve ark. üretral darlık bulunan 70 hastayı; iki deney grubuna ayırmıştır ve 34 hastayı triamsinolan asetonid enjeksiyonu 36 hastaya ise steril su enjeksiyonu uygulanmış beş yıl boyunca takibe alıp karşılaştırma yapmıştır. Değerlendirme

sonucunda deney grubunda 12, kontrol grubunda ise 15 hastada tekrarlanma gözlemlenmiştir. Çalışma sonucunda triamsilon asetonid enjeksiyonlarına atfedilen herhangi bir komplikasyon ile karşılaşmamış ve iç üretrotomi sonrası steroid enjeksiyonunun, üretral darlık tekrarını geciktirebilen güvenli bir yöntem olduğunu savunmaktadır (57).

Ali ve arkadaşları 2015 yılında yaptıkları çalışmada 151 üretral darlık rahatsızlığı bulunan hastalardan 78 ine mitomicin C, 73 üne ise internal üretrotomi (soğuk bıçak yöntemi) ile tedavi uygulanmıştır. 18 aylık takip ile değerlendirilmiş ve mitomisin c uygulanan hastalarda hastalığın tekrarının geciktiği rapor edilmiştir (58).

2015 yılında Kumar ve ark. tarafından 50 üretral darlık hastasına PGI tetra inject (triamcinolone, mitomicin-c, hyaluronidase, N-acetyl cysteine) kombinasyonu uygulanmış ve 6-18 aylık seyirleri incelenmiş hastaların 41'inde (%82'sinde) başarılı sonuç elde edilirken, 9'unda (%18'inde) hastalığın tekrarlandığı görülmüştür. Kumar ve ark. darlık boytuna göre gruplandırma yaptıklarında darlık boyutu arttıkça tekrar oranının da arttığını belirtmişlerdir (59).

Son yıllarda yapılan hayvan deneylerinde; Fu ve ark. (2014) Yeni Zellanda tavşanları ile bir çalışma yapılmış ve bu çalışmada üç grup oluşturulmuş; docetaxel (antikanser ajanı) yüksek doz ve düşük doz olarak uygulanmış ayrıca kontrol grubuna da hiç ilaç uygulanmamıştır. Çalışma sonucunda bu ilacın fibrozis dokusunu azalttığını ve kollajen ekspresyonunu da arttırmıştır. Yapılan çalışma docetaxelin ileride tedavi için etkin olabileceğini söylese de ilacın diğer organlara olabilecek yan etkileri, ileri dönemde kontrol edilmemiş olması, moleküler testlerin yapılmamış olması pek umut vaad edici olmadığını göstermektedir (60).

Castiglione ve ark. (2016) ratlarda üretral darlık oluşturmada fibroblastın yeniden oluşmasını sağlayan TGF- β 1 kullanmışlardır. Uygulama sonrasında yağ dokusu kökenli kök hücreleri kullanarak fibroblastları yok etmeyi amaçlamışlar ve deneklerin birçoğunda bunu başarmışlardır (61).

Sangkum ve ark. (2016) 18 erkek sıçanda yapılan çalışmalarında sıçanları üç ayrı gruba ayırmış; birinci gruba salin enjeksiyonu (steril serum fizyolik), ikinci gruba TGF β -1, üçüncü gruba ise adipoz yağ dokusu kökenli kök hücre ile birlikte TGF- β 1 uygulamışlardır. Sonucunda sadece TGF β 1 uygulanan grupta kolajen tip I ve kolajen tip III de artış gözlemlenirken, adipoz yağ dokusu kökenli kök hücre ile birlikte TGF β 1

uygulamasý yapılan grupta ise kolajen tip I ve kolajen tip III de azalma gözlemlenmemiştir, gruptaki hayvan sayısının azlığı ve bu çalışmada genetik ve moleküler testler yapılmamış olması çalışmanın yetersiz kaldığını göstermektedir (62).

Kurt ve ark (2016) 4 ay boyunca 28 Yeni Zellanda tavşanı üzerinde yaptıkları çalışmada tavşanları üç gruba ayırmışlar birinci grup tavşanlara sadece üretroskopi, ikinci gruba ise sadece elektrokoagülasyon yöntemi üçüncü ve son gruba ise elektrokoagülasyon ile birlikte sistemik tadofil ile tedavi uygulanmıştır. 30 günlük takibin ardından üretradaki morfolojik değişiklikler incelenmiş ve üretral çağında tadofil uygulanan gruplarda üretral çapında farklılıklar ve kolajen seviyesinde düşüşler gözlemlenmiştir (63).

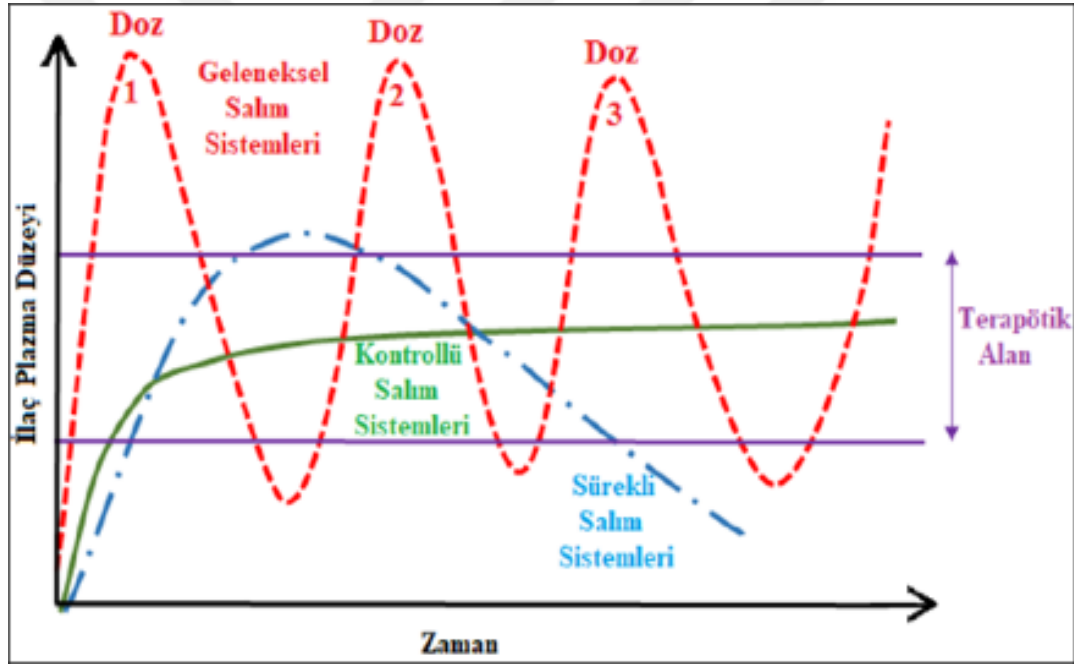
2.3 Kontrollü Salım Sistemleri

İlaç sanayii özel ihtisas komisyonun tanımına göre; insanlarda hastalıktan korunma, tanı, tedavi veya fonksiyonun düzeltilmesi ya da insan yararına değiştirilmesi için kullanılan genellikle bir veya birden daha fazla yardımcı madde ile formüle edilmiş etkin madde veya maddeleri içeren bitmiş dozaj şekli olarak tanımlanan tıbbi farmasötik ürünler ilaç olarak adlandırılır.

İlaçların (etken maddenin) vücutta etkili olduğu minimum ve maksimum kan konsantrasyon aralığı vardır ve bu değerler arasında kalan kısma terapötik alan denir, Terapötik alan; tedavi eden, ilaç plazma derişim düzeyidir. Alınan ilaç miktarının terapötik alan içerisinde kalması ilacın vücutta etkili olmasını, tedavinin yararlı ve tutarlı olmasını sağlar (64)

İlacın bu aralık içerisinde kaldığı sürece tutarlı ve yararlı tedaviden bahsedilebilir. İlaç miktarı, maksimum kan konsantrasyon düzeyine ulaştığında veya bu seviyeyi geçtiğinde gereksiz ilaç kullanımına sebep olmakta ayrıca hastanın ve zararlı ve yan etkilerle birlikte toksik etki gösterir, tersi şekilde minimum kan konsantrasyon değerinin altına indiğinde de yetersiz ve tedavi edici özelliği kalmamış demektir. Etken maddenin terapötik aralığından kullanılarak, ilaç salımının hızlı veya yavaş olması için ilaç taşıyıcı sistemlerden yararlanmak gerekmektedir. Bunun içinde hasta için en uygun tedavi edici nitelikte ve hastaya kolaylık sağlayan sistemler seçilmelidir (65,66).

Geleneksel ilaç salım sistemlerinde vücuda alınan etken maddenin salımı hemen gerçekleşir. Bu durumda ilaç alımıyla beraber plazma derişiminde hızlı bir artışa ve kısa bir süre içinde de hızlı bir azalmaya böylece ani dalgalanmalara sebep olur. İlaç konsantrasyonunu kanda istenilen terapötik aralıklarda tutabilmek gerekmektedir bunun için sık ve düzenli dozlama aralığı gerekir. Bu durum bir yandan ilacın sürekli olarak vücuda alınmasını gerektirir bir yandan da ilaca bağlı olarak toksik etkilerin görölmesini artırır. Plazmadaki ilaç seviyesinin bu şekilde dalgalanması canlı için yan etkilerin yanı sıra toksik olabilir ve ilacın etkinliliğinin düşmesine, tedavinin başarısız olmasına sebep olabilir. İlaç alımının sık, belirli aralıklarla tekrarlandığı dozlar şekilde olan klasik metotlar, tablet ya da kapsüllerin oral veya enjeksiyon şeklinde uygulanmasıdır. Şekil 2.4.'de plazmadaki ilaç derişiminin zamanla oluşan değışim grafiğı gösterilmiştir (67).



Şekil 2.4. Sürekli, geleneksel ve kontrollü salım sistemleri için etken maddenin plazma konsantrasyonundaki değışikliklerin terapötik alan üzerine etkisi (67)

Kontrollü salımı anlatan Şekil 2.4'de görüleceğı gibi ilacın terapötik aralık maruz kalmasına sebep olmaktadır. Terapötik alanda bulunan ilaç etken maddeleri kullanıcı açısından tam verim alınması avantajı sağlamaktadır.

Son yıllarda bilim insanları yaptıkları çalışmalarda etken madde alımını minimuma indirerek dozlama aralığını uzatmak, hastanın olası yan etkilerinden etkilenmesini önlemek, kanda oluşan dalgalanmaları en aza indirmek ve hastanın yaşam kalitesini

arttırmak için çalışmalar geliştirmiştir. Bu doğrultuda hedeflenenlere en iyi cevabı veren sistem polimerik sistem; Kontrollü Salım Sistemleri' dir. Geleneksel Salım Sistemlerinin aksine, Kontrollü Salım sistemleri; belirlenmiş optimum değerde ve belirli zaman aralıklarında kararlı bir şekilde ilacı salan sistemlerdir. Bu sistemlerde çevresel koşullardan etkilenilmediği sürece ilacın kontrollü bir şekilde günler ve aylarca sürebildiği gözlenmiştir (67-70).

Kontrollü salım sistemlerinde ilaç salımı; bir kez uygulamanın yeterli olduğu, ilacın etki bölgesinde kalma süresinin bir günden daha fazla olduğu sistemlerdir. Bu sistemler sıfırıncı dereceden kinetiği takip etmekte ve ilaç salımı aktif transportla gerçekleşmektedir. İlaç salım oranı çözünmüş maddenin konsantrasyonundan bağımsızdır yani ilaç konsantrasyonu artırılrsa bile salım hızında artış meydana gelmemektedir (71-73).

2.3.1 Kontrollü Salım sistemlerinde olması gerekli özellikler

- Kan plazmasındaki ilaç etken madde derişimi sabit olmalı, terapötik aralıkta ilaç konsantrasyonu etkili korunmalı.
- İlacın salımı belirlenen hız ve zamanda gerçekleşmelidir.
- İlacın tedavide etkili olabilmesi için salımın daha önceden belirlenmiş olan hız ve sürede gerçekleştirebilmelidir.
- Yan etkileri azaltılmış, etkinliği artırılmış bir şekilde istenilen bölgeye hedeflendirilebilmeli, hastalıklı dokuya yerleştirilebilir olmalıdır.
- Doz sayısını azaltıp güçlendirilmiş bir etkinlik sağlamalıdır.
- Biyobozunur olmalı; uygulamanın bitiminde vücutta bozunabilir olmalıdır (74,75).

2.3.2 Kontrollü Salım Sistemlerinin Avantaj ve Dezavantajları

Kontrollü salım sistemlerine ait avantajlar

Hasta ile uyumu klasik ilaç kullanımına göre çok daha iyidir. İlacın gün içerisinde birkaç alınma gereksinimi ortadan kaldırdığından, gece ilaç alımı veya ilaç alımının unutulması gibi ihtimallerin önüne geçmektedir.

Kanda bulunan ilaç etken maddesinin derişiminde oluşacak iniş-çıkışlarını önler ve

böylece vücutta eşit düzeyde etken madde konsantrasyonu sağlar.

Klasik ilaçlar verildiğinde ortaya çıkabilen pik konsantrasyonların sebep olabileceği istenmeyen yan etkilerin şiddetini ve sıklığını azaltabilmektedir.

Kontrollü ilaçlar kullanılan toplam etkin madde miktarını azaltmaktadır. Düşük dozlarda tedavi sağlanabildiğinden etkin maddenin (antikanser ilaçları gibi) ağır yan ve toksik etkilerinin azaltılması veya tamamen ortadan kaldırılması söz konusudur.

Etken maddenin salımı kontrollü olacağından mide ve bağırsak mukozasında tahribat oluşturabilecek fazla miktardaki maddelerin zararlı etkilerinin azaltılması veya önlenmesi sağlanabilmektedir.

Hastada olası yan ve toksik etkiler azaltıldığı, ortadan kaldırıldığı için hastanın tedavi süresi kısalabilmektedir, tedavi görecektir kişinin yaşam kalitesi artacağından bakımı kolaylaşacak böylece gelişimi düşük olan bölgelerde kontrollü salım gerçekleştiren sistemlerin kullanılması tercih edilerek tedavinin kolay yapılmasını sağlanabilmektedir.

Reçete hazırlama, ilaç dağıtım işlemleri ve ilaç bekleme süreleri azalmaktadır bundan dolayı ekonomik olarak da tasarruf sağlanmaktadır (76,77)

Kontrollü salım sistemlerine ait dezavantajlar

Kontrollü salım sistemlerinde kullanılan polimerlerin formülasyonlarında kullanılan etkin madde dozu yüksek olduğundan, kullanım esnasında oluşabilecek bir sebeple (ilacın mekanik dayanıksızlığı, ezilmesi, etken başka bir madde ile alınması vb.) oluşabilecek çatlaklar ve dağılmalar biyolojik olarak uyum göstermemesine ve toksisitenin artmasına sebep olabilir (65,66)

Sistemin oluşturulması sırasında veya sonrasında oluşan çatlaklar ve dağılmalar sistem vücuda verildikten veya yerleştirildikten sonra istenildiği salımın durdurulamamasına ve ilacın ani bir şekilde vücutta salımına yol açabilir (78,79)

Doz seçiminin limitli olması; bu preparatlar kırılıp toz formuna getirilemez, suda çözünmeyen, kırılmayan özelliklerinden ötürü tek bir ilaç formunun bölünememesinden doz seçimi limitlidir. Konvensiyonel ilaçlarda olduğu gibi kişiye göre dozun artırılması ya da daha alt limitlerdeki dozlara bölünebilmesi mümkün değildir (80,81).

Kullanılan formülasyonlarda etken maddenin fazla miktarda olmasından, çeşitli

sebeplerle (ilacın ezilmesi, alkol ile kullanımı, çiğnenmesi gibi) uygulanması halinde salım hızlı gerçekleşebilir bunun sonucu olarak toksik etkinin artabilir ve başka yan etkiler oluşturabilir (82-84).

2.3.3 Kontrollü Salım Sağlayan Sistemlerde Formülasyonu Etkileyen Parametreler

Kontrollü salımın başarılı olabilmesi için; plazmadaki ilaç etken maddesinin derişimi sabit, önceden belirlenmiş olan hız ve sürede salım gerçekleştirebilir olmalı. Salımın uygulanabilir olması için formülasyonunun düzgün kurulmuş olması gerekmektedir. Bunun için de bazı biyolojik ve fizikokimyasal özellikleri taşıması gerekmektedir. Kontrollü salımda formülasyonu etkileyen faktörler çizlge 2.2’de belirtilmiş ve açıklamaları ilerleyen kısımlarda yapılmıştır.

Çizelge 2.2. Kontrollü salım sistemlerinin formülasyonunu etkileyen parametreler

Etkin maddenin fizikokimyasal özellikleri	Doz
	Sulu ortamdaki çözünürlük
	Paylaşım katsayısı
	Molekül ağırlığı/büyükülüğü
	Etkin maddenin kararlılığı
	Proteine bağlanma
Biyolojik parametreler	Absorbsiyon
	Dağılma
	Metabolize olma
	Terapötik indeks
	Etkin maddenin biyolojik yarı ömrü

Etkin maddenin fizikokimyasal özellikleri:

✓ Doz:

Oral olarak alınacak ilaç etken madde miktarı 0,5 g veya daha fazlaysa formülasyonda kullanılan yardımcı maddeler ve sürdürme dozunun eklenmesi hazırlanan ilacın oral yolla alınamayacak kadar büyük olmasına sebep olacaktır.

✓ Paylaşım katsayısı

Kontrollü salım sistemleri için yağda ve/veya suda çok çözünen etkin maddeler uygun olmamaktadır, vücudun çoğu bölgesi için (deri, göz gastrointestina kanal gibi) optimum dağılım katsayısı n-oktanol/su 1000'dir (85).

✓ Sulu ortamdaki çözünürlük

Çözünürlük özelliği fizyolojik pH değerine bağlı olan maddeler; suda az veya çok çözünen maddelerin bu tür sistemlerin oluşturulması için uygun aday madde olmadığı tespit edilmiştir. En düşük çözünürlük limiti 0,1 mg/mL' olmalıdır (86)

✓ Etkin maddenin salım kararlılığı

Özellikle oral kullanılması planlanan kontrollü salım yapan sistemlerde bütün gastro intestinal kanal boyunca etkin maddenin sürekli ve düzenli salım yapması planlanır. Ph değerlerinin bu süreçte farklılık göstermesinden dolayı maddenin kararlı halde kalması gerekmektedir. Değişen pH ortamlarında kararlı olmayan maddelerle formülasyonun hazırlanması oldukça zordur (87).

✓ Molekül ağırlığı/büyüklüğü

Tıpkı paylaşım katsayısı gibi molekül ağırlığı da etkin maddenin biyolojik membranlardan difüzyonunda etkili olan faktörlerdendir. Biyolojik membranlardan geçiş açısından küresel moleküller için molekül ağırlığı (MA);150, zincirli bileşikler içinse 400 MA olarak bilinmektedir. Molekül ağırlığının artması etken maddenin difüze edilebilirliğini azaltırken, azalması hızlandırmaktadır (88).

✓ İlaç etken maddesinin biyolojik parametrelere göre özellikleri

Terapötik indeks; ortalama toksik dozun ortalama efektif doza oranı olarak tanımlanmaktadır. Bu oranın 10 ve 10'dan büyük olan etkin maddelerin kontrollü salımda kullanım için uygun olduğu bilinmektedir. Terapötik indeksi daha düşük olan maddelerinde dozaj formları etken madde salımlarının düzgün olması şartıyla

hazırlanabilmektedir.

✓ **Metabolize olma**

Etkin madde bazı enzim sentezlerinin sentezlenmesini arttırıyor veya azaltıyorsa, gastrointestinal yolda metabolize oluyorsa veya karaciğerden ilk geçiş etkisine maruz kalıyorsa kontrollü salım için uygun bir aday madde değildir.

✓ **Absorbsiyon**

Sabit kan konsantrasyonu ve doku seviyesi için absorbsiyon hızının sabit dozaj formuna sahip olması gerekmektedir. Yavaş veya dalgalı absorbsiyon hızına sahip maddeler bu sistem için uygun değildir.

✓ **Dağılma**

Yüksek dağılma hacmine sahip maddeler eliminasyon hızında değişkenlik gösterir. İlaç etkin maddesinin dokulara dağılımı eliminasyon kinetiği için önemlidir.

Etkin maddenin biyolojik yarı ömrü (Eliminasyon yarı ömür)

Biyolojik yarı ömür kan konsantrasyonunun istenilen düzeyde tutulması için önemlidir. Yarı ömrü düşük olan maddelerin düşük dozlama yapılması önerilmektedir. Kontrollü ilaç salım sistemlerinin ilaç etken maddelerinin eliminasyon yarı ömürlerinin 2 ile 8 saat aralığında olmaları tavsiye edilir. İdeal olan etkin maddenin vücuttan atılma hızında vücuda verilmesidir (82,84).

2.3.4 Kontrollü Salım Sistemlerinin Kullanım Alanları

Kontrollü salım sistemleri temel tıp bilimleri başta olmak üzere; tıp, kozmetik sektörü, yapay hücre yapısı sentezi, eczacılık, tarım, veterinerlik ve çevre gibi alanlarda her geçen gün artan geniş bir kullanım sahasına sahiptir. Özellikle tıp alanında tanı koyma, tedavi amaçlı ve cerrahi olarak eskiden beri kullanıldığı görülmektedir.

Kozmetik alanında artık klasik sistemler yerine özellikle yaşlanma karşıtı ve güneş koruyucu gibi kremlerin formülasyonlarında, nemlendiricilerin kullanımının kullanıcı tarafından uzun olmasında kontrollü salım sistemleri kullanılarak hazırlanmaktadır (89,90)

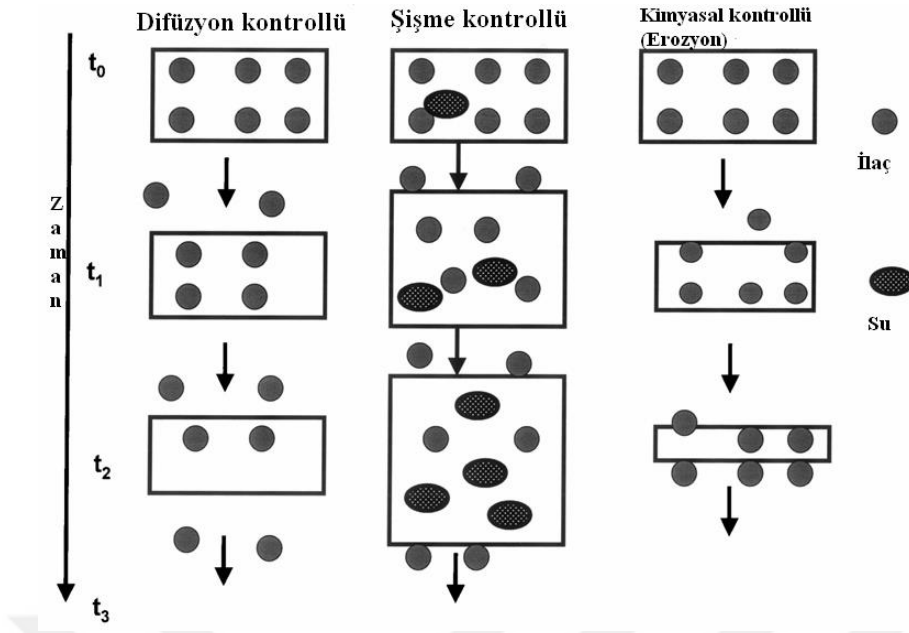
2.3.5 Kontrollü Salım Sistemlerinin Sınıflandırılması

Kontrollü salım sistemlerinde kullanılan polimerlerin salım şekilleri etkin maddelerin kullanımı açısından önemlidir. Hazırlanan polimerik matrislerin salımı nasıl gerçekleştirdiği etken madde ve kullanım alanı göz önünde bulundurularak seçilmelidir.

Polimerik matristen üç tip kontrollü ilaç salımı gerçekleşmektedir; bu sistemlerde polimer, membranın içindeki ilacı muhafaza etmekte ve membrandan ilacın difüzyonu, ilacın salım hızını kontrol etmektedir. Membrandan geçiş sırasında sabit bir derişim elde etmek için membran sisteminin haznesinde (çekirdeğinde) doyma noktasına yakın bir derişim elde etmek önemli hususlardandır. Membran içinden yapılan ilaç transfer sistemi genellikle bir çözelti difüzyon mekanizması şeklinde çalışmaktadır. İlaç transferindeki ilk adım ilacın, membranın iç yüzeyinde çözünmesi ile başlar, ilacın membrandan difüzyonu ile devam eder ve sonrasında membranın dış yüzeyinden ayrılması ile tamamlanır.

Bu sistemlerde; iç konsantrasyon sabit olduğundan ve etken maddenin difüzlendiği membranın kalınlığı salım sırasında değıştirmedeğinden, sabit hızda salımın kolayca elde edilebilmesi en büyük avantajıdır. Sistemin en büyük dezavantajı ise; büyük molekül ağırlıklı (>1000) maddelerin salımını sağlayan sistemlerin hazırlanmasının zor olması, üretimlerinin pahalı olması ve biyolojik ortamda parçalanamamalarıdır (91).

Uygulama bölgesinde şişme yapacak olması, difüze edilebilecek bir ortamda olması ya da kimyasal reaksiyona girebilecek ortamda olması seçilecek polimerin hazırlanmasında önemlidir. Polimerik matristen gerçekleşebilecek üç tip ilaç salımını için şekil 2.5’de zamana bağılı olarak ilaç salımı örneğı verilmiştir.



Şekil 2.5. Polimerik matristen üç tip kontrollü ilaç salımı örneği

Kontrollü salım sistemlerinde matristen ilaç salımı dışında; kontrollü salım sistemlerinin mekanizmasına göre, uygulama yerine göre ve şekillerine göre üç başlık altında incelenebilmekte ve çizelge 2.3’de detaylı olarak verilmekte ve aşağıdaki paragraflarda detaylı olarak açıklanmaktadır.

Çizelge 2.3. Kontrollü salım sistemlerinin sınıflandırılması

Salım Mekanizmasına Göre	Difüzyon Kontrollü Sistemler	Membran sistemler
		Matriks sistemler
	Çözücünün Harekete Geçirdiği Sistemler	Şişme kontrollü sistemler
		Osmotik kontrollü Sistemler
	Kimyasal Kontrollü Sistemler	Vücutta aşınan sistemler (biyolojik olarak aşınabilen ve biyobozunabilen)
		Zincire takılı sistemler (polimer zincirine bağlı sistemler)
	Diğer Sistemler	Manyetik kontrollü sistemler
		Ortama duyarlı sistemler
		Elektrik ve nükleer enerji kullanan sistemler
		Ultrasonik sistemler
Uygulama yerine göre	Oküler sistemler	
	Nazal sistemler	
	Oral sistemler	
	Bukal sistemler	
	Transdermal sistemler	
	İmplant sistemler	

Çizelge 2.4. Kontrollü salım sistemlerinin sınıflandırılması (devamı)

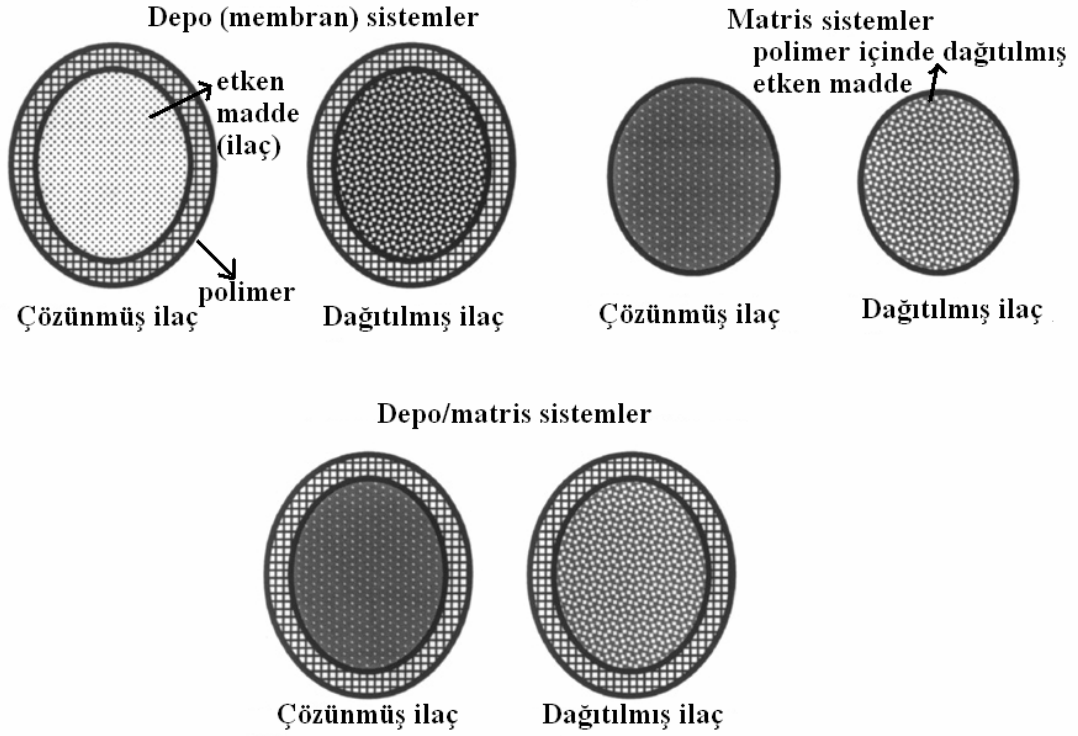
	Vajinal, servikal, intrauterin sistemler	
	Rektal sistemler	
Şekillerine göre	Geleneksel şekiller	Kaplı tabletler
		Emülsiyonlar
		Kürecikler
		Kapsüller
		Matriks tabletler
	İmplant ve aygıtlar (cihazlar)	Mini pompalar
		Tuşlu yamalar
		Halkalar
		Diskler
		Silindirler
	Yamalar ve filtreler	Stendler
		Greftler
	Doğal	Plazmid DNA
		Virüsler
		Antikorlar
		Alyuvarlar
	Yeni taşıyıcı	Mikrokapsüller
		Niozomlar
		Nanopartiküller
		Lipozomlar
		Mikroküreler
		Mikrosüngerler
		Boncuklar

✓ **Difüzyon kontrollü sistemler**

Difüzyon kontrollü sistemlerde ilaç polimerden ortama difüzlenirler (pasif geçiş); bu difüzlenme sonucunda, polimer biyobozunmaya maruz kalabilir. Bir difüzyon sistemine en basit örnek, ilacın bir hazne (çekirdek) içinde bulunmasıdır, bu haznedeki ilaç derişimi doyma noktasına yakın kaldığı sürece, salım, ilacın neredeyse bittiği ana kadar, sıfır derece kinetiğine göre devam edecektir. Difüzyon kontrollü sistemler başkaca iki kısma ayrılır;

Depo (membran) sistemler

Bu sistemlerin merkezinde çözünmüş, aktif olmayan veya saf halde bulunan ilaç ve bu ilacın etrafını saran polimer bir membrandan oluşan sistemlerdir (şekil 2.6).



Şekil 2.6. Depo membran sistemi örnekleme

✓ Matris Sistemler

Bu sistemlerde ise etken madde matris içinde eşit oranda çözünmekte ya da dağılmaktadır. Sistemin en büyük dezavantajı, ilaç salım hızında devamlı düşüşe sebep olan birinci derece salım davranışı göstermesidir. Bunun sebebi ise matrisin salım süresince difüzyon yol uzunluğunun artması ve difüzyon yüzey alanının ise azalmasıdır. Matris sistemlerinin oluşumu ve hazırlanması kolaydır, depo sistemlere göre daha yüksek bir başlangıç salım hızına sahiptir. Ayrıca, matris sistemleri sabit hıza yakın bir hız ile salım yapacak şekilde oluşturulabilirler (92).

Olası bir yırtılma ile içeriğin tamamen boşalması durumunda depo sisteme göre daha az yan etki meydana getirirler. Salım kinetikleri sistemin geometrik şekli ile ilişkili olması bazı durumlarda dezavantaj sağlar. Bu tip bir durumda sistemden sıfırıncı dereceden salım elde edilir ve özel bazı silindirik ve/veya yarıküre şekilli preparatların hazırlanmasının uygun olduğu belirtilmektedir (91).

2.4 Mikroküreler

İlaç taşıyıcı mikroküreler biyolojik olarak çözünebilen ve birçok avantaja sahip olduklarından etken maddenin hedeflenen bölgeye sürekli veya kontrollü bir şekilde

salımında en yaygın kullanılanıdır (93).

Mikroküreler farklı yapılardaki polimerik malzemeler ile hazırlanabilen, içerisinde etken maddenin(ilacın) partiküler halinde ya da moleküler düzeyde çözölüp matris boyunca dağıtıldığı, çeşitli fizyokimyasal özelliklere sahip tipik olarak 1 µm den 1000 µm aralığına sahip homojen yapılardır. Mikrokürelerin hazırlandığı maddeler polimer, cam, karışık oksit, oksit seramiğı, silikat ve alümina silikat, hatta metal olabilir (94-97).

Mikroküreler ayrıca mukoza üzerinde doğrudan bir etki yaparak epitel hücreleri arasında sıkı bağlantıların açılmasına neden olur. Bazı düşük moleküler ağırlıklı ilaçlar, mikro küre preparatlarında başarıyla uygulanmış ve piyasaya sürölmüştür. Boşlukta kalma süresi, solüsyonlara kıyasla mikro küreler için önemli ölçüde artış göstermiştir. Bununla birlikte, büyük hidrofilik ilaçların emilimini artıran tek faktör bu değildir (98). Mikroküreler ilaç etken maddesinin yapısını değıştirmedığı, kullanım amacına uygun olarak istenilen boyutta üretilmeleri, cerrahi müdeahale gerektirmemeleri, düşük dozda yüksek etki göstermeleri gibi sebeplerden avantaj sağlamaktadır (99,100). Mikroküreleri oluştururken kullanılacak malzemeler uygulama yapıalcak alana göre seçilmeli, mukozal yüzeyler ya da nem ihtiva içeren yüzeylere hazırlanacak mikokürelerin mukoadesiv özellikli olması, uygulanacağı alana yapışabilmesi ve orada kalabilmesi oldukça önemlidir.

✓ **İdeal özellikli bir mikrokürede olması gerekenler;**

- Biyouyumlu bir yapı göstermelidir, canlıya toksik bir etkisi olmamalıdır.
- Gerek in vitro gerekse in vivo koşullara dayanıklı, herhangi bir sızıntıya sebep olmamalıdır.
- İçeriğinde bulunana etken maddenin yapısını ve aktivitesini değıştirmeden kontrollü olarak ilgili hedef bölgeye (organ, doku, hücre gibi) taşıyabilmelidir.
- Etken maddenin düşük dozda kullanımına uygun olmalıdır.
- Degregasyona uğramalıdır, biyoparçalanabilir olmalıdır.
- Klinik olarak da uygun bir raf ömrü ve kararlılık göstermesi gerekmektedir (101-103).

2.4.1 Mikrokürelerin Oluşturulmasında Kullanılan Polimerler

Polimer malzeme seçimi kontrollü salım sistemine sahip mikrokürelerde dikkat edilmesi gereken en önemli noktalardandır, malzemenin özelliği istenilen hedefe ulaşılması için önemlidir. Polimerin çözünürlüğü, moleküler ağırlığı, toksik etkilerinin olmaması, biyouyumlu yapı göstermesi, biyobozunur olması, vücuda alındığında toksik etki göstermemesi, etken maddenin difüzyonunu etkileyen önemli parametre olan camsı geçiş sıcaklığı, karsenogen olmaması ve etkin maddenin difüzyonu için amorf şeklinde olması polimerin seçiminde önemli faktörlerdendir (101,104).

Mikroküreleri hazırlamada kullanılan polimerleri sentetik ve doğal olarak iki grupta inceleyebilirken; sentetik olan polimerleri biyolojik açıdan parçalanabilir ve parçalanamaz olarak inceleyebiliriz.

Doğal polimerler kolay metabolize edilebilmesi, biyolojik olarak parçalanmaları, antijenik olamamaları, suda yüksek oranda çözünebilen ilaçlar için yükleme kapasitesinin yüksek olması gibi sebeplerden ötürü tercih edilirler. Doku mühendisliği uygulamalarında doğal polimerler sık kullanılmaktadır çünkü doğal ECM (ekstra selüler matris)'e benzer molekül ve bileşiklere sahiplerdir. Sentetik polimerlere göre doğal polimerler biyolojik olarak aktiftir, hücre yapışması ve çoğalmasını desteklerler, biyolojik olarak çözünebilirlerdir. Hidrojel olarak hazırlanan doğal polimerler mikroküre olarak da tasarlanmakta ve vücut sıvıları ya da ortamla temas ettiklerinde hızlı bir şekilde bozunmaktadırlar (105,106).

Sentetik polimerler ise önceden belirlenen özelliklere göre sentezlenebilir olmaları, uzun raf ömürleri, fazla miktarda ve yüksek saflıkta daha kolay üretilibilmeleri, ayrıca ekonomik açıdan da daha ucuz olduklarından dolayı tercih edilirler (107).

Çizelge 2.5. Mikrokürelerin oluşturulmasında kullanılan polimerler (107)

Doğal Polimerler		Sentetik Polimerler		
		Biyolojik Açıdan Parçalanabilir		Biyolojik Açıdan Parçalanamaz
Polimer Grubu	Örnek	Polimer Grubu	Örnek	Örnek
Proteinler	Fibrinojen, albumin, insan ve sığır serum albuminleri kolajen, jelatin,	Polyesterler	Poli (kaprolakton) Poli (laktik asit) Poli (laktik-ko-glikolik asit) Poli (dioksanon) Poli (glikolik asit) Poli (hidroksibütirat)	Poli (metil metakrilat)
Polisakkaritler	Selüloz, hiyaluronik asit,dekstran, aljinat nişasta, kitosan, kondroitin sülfat	Polianhidridler Polifosfoesterler Poliortoesterler	Polifosfat Polifosfonat Polifosfit	
Poliamidler	Poliamino asit, polipeptid			

2.4.2 Mikrokürelerin Oluşturulmasında kullanılan Polimerlerde Aranılan Özellikler

Kullanılacak olan polimerler biyolojik uyum göstermelidir. Bu uyum; vücutta kaldığı sürece polimerin biyolojik çevreye olumsuz etki oluşturmamasıdır. Biyoyumlu olmalıdır, toksik etki göstermemelidir. Polimerin içerdiği ilacın yapı ve aktivitesini

değiştirmeden hedef bölgeye (organa, dokuya) taşınmalıdır. Hem in vitro hemde in vivo koşullara dayanıklı olmalı, sızıntı yapmamalıdır. Biyobozunur olmalı ve bu bozunmada toksik etki yaratmamalıdır. Raf ömrü kararlılığı ve klinik onay da seçilecek polimerin niteliğini arttırmaktadır (108-110).

2.4.3 Mikrokürelerin Oluşturulmasında Kullanılan Yöntemler

Mikrokürelerin sentezi için birçok metod denenmiş ve geliştirilmiştir. Hazırlama yönteminde; ilacın ve polimerin fiziksel ve kimyasal özellikleri, oluşacak mikrokürenin boyutu gibi noktalar önemlidir. Mikroküreler oluşturulurken; emülsiyon, dispersiyon, süspansiyon polimerleşmesi, püskürterek kurutma, püskütürerek dondurma, koaservasyon, çapraz bağlanma, sprey kurutma, delik yöntemi gibi çeşitli yöntemlerden bahsedilebilir. Bu hazırlama yöntemlerinin en yaygın olanları hakkında bilgiler aşağıda verilmektedir (111). Bu oluşturma yöntemlerinden en yaygın olanları hakkında detaylı bilgiler aşağıda verilmektedir (112-115).

✓ Süspansiyon polimerizasyon

Bu sentez yönteminde temel prensip uygun bir sıvı ortamında monomer bir sıvı ortamında, ortamdaki etkilenmeyerek dağılıp asılı kalması mantığına dayanmaktadır. Dağılma fazı ve monomer şeklinde iki faz bulunmaktadır. Bu hazırlık yönteminde en yaygın kullanılan sıvı ortamı su olsa da hazırlanacak malzemeye göre farklılık gösterebilmektedir. Çapı 0,01-0,5 cm olan damlalar şeklinde sulu ortamda süspansiyonu hazırlanabilmektedir.

Polimerin çözünmesi monomerde yüksek oranda ise sert küreler, düşük oranda ise jel ya da damlalar halinde jel oluşabilir, bu polimerin monomerde çözünmesine bağlı olarak değişiklik gösterir. Polimer çözünürse çökme olur, opak bir görünüm olur. Sentez aşamasında oluşturulması planlanan malzemeye göre seçilir ve uygulanır. Polimer parçacıklarının oluşması sırasında birbirine yapışmasını engellemek için stabilize edici kimyasalları kullanmak gerekmektedir. Bu stabilize edici kimyasallar agregasyonu önlemektedir, genelde suda çözünmemesi tercih edilir en sık kullanılan inorganik bileşikler baryum, bentonit, jelatin, alüminyum hidroksit, kalsiyum ya da magnezyum karbonatlarıdır. Mikroküre oluşturma da genelde kullanılan manyetik karıştırıcı, mekanik karışımı sağlamak için bu yöntemde de tercih edilmektedir.

Yöntemin birçok avantajı ve dezavantajı bulunmaktadır. Avantajları arasında; sıcaklık kontrolü ve ısı transferinin kolay olması, ürün doğrudan kaplanabilmektedir, düşük

viskozitelidir, polimerin mol kütlesinde değişim az olmaktadır, boya veya bağlayıcı olarak kullanılabilmesi ve organik çözücülerin kullanılmaması sayılabilmektedir. Dezavantajları ise; cansı geçiş sıcaklığının yüksek olan polimerlerin polimerizasyon sıcaklığından yüksek kalması durumunda kullanılamaz, karıştırma işlemi devamlı olmalıdır olmaması durumunda yapı da bozulma ya da agregasyona sebep olabilmektedir, devamlı üretim için uygun değildir kesikli üretime uygundur, ortamda bulunan stabilize edici inorganik bileşenlerin ve suyun polimerden uzaklaştırılması gerekmektedir ve bu da ek maliyet oluşturmaktadır.

✓ **Emülsiyon polimerizasyon**

Endüstriyel ölçekte üretim için sentetik latekslerin oluşturulmasında yaygın bir şekilde kullanılmaktadır. Son zamanlarda emülsiyon polimerizasyon prosesi ile hazırlanan yüksek dayanımlı polimerler, sentetik ve sık kullanılan lateksler, sentetik kauçuklar, lateksten hazırlanan köpükler, boyalar, yapıştırıcı olarak kullanılan malzemeler, kâğıt kaplama işlemleri için hazırlanan malzemeler gibi birçok uygulama ve hazırlık aşamasında kullanılmaktadır. Bu polimerizasyonda ortam olarak su-su seçilmektedir ve bu ortam birbiri ile karışmayan iki faz içerir. Monomer fazı bu fazlardan biridir, dağıtma fazında emülsiyon şeklinde dağıtılır, malzemeyi emülsiyon halinde stabil tutabilmek için emülsiyon yapıcı malzemeler kullanılmaktadır. Emülsiyon hazırlanmasında kullanılan birçok yöntem bulunmaktadır. En sık kullanılan emülsiyon yöntemleri; yağ/su veya su/yağ emülsiyon yöntemi ve su/yağ/su emülsiyon yöntemidir. Bu yöntemler yüksek polimerizasyon hızına, mol kütlesi büyük polimerlerin elde edilebilmesine, sıcaklık kontrol kolaylığına, su bazlı çözelti kullanılmasına ve düşük vizikoziteli olmasına avantaj sağlasa da en büyük dezavajı olan emülsiyon yapıcı maddenin ortamdan zor uzaklaştırılmasıdır (116-118).

✓ **Koaservasyon yöntemi**

Koaservasyonun anlamı faz ayrımıdır. Denge çözeltisinde polimerin çözünürlüğünün düşürülmesi ile polimerin miktarca zengin olduğu koaservat oluşturmak temeline dayanmaktadır. Polimer-polimer etkileşimi, sıcaklık değişkenliği, uyumlu ya da uyumsuz bir başka polimerin ilavesi ya da çözücü olmayan ortam sonucu meydana gelmektedir. Metodun uygulanması sulu çözücünden ve organik çözücünden faz ayrımı şeklindedir. Faz ayrımının sulu çözeltiden yapıldığı metod katı ve sıvı özelliktedir malzemelerin kaplanması için kullanılmaktadır (119). Bu yöntem genel olarak basit ve kompleks koaservasyon olmak üzere iki tipte incelenmektedir.

- Basit koaservasyon

Polimerin sulu çözeltisi ile kaplama malzemesinin uygun sıcaklıkta dispers edilmesiyle uygulanır. Polimerin uygun sıcaklık ile çözülmesi sağlanır ardından ortama alkol ve keton gibi çözeltilerin faz ayırma ortamına eklenmesi ile polimerin çözünürlük değeri düşürülür ve disper edilen fazın çevresinde faz ayrımı oluşmasını sağlar (101, 120-122).

- Kompleks koaservasyon

Basit koaservasyondan farkını gösteren en önemli faktör; polimerin iki polielektrolitten oluşmasıdır. Hazırlanan yapıda meydana gelen jelleşme zıt yüke sahip iki polielektrolitin polar çekim kuvvetiyle bir araya gelmesi ile oluşmaktadır. Bu yöntemle uygulanabilecek polimerlere örnek olarak; jelatin/pektin, jelatin/arap zıncı çözeltileri gösterilebilir (123).

2.4.4 Püskürterek Kurutma ve Dondurma Yöntemleri

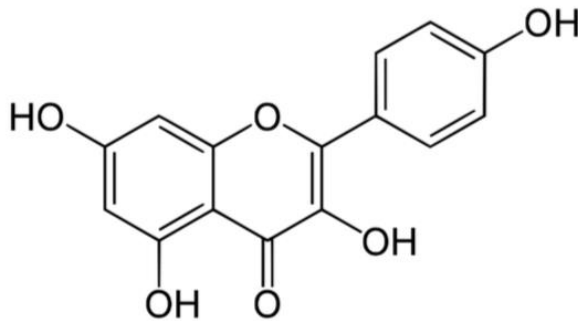
En çok kullanılan yöntemler arasında yer alan bu yöntemler; çözücünün uzaklaştırılması veya çözeltinin soğutulması işlemlerine göre püskürterek kurutma veya püskürterek dondurma şeklinde adlandırılmaktadır. Biyolojik açıdan parçalanabilen polimerin bir takım uçucu organik çözücü ortamında (aseton, metil klorür, diklorometan) çözünmesi ve zaman kaybı olmaksızın ilacın polimer çözeltisi içerisinde yüksek hızda homojenize edilmesi sonrası sıcak hava basıncı ile püskürtülerek mikrokürelerin oluşturulması temeline dayanmaktadır. Sistemde çözücünün buharlaşması ile mikroküreler elde edilir ve mikroküre çapları atomize basınç ve püskürtme şartlarına bağlı olarak 1 µm ile 100 µm aralığında değişkenlik göstermektedir, püskürtme hızının sabit tutulması ile birbirine yakın mikroküreler elde edilebilir.

Püskürtme yöntemin avantajları arasında; mikroküre çap boyutları dağılımının kontrol edilebilmesi, kontrollü ilaç salım özelliklerine sahip olması, polimer özelliklerindeki küçük farklılıkların tolere edilebilmesi gösterilebilmektedir. Ancak dezavantajları incelendiğinde, maliyetin yüksek olması, bu metotta kullanılan peptid/protein ilaçların dağıtılması öncesi liyofilizasyon işlemine ihtiyaç duyması, organik çözücüde homojenize edilmeye gereksinim duyması protein üzerinde agregasyona ve parçalanmalara sebep olabilir ve bu da üretimde, salımda ve saklama esnasında çeşitli problemlere neden olabilmesi avantajlarından daha ağır basan dezavantajdır (124).

2.5 Kaempferol

Bir flavonoid olan kaempferol insan sağlığı üzerinde olumlu etkileri bulunduğu bilinen, farmakolojik ve nutrasötik özelliklerinden dolayı birçok çalışmada yer edinmiş bir bileşiktir. Özellikle elma, üzüm, domates, yeşil çay, patates, soğan, çilek, fasülye ve brokoli gibi birçok bitki, sebze ve meyvelerde bulunduğu yapılan çalışmalarda gösterilmiştir. Kaempferol içeren bitkiler hepatoprotektif aktivite (karaciğer koruyucu aktivite) göstermesi ile sağlıklı gıda olarak da önerilmiştir. Oksidatif stresi azaltarak antioksidan etki yaptığı bildirilmiştir (125-126).

Kaempferolün hem in vitro hem de in vivo olarak antioksidan, anti-inflamatuar ve immuno-modulator özellikleri de bulunmaktadır. Moleküler düzeyde, apoptoz, anjiyogenez, inflamasyon ve metastazla bağlantılı hücrel sinyal iletim yollarında bir dizi ana elemanı modüle ettiğide çalışmalarda bildirilmiştir (127-130). Ayrıca düşük moleköl ağırlıklı (MA: 286,23 g/mol) ve sarı renkli bir bileşiktir (131).



Şekil 2.7. Kaempferolün yapısı

Kaempferol; antihistamik ve antiproliferatif etkili olduğu ve bu etkilere bağlı olarak fibroblastlar tarafından gerçekleşen aşırı kollajen üretimini baskıladığı bildirilmiştir. Yapılan diğerk çalışmaler ateroskleroz ve kardiyovasküler bozuklukları azalttığını ve aynı zamanda antioksidan ve antiinflatuvar etkilere sahip olduğunu da göstermektedir. Kaempferolün in vitro ortamda inflamatuvar cevabı baskıladığı da gösterilmiştir (132,133). Birçok prelinik çalışma, kaempferolün UV ışınlarından koruma, antioksidan, antifungal, antiviral, antikanser, anti-enflamatuar, antimikrobiyal, nöroprotektif, kardiyoprotektif, antidiyabetik, anti-osteoporotik ve östrojenik/antiöstrojenik etki gösterdiğini ispatlamıştır (131), (134-137). Gösterdiği bu etkilerin yanında ayrıca kaempferolün, hava yolu epitel hücrelerinde ve alerjik astımlı

deney modellerinde eoziyonfil infiltrasyonunu ve hava yolu inflamasyonunu da baskıladığını göstermiştir (138,139).

Hipertrofik skar dokusunda ve keloidlerde histamin miktarı artmaktadır, artan histamin miktarına cevap olarak fibroblastlar tarafından aşırı kollajen üretimi gerçekleşmektedir. Hipertrofik skar ve keloid, yara iyileşmesindeki anormal yanıt sonucunda deride özellikle vücut üst kısımlarında ortaya çıkan, kişilerin hayat kalitesini, fonksiyonlarını ve kozmetik açıdan olumsuz yönde etkileyebilen, aşırı iz gelişimi ile karakterize bir durumdur. Kaempferol, antihistaminik ve antiproliferatif etkileriyle fibroblastlar tarafından aşırı kollajen üretimi baskılanabilmektedir (140-142). Ek olarak kaempferol inflamatuvar yanıtı baskılayan hyaluronidaz ve elastazı inhibe etmektedir (143).

Kaempferolün yüksek glikozit polaritesi emilimini engellerken aglikonların ara polaritesi emilimi kolaylaştırır, kaempferol esas olarak ince bağırsakta emilir. Kaempferolün lipofilik oluşu, pasif difüzyonla emilimini kolaylaştırır, yapılan çalışmalar difüzyon ya da aktif taşımayla da absorbe olabileceğini göstermektedir (98). Kaempferol, konjugasyon enzimleriyle ince bağırsakta metabolize edilebilirken kolon mikroflorası tarafından da yoğun şekilde metabolize edilmektedir. Kolonik bakteriler hem glikozitleri hem aglikonları hidrolize edebilmektedir. Emiliminden sonra, kaempferol, glukuronidasyon (glukuronik asit konjugasyonu), sülfatlama veya metilasyona uğrayarak metabolize edilir (140,141).

Kaempferolün genotoksik etkileri ile ilgili birçok rapor bulunmasına rağmen net bir bilgiye literatürde rastlanmamıştır. Yapılan çalışmaların bir kısmında kaempferolün genotoksisiteyi indüklediği gösterilmişken, diğer kısmında da antimutajenik etki gösterdiği kaydedilmiştir (144-147).

Ülkemizde yapılmış olan bir çalışmada, kaempferolün oluşmuş fibrozisi tam olarak geriletmese de yararlı olabileceği, özellikle rutin TNF alfa, IL-10, TGF-beta1 ve IL-2'nin gen ekspresyonlarında gerileme yaptığı gösterilmiştir (148).

Lee ve ark. yaptıkları çalışmada kaempferolün apoptotik yollara etkisine ve vasküler hücrelerdeki etkisine bakmışlardır. Çalışma sonucunda kaempferolün anti-vasküler hedeflemede dolayısıyla kanser tedavisi üzerinde terapötik etkilere sahip olabileceğini savunmuşlardır (149).

Kaempferolün prooksidan aktivitesi, bu genotoksik etkilerde önemli bir rol

oynayabilir. Flavonoidler antioksidan olarak bilinmesine rağmen, bu bileşikler ayrıca belirli koşullar altında prooksidan ajanlar olarak da görev yapabilir (150). Hidrojen atomu bağlanması ile herhangi bir flavonoid serbest radikalleri indirgeyebilir ve böylece fenoksil radikaline dönüşebilir. Oluşan bu fenoksil radikali, stabil hale gelen ikinci bir radikal ile reaksiyona girebilir (antioksidan etki) ya da oksijen ile etkileşime girerek ROS oluşumuna neden olur (prooksidan etki) (151). Flavonoidlerin prooksidan etkileri, demir (Fe^{+2} ve Cu^{+2}) iyonlarını azaltma kapasitelerine de atfedilmiştir; bu indirgenmiş metaller, hidroksil radikallerinin oluşumuna (ör. Fenton reaksiyonu) ve lipid peroksidasyonuna katılabilir (150-153). Flavonoidlerin prooksidan etkileri, sulu tamponlarda çözüldüklerinde otooksidize olma kapasitelerine de atfedilsede, kaempferol de yapılan bazı çalışmalarda bu kapasiteyi göstermedikleri de tespit edilmiş Canada ve diğerleri tarafından yapılan bir çalışmada bu kapasiteyi göstermemiştir (154).

Yapılan bir takım dermatolojik çalışmada kaempferol, immünoglobulin E (IgE) aracılı mast hücre aktivasyonunu ve basit kuanöz anafilaksiyi inhibe ettiği gösterilmiştir (155). Kaempferol, timin dimer oluşumunu baskılayarak UV radyasyonunun neden olduğu cilt hasarlarına karşı da koruma sağlayabilmektedir (156). Son zamanlarda bazı kaempferol içerikli cilt bakım jelleri keloidler ve hipertropik skar üzerine uygulanmaktadır (157). Favonoid içeren bu topikal skar kremlerinin nihai faydalarını test eden etkinlik çalışmaları da bulunmaktadır (158-160).

Li ve ark. yaptıkları çalışmada; kaempferolün, in vitro ve in vivo olarak fibroblastların kolajen sentezini, proliferasyonunu ve aktivasyonunu önemli ölçüde zayıflattığını göstermişlerdir. Hipertrofik skar oluşumu aşırı kolajen birikimi ile karakterizedir ve yapılan çalışmada kaempferolün kolajen tip I ve kolajen tip III ün ekspresyonunu önemli ölçüde baskılayabildiği gösterilirken fibroblast apoptozunu etkilemediği de in vitro in vivo olarak gösterilmiştir. Kaempferolün, doza bağımlı bir şekilde Smad2 ve Smad3 fosforilasyonunu da önemli ölçüde aşağı regüle ettiğini ortaya çıkarmışlardır. Ayrıca yaptıkları çalışmadan kaempferolün fibroproliferatif bozuklukların tedavisi için u/mut verici bir ajan olarak geliştirebildiği bilgisini de vermişlerdir (161).

Son ve ark. yaptıkları çalışmalarda entotoksin kaynaklı hava yolu fibrozlu farelerde kaempferol tedavisinden sonra kolajen tip IV ün ekspresyonunda önemli ölçüde azalma gösterdiğini bildirmişlerdir (162). Karaciğer fibrozu (163), pulmoner fibroz(164) ve miyokardiyal fibroz (165) gibi birçok fibrotik hastalığın oluşumunda

TGF- β 1/Smads sinyal yollarının rol oynadığı bilinmektedir, kaempferolün bu hastalıklar için umut edici bir anti-fibroz olduğu düşünülmektedir (166).

Yapılan çalışmalar çeşitli sitokinlerin yüksek ekspresyonu ile yara bölgesinde keratinositlerin skar hipertrofinde katkıda bulunduğu yönündedir. Kaempferolün keratinositler üzerindeki etkisine ilişkin yapılan çalışmada CD68 antijeni, interferon (a,b ve γ) reseptör 1 ve interferon α ile indüklenebilir protein (clone IFI-15K) gibi inflamatuvar ve immün yanıtlarda rol oynayan genlerdeki ekspresyon modellerinde azaldığı gösterilmiştir. Bu sonuçlar kaempferolün keratinositlerdeki iltihabı azaltarak hiperskar oluşumunu da inhibe edebileceğini göstermektedir (167-169).

Kaempferol'ün olası sağlık etkilerini daha iyi anlamak ve yeni bir ilaç olarak potansiyelini daha iyi değerlendirmek için ek hayvan çalışmaları ve klinik araştırmalara ihtiyaç olduğu bildirilmiştir (170).

2.6 Hyaluronik Asit (Hyaluronan)

Hyaluronik asit (Hyaluronan, HA), en basit bakteriden en gelişmiş canlıya kadar, tüm canlı organizmalarda doğal olarak bulunan bir maddedir ve organizmanın oluşumunda kritik bir öneme sahiptir (171-174). HA, özellikle bağ dokusunun ekstrasellüler matriksinde bulunan, yüksek molekül ağırlıklı, negatif yüklü lineer bir polisakkarittir. Birbirine β 1.3-1.4 glikozid bağlarıyla bağlı, tekrarlayan N-asetil-glukozamin ve d-glukuronik asit zincirlerinde oluşmaktadır. Ortalama molekül ağırlığı 0.1-10 milyon Dalton olan bu madde yüksek molekül ağırlığı, polianyonik karakteri ve dallanmayan zincir yapısından dolayı özel bir reolojik karaktere sahiptir (173).

HA asit tarihte ilk defa 1934 yılında Meyer ve Palmer tarafından büyük baş hayvan gözünün vitroz sıvısından elde edilmiştir, devam eden yıllarda diğer hayvan türlerinden de izolasyon başarılı bir şekilde yapılmıştır. Balazs'ın çalışmalarında hyaluronik asitin; romatoid artrit (iltihaplı romatizma), dejeneratif artrit (osteoartrit, kireçlenme), kanser ve bazı deri hastalıkları gibi pek çok önemli hastalıkta rol oynadığı takip eden yıllarda ortaya konmuştur. Hyaluronik asitin tedavi amaçlı kullanımı ise 1960'lı ve 1970'li yıllarda başlamış;1980'lerde HA içeren ilk ürün geliştirilmiştir (171,173). Geliştirilen ilk ürün viskoelastik yapıdaki ürün, göz cerrahisi işlemlerinde kullanılmıştır. Daha sonra bu tedavi şekillerine ek olarak osteoartrit ve kırışıklık tedavisinde kullanılan ürünler üretilmiştir. Dermiste bol miktarda bulunur, kırışıklık

karşısı yani anti aging etkisi higroskopik özelliğinden kaynaklanır yani HA büyük miktarda su tutma kapasitesine sahiptir ve bu sayede derinin hidrate olmasını sağlar. HA varlığı kolajen lifler arasındaki sürtünmeyi azaltmaktadır, yaşlanma veya UV kaynaklı hasar sırasında azalan HA, frajil deri yapısına, gecikmiş yara iyileşmesine, senil purpuraya (deri altı kanaması), skarlara ve deri atrofisine yol açmaktadır (175-177).

Hyaluronik asit; büyüme faktörleriyle etkileşim kurma, ozmotik basıncı düzenleme, doku lubrikasyonu gibi hücrel ve hücre dışı aktiviteleri içeren çeşitli fizyolojik ve yapısal birçok fonksiyona sahiptir. Sahip olduğu bu özellikler dokunun yapısal bütünlüğünü korurken homeostaz bütünlüğünün de korunmasına yardımcı olmaktadır. İnsan fizyolojisi üzerinde sahip olduğu olumlu yönleriyle kozmetik, tıbbi ve farmasötik alanlarda tercih edilmektedir (178). Biyouyumluluk, immünojeniklik, biyolojik olarak parçalanabilirlik ve viskoelastisite açısından avantajlarından dolayı kozmetik, tıbbi ve farmasötik uygulamalar için ideal bir biyomateryal olduğu bilinmektedir (179). Son yıllarda perkutan embolizasyon (tıkama yöntemi, vücudun belli yerinde bulunan hastalıklı doku, organ ya da tümörün tıkanarak tedavi edilmesi yöntemi), arteriovenöz malformasyon (beyin veya omurilikte anormal kan damarı kümesi), vasküler tümörler ve hemoraji(kanama) tedavisinde de kullanılmaya başlamıştır (180-183). (9,12,15).

Fizyolojik pH (pH'ın 7.4 düzeyi) ve tuz varlığında HA'nın çapı 500 nm'ye ulaşmaktadır. Su molekülleri bu yapı içinde mekanik olarak tutulur ve polisakkarit yapısıyla herhangi bir kimyasal etkileşime girmemektedir. Molekül hacmi, su ile etkileşime girdiği (hidrate olduğu) zaman kuru duruma göre yaklaşık 10.000 kat büyüebilmektedir. Dokularda oluşan inflamasyonla beraber ödem oluşmasının bu durumdan kaynaklandığı belirtilmektedir. HA ya hayvansal kaynaklardan ya da bakteriden fermentasyon ya da doğrudan izolasyonla elde edilebilmekte ve pazarlanabilmektedir (183,184,174).

Kimyasal olarak, glikozaminoglikan (GAG) adı verilen, bağ dokusu proteinleri grubunda en basit ve sülfat içermeyen tek üyedir. Bu grupta; HA, kondroitin, kondroitin-4 sülfat, kondroitin-6 sülfat, heparin, keratan sülfat-1, keratan sülfat-2 bulunmaktadır. En fazla yumuşak bağ dokusunun ekstrasellüler matriksinde olmakla beraber, omurgalıların tüm organlarında mevcuttur (171,185). Gözün vitröz sıvısında, hyalin kıkırdakta, eklem sıvısında, dermis ve epidermiste yer almakta olup; vitröz

sıvıda hacim artırmakta, tendonlar ve kaslarda kaydırıcı olarak görev yaparak, eklemlere kayganlık vermekte, omurganın sağlamlığını artırmakta ve göbek kordonu içinde anne ile fetüs arasında ilişki sağlamaktadır. Hücre motilitesi (hücrenin bağımsız ve istemli hareketi), hücresel proliferasyon, morfogenezis, embriyonik gelişim, kanser metastazı ve inflamasyonda da düzenleyici rolleri vardır. Ayrıca en önemli özelliği doğal ve sentetik diğer polimerlere göre çok daha fazla su tutma kapasitesine sahip olmasıdır (171).

Özellikle fibroblast gibi hızlı prolifere olan hücrelerin plazma membranında HA sentezi gerçekleştirilmektedir. Bu sentezin hızı, hormonlar, yaş ve çevresel faktörlerle bağlı olarak değişim göstermektedir. Sentezlenen HA, ya lokal olarak parçalanır ya da lenf dolaşımı ile dokulardan genel kan dolaşımına aktarılır. Dolaşan HA'nın çok küçük bir kısmı böbrek ve dalakta metabolize olurken, asıl metabolize olduğu yer karaciğerdir (171, 172, 179, 182, 183).

Muko yapışkan mikropartiküllerin kullanılması, ilaçların burun boşluğu içinde, nazal yolda ya da bu tip sıvı geçişi olabilecek ve nemli olabilecek ortamlarda tutulmasını iyileştirmek için potansiyel bir strateji sağlar ve böylece sonuçta ortaya çıkan farmakokinetik profili iyileştirir. Hyaluronik asitte mukoyapışkan özelliği taşımaktadır ve birçok ilaç salım, biyoyararlanım çalışmasında kullanılmış ve kullanımı artarak devam etmektedir. Huh ve ark. yaptıkları çalışmada HA ile oluşturulan ve kontrollü salım yapan mikrokürelerin nazal sistemlerde farklı formülasyonlarla uygulanabileceğini ve klinikte kullanımının yararlı olacağını yaptıkları çalışmada belirtmişlerdir (187,188).

2.7 Aljinat

Aljinat, doğal yollardan elde edilebilen (üç farklı kahverengi deniz yosunundan (*Laminaria hyperborea*, *Ascophyllum nodosum* ve *Macrocystis pyrifera*) ve bakterilerden (*Azotobacter vinelandii* ve *Pseudomonas*)), ardışık β -D-mannuronik asit (M birimleri) ve α -L-gluronik asit (G birimleri) monomerlerinden oluşan bir polisakkarittir. Aljinat bazı toprak bakterilerinde kapsül polisakkaritleri olarak ve denizlerdeki kahverengi alglerin yapısal bir bileşeni olarak doğada bol miktarda bulunmaktadır. Aljinat özellikle; farmasötik, tıp, biyomühendislik gıda, tekstil, kozmetik ve dişçilik alanlarında son yıllarda yaygın olarak kullanılmaktadır.

Farmasötikte, tıbbi bileşenlerin kaplama destek materyali olarak, dişçilikte dolgu ve kalıplarda, gıdalarda koyulaştırma ajanı, jelleştirme ajanı, emülgatör, stabilizatör gibi işlevleri ile tekstilde baskı sırasında yapılan desen uygulamasında renk pastası alt tabakasında, yoğunlaştırıcı ve nem tutucu özellikleri ile birçok alanda kullanılmaktadır (189,190).

Aljinat hidrofilik bir polimer olup suda hidrojel formunu almaktadır, poliasidik yapısı nedeniyle sulu çözeltilerde geri dönüşümlü (tersinir) jelleşmeye uğrar. Aljinatın, hidrofilik olması, organik çözücülere gerek duyulmadan hücreler için ılıman koşullarda matris yapıların oluşturulması, geniş gözenek boyutuna sahip olmasından dolayı difüzyon kısıtlamasının az olması, istenilen durumlarda çeşitli modifikasyonlarla gözenek büyüklüğünün ayarlanabilmesi, biyoyumlu ve biyobozunur özellikleri nedeniyle farmasötik ve ilaç salım uygulamalarında, biyomalzemelerde ve implantasyon çalışmalarında yaygın olarak kullanılmıştır (191).

Yüksek karboksilik asit içeriği, yüksek miktarda su emebilmesini sağlar aynı zamanda Ca^{2+} ve Zn^{2+} gibi çift değerlikli katyonlar, komşu aljinat zincirlerinin G birimleri arasında hızla çapraz bağ yapar ve zincir içi iyonik köprüler oluşturur. Dolayısıyla aljinat hidrojellerinin mekanik dayanımları (M) ve çözünme süreleri doğrudan jelin G/M oranına bağlıdır; yani daha yüksek G/M oranına sahip bir hidrojel daha katı olacak ve daha yavaş çözünecektir. Aljinat, FDA tarafından genel olarak güvenli (GRAS) kabul edilen bir bileşik grubunun üyesidir. Ayrıca aljinatın; poli-L-lisin, kitozan, DEAE-dekstran, amino-poli (oksietilen) veya proteinler gibi polikasyonik suda çözünür polimerlerle kovalent çapraz bağlanmasıyla jel yapıları oluşturabildiği yapılan çalışmalarda gösterilmiştir (192).

Farklı çözünenlerin geçirgenliğinin azalması sonucunda, aljinat hidrojelinde hapsedilmiş aktif farmasötik bileşenlerin (API) salımı gecikmektedir. Aljinat bazlı polimerler pH'a duyarlıdır. Düşük pH'a sahip çözeltilerde aljinat bazlı matristen ilaç salımı önemli ölçüde azalmaktadır, bu durum bir iletim sistemi geliştirilmesinde oldukça fayda sağlamaktadır. Teorik olarak, aljinat düşük pH'da büzülme bu durum enkapsüle edilmiş veya gömülü ilaçları salınamamasına yol açmaktadır. Vücutta bağırsak sıvısı ile teması üzerine, aljinat matrisinin iki değerlikli katyon ve sodyum arasında bir iyon değişimine uğraması ilaç salımı ve matris dağılması (parçalanması) ile sonuçlanır. Aljinatın pH'a bağlı davranışı özel salım profilleri ve akıllı sistemlerin geliştirilmesinde yararlanılmasını sağlamaktadır (193).

Aljinat mikropartikülleri hem küçük moleküllerin hem de makromoleküllerin yüklenmesinde kullanılmıştır. Ayrıca aljinat hidrojel, asidik koşullar altında çözünmediklerinden yüksek asit çözünürlüklü ilaçlar için kusursuz hidrofilik bir matris sistemi olma özelliğine sahiptir. Aljinat matrisin şişme ve çözünmesi pH'a bağlı olduğundan, sistem bağırsak sıvısı ile etkileşim içinde olduğu zaman matristen genellikle belirgin bir salım (%30-40 kadar) gözlenir. Aljinat biyoyumlu, mukozaya yapışabilen ve biyolojik olarak parçalanabilir bir polisakkarittir (194).

Aljinat hidrojel, memeli hücreleri tarafından enzimatik olarak parçalanmamaktadır (çünkü memeliler aljinat üretmezler), ancak ortamda bulunan tek değerlikli katyonların (örn. sodyum) çift değerlikli katyonların yerine geçmesiyle birlikte bozunabilirler bu da biyoyumluluk açısından önemlidir, çünkü aljinat polimer zincirleri böbreğin filtreleme boyutunun üzerindedirler ve yüksek miktarda kalsiyum değişimi geçici bölgesel hiperkalsemiye (ani kalsiyum miktarının artması) yol açabilir (191).

Aljinat hidrojellerin birçok avantajı bulunmaktadır; oral yoldan alındığında toksik etki göstermezler ve üst gastrointestinal sistemin mukoza membranında da koruyucu etki sağlamaktadırlar. Aljinat küreler kurutulduktan sonra tekrar şişebilme özelliğine sahip oldukları için kontrollü salım sistemlerinde rahatça kullanılabilirler. Tekrar şişebilme özelliği pH'a duyarlı olduğu için kürelerle birleştirilen ilaç asitliğe karşı hassas ise mide sıvısından korunabilmektedir (195-196). Ayrıca aljinat hidrojellerin gerektiğinde kısmi olarak oksitlenerek sulu ortamlarda bozunacak şekilde modifiye edilebildikleri de gösterilmiştir. Aljinat hidrojel doku mühendisliği uygulamalarında kapsamlı bir şekilde ve 3D (3 boyutlu biyobaskılama) gibi daha özelleşmiş alanlarda da yaygın olarak kullanılmaktadırlar. Düşük maliyetli, bolca bulunmaları ve *in-vivo* uygulanmalarının ardından gösterdikleri düşük inflamatuvar etkiden dolayı biyoyumluluklarının yüksek olması kullanımını arttırmaktadır. Öncül çözeltinin konsantrasyonlarının değiştirilmesi ve hem uygulanma öncesi hem de sonrasında (kalsiyum konsantrasyonunun ve G/M oranının değiştirilmesiyle) çapraz bağlanmalarının kontrol edilebilmesi ile birlikte viskozitelerinin kolayca düzenlenebilmesinden dolayı bu hidrojel birçok alanda tercih sebebidir. Aljinat hidrojel *in-vitro* (197) ve *in-vivo*'da (198) şekillerini ve hacimlerini koruyabildiklerinden ötürü oldukça iyi ve kullanışlı sistemlerdir. Aljinat hidrojel (özellikle de işleme konusunda) önemli avantajlara sahip olsalar da filogenetik

sıralamada insanlardan oldukça uzakta kalan zenojenik bir kaynaktan elde ediliyor olmaları dezavantajları arasında bulunmaktadır. Dezavantaj sağlayan bir başka nokta ise; organik ve doğal olarak elde edilen bir biyomalzeme olsalar da, memeliler bu polimeri ECM (ekstraselülmatriks)'lerinde bulundurmaması sebebiyle, aljinat, memeli hücreleri için biyomimetik(biyobenzetim) bir malzeme olarak kabul edilmemektedir. Bir başka önemli konu da aljinat hidrojellerinin yüksek miktarda kalsiyum (Ca^{+2}) içeriyor olmasıdır. Bu hidrojellerin büyük doku parçası olarak kullanılmaları durumunda kan dolaşımına ya da çevre dokuya yüksek miktarda kalsiyum salma potansiyelleri vardır (kan dolaşımına katılmaları durumunda geçici hiperkalsemi ile böbrek hasarına ve çevre dokuya katılmaları durumunda heterotofik kemikleşmeye yol açma olasılıkları bulunmaktadır) (191,194).

2.8 Tıbbi Cihazlar ve İlaçlar için İn Vitro Biyouyumluluk Testleri

Ülkemizde son yıllarda hızla gelişmekte olan tıbbi cihaz sektöründe üretilen malzemeler için birtakım testler gerekmektedir. Bu testler TS EN ISO 10993-1:2021 “Tıbbi cihazların biyolojik değerlendirilmesi- Bölüm 1: Bir risk yönetim sürecinde değerlendirme ve deney” içerisinde detaylı olarak belirtilmektedir. Üretilen bir biyomalzeme, tıbbi cihaz ve ilaçlar için karakterizasyon testleri, in vitro biyouyumluluk testleri (sitotoksosite, genotoksosite, kan testleri gibi) ve in vivo testler gerekmektedir. Seçilecek olan deney yöntemi tasarlanan malzemeye göre değişiklik göstermekle birlikte genel vücut uyumluluğu ve karakterizasyon testleri standartın olmazsa olmazlarındandır.

Yapılan bu tez çalışmasında sentezlenen biyopolimer esaslı mikroküreler için in vitro biyouyumluluk ve kimyasal karakterizasyon testleri yapılmıştır. Yapılan bu testlerin genel prensibi aşağıdaki başlıklarda detaylı olarak açıklanmıştır.

2.8.1 Sitotoksosite Testleri

Biyoyumluluk, belirli bir ortamdaki ve konakçının bulunduğu yerdeki tıbbi cihazlarla, bunların konakla doğrudan veya dolaylı olarak temas ettiğinde birbirleriyle dışlama ve yok etme olmadan reaksiyona girme yetenekleriyle, tıbbi cihazların statik durumdayken biyolojik özellikleriyle, in vivo ve dinamik değişim süreciyle ilgilidir göreceli kararlılığı korurken tüm ana sistemleri de tolere etme yeteneğidir (199-201).

Tıbbi cihazlar, Uluslararası Standardizasyon Örgütü'ne (ISO) göre insan vücudunda

kullanılacak kadar mekanik, fiziksel ve kimyasal özelliklerinden veya ne kadar iyi olduklarından bağımlı/bağımsız olarak vücutla temas ettiklerinde biyouyumluluklarını belirlemek için titiz testlerden geçmelidir ve geliştirilen malzeme için en önemli adım bu testlerdir (202,203). Bilim ve teknolojinin sürekli gelişimi ile yeni sentezlenen bir Biyomalzeme ya da ilaç insanlar için güvenli ve etkili kullanımını sağlamak için klinik ortama girmeden önce sitotoksosite, duyarlılaşma, intradermal iritasyon, akut sistemik toksisite ve bir dizi test için biyouyumluluk testlerinden geçmelidir.

Biyoyumluluk testleri arasında sitotoksosite testi, basit, hızlı, yüksek duyarlılığa sahip olması ve hayvanları toksisiteden kurtarabilmesi nedeniyle deney hayvanları çalışmalarından önce tercih edilmektedir (204,205). İn vitro biyolojik değerlendirme ve tarama testlerinden biri olan sitotoksosite testi, uygulanacak materyalin hücre büyümesini, üremesini ve morfolojik etkilerini gözlemlemek için ilgili doku hücrelerinin in vitro olarak kullanıldığı test yöntemidir (206). Tercih edilen sitotoksosite testleri, zorunlu maddelerin yanı sıra bir dizi avantaja sahip olması nedeniyle biyolojik değerlendirme için en önemli yöntemlerden biridir (205). Sitotoksosite testleri için; TS EN ISO 10993-5/D1:2020 “Tıbbi cihazların biyolojik değerlendirilmesi- bölüm 5: Vücut dışı sitotoksosite deneyleri” standartında kabul gören testler belirtilmiştir. İn vitro sitotoksosite test metodları olarak; Nötral kırmızı alımı (NKA), koloni oluşumu sitotoksosite testi, MTT (3-(4,5-Dimethylthiazol-2-yl)-2,5-Diphenyltetrazolium Bromide) ve XTT (2,3-Bis-(2-Methoxy-4-Nitro-5-Sulfophenyl)-2H-Tetrazolium-5-Carboxanilide) testlerinden birinin yapılması standart tarafından uygun görülmektedir. Yapılan test çalışmasında standartta belirtilen MTT sitotoksosite yöntemi ve standartta belirtilmeyen ancak akademik çalışmalarda sıkça kullanılan, kit ile çalışılan bir yöntem olan WST-1 (Water-soluble tetrazolium salt-1) sitotoksosite testi vücudun üretra epitel hücrelerinde ve fibroblast hücrelerinde uygulanmıştır.

Sürekli gelişen sitotoksosite testleriyle birlikte morfolojik değişikliklerle hücre hasarının tespiti, hücre hasarının belirlenmesi, hücre büyümesinin ve metabolik özelliklerinin ölçülmesi gibi yöntemler ortaya çıkmış ve giderek kalitatif değerlendirmeden kantitatif değerlendirmeye doğru ilerlemiştir ve standart haline getirilmiştir (206,207).

ISO 10993-5'te üç tip sitotoksosite uygulama yöntemi belirtilmiştir: Ekstrakt, doğrudan temas ve dolaylı temas testleri (agar kaplama testi ve filtre difüzyonu). Genel olarak

ekstrakt testi, malzemelerin çözünebilir maddelerinin toksisitesini tespit etmek için uygundur ve hayvan toksisite testlerinin sonuçlarıyla genelde tutarlı sonuç göstermektedir. Doğrudan temas testi, tıbbi cihazların sitotoksitesini test etmek için en hassas olanıdır; tıbbi cihazlar zayıf sitotoksisite ile bile ölçülebilir (208). Agar difüzyon testi yüksek toksisiteye ve toplu filtrelemeye (209) sahip malzemeler için uygundur ve moleküler filtrasyon yöntemi, küçük moleküler ağırlıklı malzemelerin (210) toksik bileşenlerinin biyoyumluluk değerlendirmesi için uygundur, ancak burada en önemli nokta uygulanacak olan malzemenin içeriğini bilmeye dayanmaktadır. Agar ile etkileşebilecek bir malzeme için bu test yöntemi uygun bir yöntem olmayabilir. Gao ve arkadaşları (211) doğrudan ve dolaylı temas testi arasında iyi bir korelasyon belirlemiştir.

2.8.2 Genotoksisite Testleri

DNA yapısında oluşan kalıtım ürünleri/kırıkları, anöploidi, kromozom anormallikleri (SCE, CA, MN) gen mutasyonu oluşmasına sebep olmaktadır. Genetik olarak meydana gelen bu değişiklikler genetik toksisite veya genotoksisite olarak adlandırılmaktadır. Piyasada kullanılan kimyasal maddelerin, yeni sentez ürünlerinin, geliştirilen ve kullanılan birçok tıbbi cihazın biyolojik etkilerini belirlemek için genotoksisite testleri sıkça kullanılmakta ve bu testler ISO 10993 standartlarında geçmektedir. Deney hayvanları testleri ve klinik çalışmalara başlamadan önce in vitro koşullarda hücreler ve/veya bakteriler üzerindeki genetik değişikliğe etkisini belirlemek ilk aşama olarak kabul edilmektedir. Genetik toksisiteyi belirleme de in vitro olarak uygulanan iki temel test vardır bunlardan bir tanesi OECD 471'e göre bakteriyel geri mutasyon testi (AMES) bir diğeri ise OECD 487'e göre mikronükleus (MN) testidir (212).

2.8.3 AMES Test Mekanizması

Ames Test sistemi 1970 yılında Bruce Ames tarafından bulunmuş, çeşitli mutojenlere karşı yüksek hassasiyet gösteren, uygulaması kolay ve kısa süreli olan bir test sistemidir. Test ile kimyasal maddelerin karsinojenik, toksikolojik ve mutajenik potansiyelleri değerlendirilebilmektedir. İnsanlarda ve hayvanlarda tümör oluşumunda, somatik hücrelerin tümör baskılayıcı genlerinde meydana gelen mutasyonların saptanmasında ve uygulanan test materyalinin DNA ile etkileşimlerini önleyerek karsinojenik ve mutajenik etkilerini ortadan kaldıran; antimutojenik ve

antikarsinojenik maddelerin belirlenmesinde de kullanılmaktadır.

Testte, *Salmonella typhimurium*'un histidin operonunun değişik bölgelerinde farklı mutasyonlar içeren mutant suşları kullanılmaktadır. Testin genel prensibinde *S. Typhimurium*'un yapay mutasyonla histidin sentezleme yeteneklerini kaybetmiş suşlarının memeli karaciğer post mitokondriyal süpernatant (S9) varlığında ve yokluğunda, test maddesi ile uygulama yapıldıktan sonra ikinci bir mutasyon geçirerek histidin sentezleyebilen ve histidinden bağımsız çoğalması ilkesi bulunmaktadır. Ortamda histidin bulunmadan üreyebilmelerine yol açan kendiliğinden geri mutasyon geçiren koloniler sayılarak mutojenite ve karsinojenite belirlenmektedir. Pozitif mutojen bir kimyasal madde olan ortamda, geri mutasyonla çoğalan bakterilerin koloni sayısı istatistiksel olarak anlamlı olarak artmaktadır. (213,214). Ancak normal şartlar altında da mutojen maddelere maruz kalınmasından spontan olarak geri dönen bakteriden söz edilmektedir. Bu sebeple mutojenik etkiden bahsedilmek için spontan revertant sayısından (negatif kontrol uygulanarak bu sayı belirlenir) daha fazla ve istatistiksel olarak anlamlı revertant koloni sayılması gerekmektedir (215).

Ames testinde kullanılan *Salmonella* yapay mutant suşları, histidin operonunun çeşitli genlerinde farklı mutasyonlarıyla oluşturulmuş ve ticari olarak satılmaktadır. Çeşitli mekanizmalar üzerinden etki eden mutojenlere duyarlı olarak geliştirilen bu suşlar; *S. typhimurium* TA1535, TA1537, TA1538, TA97, TA98, TA100, TA102, TA104 kodlu suşlarıdır (213). Suşlar ve ilgili mutasyon tipleri çizelge de belirtilmiştir.

Çizelge 2.6. AMES testinde kullanılan suşlar ve genetik özellikleri

Suşlar		Mutasyon	Ek mutasyonlar			Hedef	Mutasyon tipi
			uvrB	rf a	pKM101 * pAQ1*		
S. typhimurium	TA97a	hisD6610, hisO1242	+	+	+R	CCCCCC	Çerçeve kayması
	TA98	hisD3052	+	+	+R	GCGCGCG C	Çerçeve kayması
	TA100	hisG46	+	+	+R	GGG	Baz çifti değişimi
	TA102	hisG428	-	+	+R*	TAA	Transisyon/ transversiyon
	TA1535	hisG46	+	+	- R	GGG	Baz çifti değişimi

Histidin mutasyonu(his-); histidin operonunun farklı bölgelerinde ya DNA'daki tek bir bazın değişimi ya da bir bazın eklenmesi veya çıkarılması ile (çerçeve kayması mutasyonları) mutant hale getirilmiş suşlardan oluşmaktadır (216). Bu mutasyonların yerleri ve karakteristik özellikleri, S. typhimurium mutant suşlarının DNA baz dizi analizleri yapılarak üretilmektedir (213). Ayrıca S. typhimurium'un his- mutantlarını kimyasal mutajenlere karşı daha hassas hale getirmek için Rfa, uvrB ve R faktörü gibi bazı mutasyonlarda eklenmiş ve suş üretimleri yapılmıştır. İlgili mutasyonlar ve gen bölgelerindeki değişiklik suşların özelliklerine göre aşağıda detaylı olarak açıklanmıştır.

HisG46 mutasyonu: S. typhimurium TA100 ve TA1535 suşlarında histidin biyosentez yolundaki ilk enzimi kodlayan gen bölgesi üzerinde meydana gelmiştir. Bu mutasyon his G geninde lösin amino asidinin (GAG/CTC) kodonu olan -CUC- yerine prolin amino asidinin (GGG/CCC) kodonu olan -CCC-'nin gelmesiyle oluşmaktadır. S.

typhimurium TA100 ve *S. typhimurium* TA 1535 suşları baz çifti değişimine sebep olan maddeleri içeren mutajenler tarafından geri döndürülebilmektedir (215).

HisD3052 mutasyonu: *S. typhimurium* TA98 ve TA1538 suşlarında meydana gelmektedir. Bu mutasyon histidin biyosentezindeki son enzimi kodlayan his D geni üzerinde oluşmaktadır. HisD3052 mutasyonu his D genindeki tek bir nükleotid eksikliğinde ortaya çıkan çerçeve kayması tipinde bir mutasyondur, *S. typhimurium* TA98 ve TA 1538 suşları çerçeve kaymasına yeniden sebep olan maddeleri içeren mutajenler tarafından geri döndürülebilmektedir (215).

HisC3076 mutasyonu: Bu mutasyon *S. typhimurium* TA1537 ve TA97 suşlarında meydana gelmektedir. TA1537 suşunda normal şartlarda mevcut olup -CCC- tekrarlanan dizisine bir nükleotidin eklenmesiyle oluşan çerçeve kayması mutasyonudur. Ancak çerçeve kaymasına neden olan mutajenlerin araştırılmasında *S. typhimurium* TA1537 suşundan daha hassas olan *S. typhimurium* TA97 suşunda ise hisD6610 mutasyonu meydana gelmektedir. Bu mutasyonda etkilenen bölge olan 6 tekrarlı sitozin dizisinin (-C-C-C-C-C-C-) yanına bir sitozin bazının eklenmesi çerçeve kayması mutasyonuna neden olmaktadır, TA97 suşu daha hassas olduğundan çalışmalarda TA97 suşu tercih edilmektedir (215).

HisG428 mutasyonu: hisG428 gen bölgesinde meydana gelen bu mutasyon ochre mutasyonu olarak adlandırılır. Ochre mutasyonu herhangi bir bilginin kodlanmamasına ve protein sentezinin durmasına neden olan mutasyondur. Bu mutasyon *S. typhimurium* TA102 suşunda görülmekte ve yeniden geri dönmesi normal şartlarda bile mümkündür, bu sebeple genetik işaretleme yapılmasını takiben iki hafta içerisinde kullanılmalı ve her kullanım öncesinde mutlaka genetik işaretlemesi yapılmalıdır (215).

Rfa mutasyonu: Bakteri hücre duvarının lipopolisakkarit tabakasını kodlayan genlerde meydana gelen mutasyondur. Tabakada meydana gelen hasar, hücre duvarının geçirgenliğinin artmasına ve seçici özelliğinin azalmasına neden olarak büyük moleküllerin hücre duvarından geçmesine izin vermektedir (217).

uvrB mutasyonu: Nükleotid kesme çıkarma onarımında görev alan ekzonükleaz enziminin uvrB geninde meydana gelen delesyonunun sonucunda DNA onarım sisteminde olmaktadır. Bu geninin kesilerek uzaklaştırılması esnasında “bio” geni de çıkarılır. Bio geni H vitamini olarak adlandırılan biyotin sentezinden sorumlu olan

gendir. Farklılaştırılan mutant bakteriler üreyebilmek için histidin amino asidine ihtiyaç duyduğu gibi buna ek olarak biyotine de gereksinim duymaktadırlar (213). Nükleotid kesip çıkarma onarım mekanizması uvrB delesyonu nedeniyle inaktive olacağından hata oranı yüksek SOS onarım sistemi tarafından daha fazla DNA lezyonunun onarılması mümkün olmaktadır (215).

R faktörü: Bu gen ampisilin dirençlilik geni olup geni taşıyan bakterilerde normalde bulunan ve hata frekansı yüksek olan “error-prone” DNA onarım yolunun aktivasyonuna ve pozitif sonuçların artmasına neden olmaktadır. R faktörüne sahip olmayan suşlar zayıf mutajenik sonuçlar verirken R faktörü genini taşıyan pKM 101 plazmidine sahip yeni suşlar oldukça kuvvetli sonuçlar vermektedir. Bu test sisteminde yaygın kullanılan bakteri suşları TA 97, TA 98, TA 100, TA 102, TA 1535 suşlarıdır (218).

2.9 In Vitro Genotoksisite de Mikronükleus Testi Mekanizması

Mikronükleuslar, hücrenin nükleusuna dahil olamamış kromozom parçalarıdır. Her ne kadar nükleusa dahil olmasalar da meydana gelebilmeleri için hücrenin nükleus bölünmesi geçirmesi gereklidir. Mikronükleus içeriği; yapısal hasarlardan sonra oluşan kırıklar neticesinde kromozomdan ayrılan parçalar ile sayısal anomalilerden sonra oluşan kromozomların kutuplara çekilmesinde meydana gelen hatalar sonucunda geride kalan kromozomlardır. Mikronükleus oluşumu genotoksik olayların ve kromozomal dengesizliklerin biyomarkırlarından biridir (219).

Yapılan çalışmalarla mikronükleus oluşumu belirlenmiş ve birtakım kriterler oluşturulmuştur. Bu kriterlere göre: mikronükleus esas nükleustan ayrı olmalı ayrıca belirgin nükleus zarıyla çevrili yuvarlak veya oval olmalıdır. Mikronükleus çapı, ana nükleusun 1/3’ü kadar veya daha küçük olmalıdır. Boya alma yoğunluğu ise ana çekirdek ile aynı olmalıdır.

Mikronükleuslar ana çekirdeğe bağlı ve/veya bitişik olmamalı veya mikronükleer sınırlar nükleer sınırlardan ayırt edilebilir olmalıdır. Ayrıca nükleer olmayan partiküllerden farklı olarak ışığı yansıtırmamalı ve feulgen (DNA’yı tanımlamak için kullanılan bir boyama tekniği) pozitif veya diğer DNA’ya özel reaksiyonlarda pozitif reaksiyon göstermelidir (220,221). Mikronükleus metodu sitokinez-bloklama (Cytokinesis-Block) prensibine dayalıdır.

Sitokenez bloklaya metodu, kf mantarlarının metabolitlerinden elde edilen sitokalezin-B (Cyt-B) ile mitoz geçiren hücrelerde bölünme esnasında sitoplazmanın bölünmesini (sitokinezi) durdurma esasına dayanmaktadır. Sitokenez bloklaya metodunun en önemli faydası, çoğalan hücre siklusunda çekirdek bölünmesinin devam etmesi ve bu sayede çoğalmasını hesaplayabilmesidir. Bu halde, sitokalezin B ilavesinden sonra meydana gelen tek nükleuslu, binükleuslu ve çok nükleuslu (>2) hücrelerin tespit edilmesiyle belirlenir. Hücre kültürüne Cyt-B eklenmesiyle, hücrede ilk nükleus bölünmesi tamamlanır. Cyt-B mikrofilament aktivitesini inhibe ederek sitokinezisi durdurur. Fakat sitoplazmik bölünmesini gerekleştiremedii için binükleuslu hücreler oluşur. Dolayısıyla nükleus bölünmesini tamamlamış fakat sitoplazmik bölünmesini gerçekleştirememiş olan binükleer hücreler rahatça sayılabilmekte ve etraflarındaki mikronükleus hücrelerin oranı saptanabilmektedir (219).

Mikronükleus testi, fiziksel ve kimyasal etkenlerin hücrelerde oluşturduğu genotoksisitenin belirlenmesinde, bazı ilaçların piyasaya sürülmeden önce güvenilirliğinin araştırılmasında ve kanser tanısının konulması ile takibinde yaygın olarak kullanılmaktadır (221).

2.9.1 İn Vitro Kan Testleri

TS EN ISO 10993-1'e göre kan etkileşim deneyleri için hemolitik etki testi ve pıhtılaşma faktörü testlerinin yapılması gerekmektedir. Hemoliz testi için ASTM F756-17 standartartı kullanılırken, pıhtılaşma faktör testleri için ELİSA yöntemi ile pıhtılaşma faktörü olan antikorlar kullanılarak test edilmesi yöntemi kullanılmaktadır.

2.9.1.1 Hemolitik Etki Testi Mekanizması

Tıbbi cihaz, malzeme ya da ilce üretiminden sonra ilgili malzemenin kullanılması hedeflenen bölgeye göre birtakım testlere tabii tutulması gerekmektedir. Sentezlenen malzeme kan ile temas eden cihazlarda (rnein; vazkler protezler gibi) kullanılan materyalin, güvenliğini sağlamak için kan ile uyumluluunun değerlendirilmesi gerekmektedir. Sağlam cilt ve/veya mukoza ile temas eden malzemeler dışındaki tüm cihaz ve cihaz malzemeleri için hemoliz testinin yapılması gerekmektedir. Kanla etkileşim deneyleri, kan veya kanın herhangi bir bileşeni ile test materyali arasında olan kan, doku veya organları etkileyen etkileşimlerini incelemektir. Testin genel prensibi alyuvarların materyale maruz kaldıklarında oluşan hasarın llmesine

dayanmaktadır. Uygulanan test yöntemi, “TS EN ISO 10993-4 Tıbbi cihazların biyolojik değerlendirilmesi- Bölüm 4: Kan ile etkileşim deneylerinin seçimi” standarttır. Standartta belirtilen test kabul kriterlerini sağlaması gerekmektedir. Standartın atıf yaptığı ASTM F756-17 bu test sisteminde uygulanmıştır. Deney Sonuçları, ölçülen hemolitik indeks düzeylerine göre yapılmaktadır. Standartta hemolitik indeks düzeyi %5 ve/veya daha büyük olması durumunda hemolitik olarak kabul edilmektedir.

Hemoliz; kırmızı kan hücrelerinin (alyuvarların) parçalanması ile hücre içi içeriğin hücre dışına salımı olarak adlandırılmaktadır. İn vivo ve in vitro hemoliz oluşum sebebi olarak ikiye ayrılmaktadır (222). İn vitro hemoliz kanın bireyden alınmasını takiben ortaya çıkan sebeplerden oluşurken laboratuvarlarda karşılaşılan hemoliz olaylarının %2-3’ünü kapsayan in vivo hemoliz; kalıtsal, kazanılmış ve iyatrojenik durumlar dahil, elliden fazla nedenle ortaya çıkabilir. in vivo hemoliz nedenleri olarak; metabolik bozukluklar (otoimmün hastalık, hemolitik anemi, hemoglobinopati, enzim defekti, karaciğer hastalıkları), transfüzyon reaksiyonları, yanıklar, ağır enfeksiyonlar ve sepsis, kimyasal (ilaç) ve fiziksel (mekanik kalp kapakçıkları) ajanlar ya da tedavi süreçleri sayılabilir (223,224). Hasta ya da sağlıklı bir bireye uygulanacak olan ilaç, tıbbi yöntem ve girişimlerde kullanılan malzemeler hemolize sebebiyet verebilmektedir. Bireyde hemoliz oluşması durumunda, demir iyonları kan damarları için zararlı ve güçlü oksidatif reaksiyonlar göstermektedir (225,226).

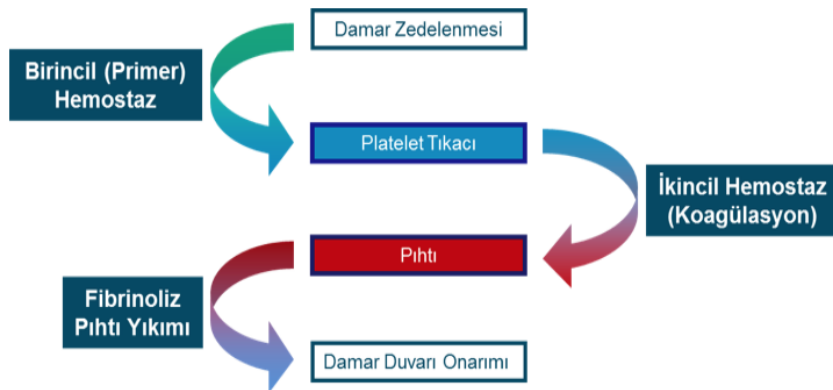
2.9.2 Pıhtılaşma Faktörleri ile Diğer İn Vitro Kan Testleri

Temel olarak hemostatik sistemin işleyişini bilmek, koagülasyon ile ilgili yapılan testlerin doğru yorumlanması için önemlidir. Vücudun normal işleyişinde, trombositler ve koagülasyon faktörleri inaktif durumdadır ve kan damar içinde serbest olarak akmaktadır. Vasküler bir hasar meydana geldiğinde hemostatik sistem aktive olmaktadır. Hemostaz; kendiliğinden olabilecek bir kanamayı önleyen veya herhangi bir nedenle başlayan süreçlerin tümü olarak adlandırılmaktadır. Genel olarak hemostaz; kanamanın durdurulmasıdır. İnflamasyon; iltihaplanma olarak da bilinmektedir. Dokuların hemen hepsi kan damarları ile beslenmektedir ve canlı, cansız yabancı etken maddeler veya içsel/dokusal hasarına verilen fizyolojik yanıtların bütünü inflamasyon olarak adlandırılmaktadır. Maturasyon; yara iyileşmesinde hücre çoğalması safhasından sonra meydana gelen ve yaranın olgunlaşıp işlevsel duruma geçmiş olması durumudur (227,228).

Vücutun herhangi bir bölgesinde meydana gelebilecek ve üretral darlık hastalarında ameliyat sonrası ya da ilaç uygulaması sonrasında oluşabilecek yara iyileşmesinde; hemostaz, enflamasyon, proliferasyon ve maturasyon fazları bulunmaktadır. Gerçekleşen bu fazların tümü de hastanın yaşam kalitesini, iyileşme ve tedaviye yanıt verme süresini etkilenmektedir. Sağlıklı bir bireyde yaralanan endotele yapışan trombosit sayısı ve büyüme faktörlerinin salınımı sabittir. Artan yaş, tedavide uygulanan kimyasal ajanlar ve yardımcı ekipmanları; yapışan trombosit sayısını, büyüme faktörlerinin salınımını, nötrofil, trombin, Beta-tromboglobulin(βTG4) ve kanın pıhtılaşmasında önemli rolü olan hücre pulcukları (platelet) sayısında ve damarlara yapışma kapasitelerinde artışa neden olabilmektedir (229-231)

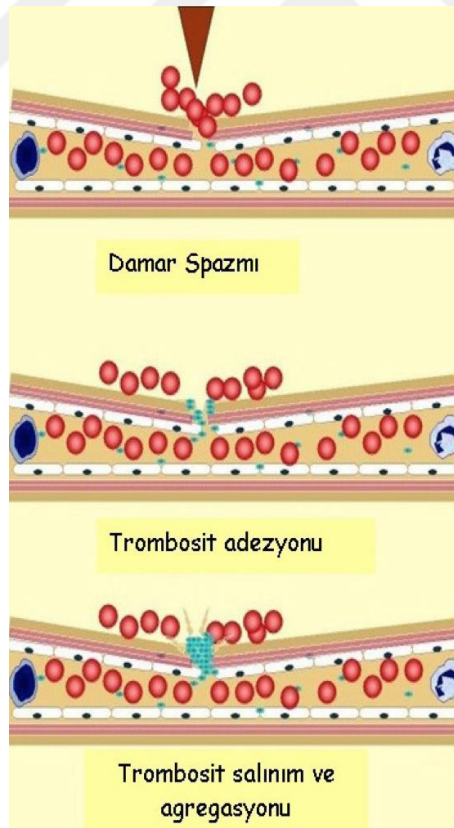
Sağlıklı bir bireyde kan damarları içinde trombositler ve koagülasyon faktörleri inaktif durumdadırlar. Kan damarlarında herhangi bir travma yaralanma meydana geldiğinde koagülasyon sisteminde hareketlilik başlar ve çeşitli reaksiyonlara yol açarak kan pıhtısı oluşumu başlar. Gerçekleşen bu mekanizma ile yara bölgesi tamir edilir fakat damar duvarının bütünlüğünü tekrar sağlamak için pıhtı fibrinolitik (kan pıhtıların çözülmesi) yola gereksinim duyulmaktadır (232).

Hemostaz mekanizması primer ve sekonder olmak üzere ikiye ayrılmaktadır (233). Primer ve sekonder hemostatik sistem vücutta herhangi bir damar hasarı oluştuğunda aktifleşir (234). (Şekil) Genel olarak hemostaz; cerrahi operasyon, travma, sepsis ve damar endotelinin yol açan hastalıklar sonucu açığa çıkan ve cilt altı bağ dokusuna kan hücrelerinin teması sonrası başlamaktadır (233).



Şekil 0.1 Hemostatik Sistem (235)

Primer hemostaz; vazospazm (damar kasılması, fizyopatolojik bir olaydır), trombosit adezyonu (trombositlerin yapışması), trombosit aktivasyonu ve trombosit agregasyonu (trombositlerin birbiri üzerine kümelenmesi) sonucu oluşan trombosit durdurucudur. Damar hasarını takiben saniyeler içinde trombositlerin ve endotel hücrelerinin aktivasyonu sonucu primer hemostatik tıkaç meydana gelmektedir. Böylece trombositler hasarlı bölgeye gelerek, adezyon, sekresyon (granül içeriklerini ortama salgılama) ve agregasyon fonksiyonlarını yerine getirebilirler. İlgili bölgeye gelen trombositler subendotelyal bölgedeki kolajen direkt olarak çeşitli yollar ile yapışırlar. Ardından diğer trombositlerin aktifleşmesi için trombositler içlerindeki granülleri salgılamaya başlarlar. Primer hemostatik tıkaç oluşması için aktifleşen trombositlerin glikoprotein reseptörleri ve fibrinojen aracılığı ile kümeleşme oluşturması gereklidir (şekil 3) hasar ciddi değil ve bireyde herhangi bir faktör eksikliği bulunmuyorsa kanamanın durması için primer hemostatik tıkaç hasarın giderilmesi ve kanamanın durması için yeterli olmaktadır aksi takdirde sekonder hemostaz aktive olup kanamayı durdurmakta görev alır (233,234).



Şekil 0.2 Primer Hemostaz (236)

İnflamasyon süreci nötrofiller, lenfositler, makrofajlar, trombositler gibi hücrelerin ve interlökinler(lenfositler tarafından lenfositlerince ekspresse edilen sitokinlerin bir grubudur), kompleman sistemi (canlıdan patojenlerin temizlenmesi süreci), prostoglandinler (lipid benzeri yapılardır, yangı oluşumunda, kas kasılmalarında ve kan basıncının ayarlanmasında görevleri vardır), kemokinler (lökositleri inflamasyon alanına yönlendirerek kemotakside yer alan bir sitokin) gibi inflamatuvar aracılarının yer aldığı kompleks bir süreçtir (237). Sistemik inflamasyonlarda CRP (C-reaktif protein), sedimentasyon(alyuvarların çökmesi), koagülasyon (TAT, FPA), trombosit aktivasyonu(β TG, PF4), prokalsitonin ve kompleman aktivasyonu gibi inflamatuvar belirteçlerin düzeyinde artış gözlenmektedir. Bu belirteçlere ek olarak son yıllarda nötrofil/lenfosit oranı (NLO), trombosit / lenfosit oranı (TLO) ve ortalama trombosit hacminin de sistemik inflamasyonun belirteçleri olarak kullanılmaktadır.

Tıbbi cihazların geliştirilmesi, akıllı ilaç modellerinin oluşturulması, yeni ilaç geliştirme çalışmaları, kontrollü salımı olan ilaçlar ve biyomalzemelerin biyoyumluluklarının değerlendirilmesinde vücutta herhangi bir inflamasyon oluşturmaması, kan-damar yapısında bozunma meydana gelmemesi ve hedef hastalık dışındaki protein ve yardımcı elamanların yapısında ve miktarında bir değişiklik olmaması istenmektedir. Bu sebeple TS EN ISO 10993-4 kan testleri için in vitro koşullarda yapılabilecek bir takım testlerin önerisinde bulunmuştur (standart referans). ISO rehberliğinde; koagülasyon (pıhtılaşma) için TAT ve FPA, Trombosit aktivasyonu için β TG4 ve PF4, kompleman aktivasyonu için c3a ve SC5b9 miktarlarının insan kanında ELİSA yöntemi ile çalışılması uygun görülmüştür. Ayrıca standartta, hazırlanan test materyalinin kan ile etkileşimi sonucunda bu proteinlerin seviyelerinde artışa neden olmaması istenmekte ve bu durumda kullanım açısından uygun olacağı belirtilmektedir.

✓ **Platelet Faktör 4 (PF-4)**

Trombositler, çeşitli mekanizmalar yoluyla inflamatuvar reaksiyonların aracıları olarak bilinmektedir. İnflamasyon durumunda trombosit adezyonu, agregasyonu ve salınımı hakkında birçok çalışma bulunmakta ve TS EN ISO 10993-4'de bu mekanizmaların bir belirteci olarak Trombosit Faktörü 4(PF4)'ün kullanılması uygun görülmüştür (223,224, ISO STANDARTI). İnsan serumunda bulunan konsantrasyonlarda trombosit faktör 4'ün insan nötrofilleri ve insan monositleri için in vitro kemotaktik (nötrofil lökositleri yaralanma bölgesine çekmesi) aktiviteye sahiptir (238).

PF 4, düşük iyonik kuvvetli solüsyonlarda çözünmeyen, ancak yüksek iyonik kuvvetli solüsyonlarda ve asidik tamponlarda çözünen nispeten küçük, ısıya dayanıklı bir proteindir(239). Trombosit faktörü 4, heparin tarafından yer değiştirdiği bir taşıyıcı proteoglikan molekülü ile salınır ve ona bağlanır (240,241). Trombosit faktör 4'ün arteriyel ve venöz trombozla olası ilişkisinden dolayı (242,243) bu faktörün normal pıhtılaşmada rolü olduğu bilinmektedir (244,245). Pıhtılaşmadaki en temel rolü; polimorfonükleer hücrelerin uyarılmamış vasküler endotelyuma yapışmasını indükleyerek, bazofillerden histamin salınımını indüklemesi ve eozinofillerin vasküler duvarlara yapışmasını uyarmaktır (245,246).

Trombositlerin kan damarlarında oluşan hasarlı bölgesinde yapıştığında salgılanan ve güçlü bir heparin bağlayıcı protein olan PF4'ün fazla salınması durumunda akciğer kistik fibrozunu arttırdığı tespit edilmiştir (247). Ayrıca fibrotik akciğer hastalığının bir belirtisi olarak da PF4 ün rol aldığı düşünülmektedir(248). Kronik inflamatuvar bir akciğer hastalığı olan ve fibrozis seviyesinde artış gösteren pulmoner fibrozisli farelerde yapılan çalışmada PF4 seviyesindeki azalma ile pulmoner fibrozun azalması arasında bir ilişki bulunduğu gösterilmiştir (249). Üretral darlık hastalarının kanlarında PF4 ile ilgili yapılmış herhangi bir çalışma bulunmamakla birlikte fibrotik kökenli olan darlıkta bu faktörün artışının ilişkili olabileceği düşünülmektedir. Hazırlanan mikrokürelerin kanda PF4 seviyesinde bir artışa sebep olması durumunda fibrozisi arttırması olasıdır.

✓ **Nötrofil/Elastaz (NE/ELA2)**

Nötrofiller doğal bağışıklık sisteminde akut inflamasyonun temel hücreleridir (250). İnflamasyon anında vücutta inflamatuvar sitokinler, nötrofil kemotaksisi devreye girer ve nötrofil sayısında artış olmaktadır (251,252). Ayrıca fizyolojik stres durumunda endojen kortizol seviyesi artışına bağlı olarak nötrofil sayısı artışı görülmektedir. Nötrofillerden pasif veya aktif olarak salgılanan elastaz, idiyopatik pulmoner fibroz, romatoid artrit, yetişkin solunum sıkıntısı sendromu ve kistik fibroz dahil olmak üzere çeşitli inflamatuvar hastalıkların patolojik süreçleriyle bağlantılıdır.

✓ **Beta Thromboglobulin (BTG)**

Beta- tromboglobulin (BTG), trombositlerin aktive olmasıyla dolaşıma katılan, trombositlere özgül bir proteindir. Fibroblastlar için güçlü ve nötrofiller için zayıf bir kemoatraktandır. İnsan fibroblastlarında mitojenez, hücre dışı matris sentezi, glikoz

metabolizması ve plazminojen aktivatör sentezinin uyarıcısıdır. Beta-tromboglobulin ayrıca megakaryosit olgunlaşmasını etkiler ve böylece trombosit üretiminin düzenlenmesine yardımcı olur. Birçok hastalığın temelinde β TG artışı yüksek bulunmaktadır (periferik damar hastalığı, kronik böbrek yetmezliği gibi). Periferik damar hastalığı, derin ven trombozu, yapay kalp kapakları olanlarda, damar komplikasyonlu diabetiklerde ve kronik böbrek yetmezliğinde BTG düzeyleri yüksek bulunmuştur. Platelet agregasyonun göstergesi olarak PF4 ile birlikte artışı gözlemlenmektedir (253,254). Beta-Tromboglobulin seviyeleri, trombosit aktivasyonunu indekslemek için kullanılır (255).

✓ **Trombin-Antitrombin Kompleksi (TAT)**

Kanda trombin ortaya çıkışını gösteren belirteç olarak geçen trombin-antitrombin kompleksi (TAT) aynı zamanda hiperkoagülasyon etkisi göstermektedir. TS EN ISO 10993:4' de insan vücudunda kullanılacak ve kan ile temas edecek malzeme ve ilaçlar için bu belirtecin ELİSA yöntemi ile çalışılması tavsiye edilmiştir. Hemostatik sistemde rolü olan ve artışı birçok hastalık için belirteç olarak kabul gören TAT; kanda normal seviyenin üzerine çıktığında belirgin kan pıhtılaşması gözlemlenmektedir.

✓ **Fibrinopeptit A (FPA)**

Hemostatik sistemde; trombin fibrinojenden fibrinopeptit-A oluşturarak fibrinojeni parçalar ve esas reseptöre bağlanarak çözünmeyen trombin-antitrombin kompleksini oluşturur. FPA'nın varlığı ya da artış göstermesi TAT için de bir göstergedir. Rol aldığı hastalıkların tedavisinin etkinliğinin izlenmesi açısından da önem arz etmektedir.

2.10 Literatür Özeti/ Literatürde Üretral Darlık ve Kaempferol ile Yapılmış Çalışmalar

Kassably ve ark., genital derinin yetersiz olduğu üretra darlığı olan hastalarda üretral rekonstrüksiyon için alternatif dokulara ihtiyaç olduğunu ve yetersizliğin onarımı için serbest greft ikamesi olarak mesane submukoza kolajen bazlı inert matris kullanmanın uygulanabilirliğini araştırmışlardır. Bu sebeple hazırladıkları kolajen bazlı inert matriksini üretra darlığı tanısı alan toplam 28 hastaya üretral onarım için kullanmışlar ve bunu rekonstrüktif cerrahi yöntemiyle uygulamışlardır. İnert kolajen matrisi, her

hasta için ihtiyaç duyulacak boyutta kesilerek hastalara uygulanmış ve hastaların 24'ünde başarılı sonuç elde etmişlerdir. Ancak kontrolden bir yıl sonrasında hastalardan bir tanesinde subkronal fistül gelişmiştir. Tedavi uygulamasından 1 yıl kadar sonra biyopsi örnekleri incelendiğinde tipik üretra tabakalı epiteli göstermiştir (256).

Ayyıldız ve ark., aşırı kolajen artışı patogenezi gösteren üretra darlığı oluşturulmuş sıçanlarda topikal uygulamasının fibroblast proliferasyonunu inhibe ettiği ve skar oluşumunu önlemede etkili olduğu kabul edilen Mitomisin-C'nin (MMC) uygulaması yapmışlardır. Yaptıkları çalışmada deneysel sıçan modelinde düşük dozda MMC kullanımının skar oluşumu ve fibrozis üzerindeki intraüretral etkisini gözlemlemişlerdir. Bu deney sistemi için üretra yaralanmalarını iç üretrotomi bıçağı ile yapmışlar, çalışmada 35 yetişkin erkek Wistar albino sıçanı kullanmışlardır. Deney sistemi için; ilk grup kontrol grubu, ikinci grup 2 mg/L MMC uygulanan sıçan grubu ve üçüncü grup olarak 10 mg/L MMC uygulanan sıçan grubu yer almıştır. Deneyin uygulanma şekli ise; yaralanan üretraya irrigasyon (yıkama) şeklinde 5 dk belirlenen dozlarda mitomisin-C uygulanmış, kronik inflamasyon ve fibrozisin değerlendirilmesi için 14 gün sonunda ratlar sakrifiye edilmiş ve penisleri hematoksilin-eozin ve Masson trikrom boyaları ile ışık mikroskopunda histopatolojik olarak incelenmiştir. Yapılan testler sonlandığında MMC uygulanan sıçan gruplarında kontrol grubuna göre anlamlı sonuçlar elde etmişler, MMC'nin doz uygulamaları arasında anlamlı bir fark bulamamışlardır. Ancak uygulanan dozun yüksek olmasının toksik olduğunu da çalışmalarında belirtmişlerdir. MMC ile üretral darlık tedavisinde ilacın tekrarlı aralıklarda uygulanması gerekmektedir. Bu sebeple skar oluşumuna engel olsa da uygulama noktasında hasta ve hekim açısından avantaj sağlamamakta ve maliyet yükü oluşturmaktadır.

Chong ve ark., hepatik fibroz, akciğer fibrozu, renal fibroz ve subglottik fibrozu inhibe ettiği bilinen rapamisin; üretra darlığında rolü olan fibrozis ile ilişkisinden dolayı tedavi amaçlı üretral darlık oluşturduğu tavşanlarda test etmişlerdir. Deney sistemi için üretra darlığını Yeni Zelanda erkek tavşanlarında oluşturmuş, rastgele dört gruba ayırmışlardır: birinci grup yüksek doz rapamisin (RH), ikinci grup düşük doz rapamisin (RL), üçüncü grup tek başına dimetil sülfoksit (DMSO) (DMSO, solvent kontrolü) ve dördüncü grup normal salin (NS) olarak ayırmışlardır. Yaptıkları çalışmada değerlendirme yöntemi olarak; üretral darlık retrograd üretrogram ve video-

üretroskopiye kullanmışlardır. Ayrıca üretra patolojisi hematoksin ve eozin ve Sirius kırmızısı boyama ile değerlendirilmiştir. Tedavi 28 gün sürmüş ve günlük olarak ilaç ile yıkama işlemi yapılmıştır. Tedaviden sonra, rapamisin grupları (RH ve RL) ve kontrol grupları (DMSO ve NS) karşılaştırılmış ve rapamisin gruplarında önemli ölçüde darlık alanında azalma olduğunu ayrıca kontrol gruplarında kolajende artış gözlemlenirken ramasinin uygulandığı gruplarda artış tespit edememişlerdir (258).

Üroloji cerrahisinde üretral darlık için her yıl yeni ilaç ve yöntemler denese de hastalarda darlığın tekrarlıyor olması kliniğin en büyük problemlerindendir. 2020 yılında yapılan bir çalışmada doku mühendisliği yöntemleriyle üretral darlık tedavi girişiminde bulunulmuştur. Bu çalışmada, tekrarlanabilir bir üretral yaralanma hayvan modeli geliştirilmiş ve biyolojik olarak parçalanabilen ilaç kaplı üretral stentin üretral yaralanma sonrası üretral darlık oluşumunu sınırlamadaki rolü değerlendirilmiştir. Deney grubu olarak paklitaksel salımı olan, biyolojik olarak parçalanabilen stent uygulanmış bir grup ve uçtan uca anastomoz tedavisi uygulanacak bir grup oluşturmuşlardır. 12. Haftaya kadar grupların takibini yapmışlar ve paklitaksel uygulanan hayvanlarda tedavi sonunda üretral darlık bulgusu saptamamışlardır. Stent uygulanmayan gruplarda histolojik takipte inflamatuvar reaksiyonları ve fibrozis oluşumunun paklitaksel stent uygulanan gruplardan daha fazla olduğu ama paklitaksel uygulanan gruplarda da bulunduğunu bildirmişlerdir, uygulamanın üretral yaralanmalardan sonra tedavi etmese de üretral darlık oluşumunu sınırlayabileceğini ifade etmişlerdir (259).

Fu ve ark. 2014 yılında yaptıkları çalışmada koroner arter üzerindeki restenoz önleyici etkisi bulunan paklitakselin dayanarak yarı sentetik bir analogu olan dosetakselin üretral darlık oluşumunu sınırlamadaki rolünü araştırmışlardır. Tavşan denekler üzerinde yaptıkları çalışmada birinci grup olarak yüksek doz dosetaksel (DH, 0.1 mg/gün), ikinci grup olarak düşük doz dosetaksel (DL, 0.01 mg/gün) ve üçüncü grup olarak da kontrol gruplarından oluşan deney sistemi kurmuşlar ve 28 gün boyunca ve sürekli olarak üretral irrigasyon olarak uygulama işlemini yapmışlardır. Yüksek dozda uygulanan doketakselin diğer gruplardan daha başarılı sonuçlar gösterdiğini ve kolajen sentezinin azalsa da devam ettiğini bildirmişler ve uygulamanın üretral yaralanmalardan sonra tedavi etmese de üretral darlık oluşumunu sınırlayabileceğini ifade etmişlerdir (60).



3. MATERİYAL VE YÖNTEM

3.1 Kullanılan Cihazlar ve Kimyasallar

3.1.1 Cihazlar

Rotary Evaporatör (Heidolph 4000), İnverted mikroskop (Leica, Germany), Laminar flow kabin (ESCO, USA), Qubit (Invitrogen, USA), Tam otomatik Rotary Mikrotom (Leica-RM2255), CO2 inkübatör (Binder, Germany), Hücre sayım cihazı (Invitrogen, USA), xCELLigence RTCA- Gerçek Zamanlı Hücre Analiz Sistemi (Roche, Germany), Elisa okuyucu (BIOTEK, USA), Sogutmalı Santrifüj (Hettich ROTINA380R), Otoklav (Hirayama). Işık mikroskobu (Zeiss- Primostar), hassas terazi (Mettler toledo), Mikropipet (ependorf), Isıtıcıli manyetik karıştırıcı (Heidolph-MRHei). Etüv (BINDER), Lam Kurutma Cihazı (Leica-HI1220), Floresan Ataçmanlı Araştırma Mikroskobu Leica, Germany), Saf su cihazı (Purelab Option R15), Rotary Evaporatör (Heidolph 4000), Isıtıcıli manyetik karıştırıcı (IKA C-Mag H58), Vortex (Heidolph-Reax top), doku takibi cihazı (Leica), doku gömme cihazı (Leica), Mikrotom bıçağı (Shandon MB35), su banyosu, Buzdolabı (Beko-9621), pH-metre (mettler toledo), vortex(Heidolph), düdüklü tencere(hisar), fotoğraf makinesi, laminar flow kabin (ESCO class II BSC Laminar Flow Cabinet,Labor İldam, Türkiye), santrifüj (Nüve, SF-400), inverted mikroskop (Leica DM6000B, İsveç), Elisa plate okuyucu (BİOTEK GEN5 Elisa Reader PowerWave XS2), karbondioksitli etüv (Binder CB150, hemositometri (İnvitrogen,Countess), hassas terazi (Mettler toledo MS204), ısıtıcıli manyetik tabla (IKA C-MAG HS 7), -80 °C derin dondurucu (GFL6485)

3.1.2 Kimyasallar ve malzemeler

Dulbecco's Modified Eagles Medium (DMEM,Biological Industries,İsrail), Fetal bovin serum(FBS,Biological industries,İsrail), Penicillin-streptomycin (antibiyotik, Biological Industries,İsrail), Penicillin-streptomycin-amphotericin (antibiyotik, Biological Industries,İsrail), Trypsin-EDTA Solution C in PBS(Biological

Industries,İsrail), WST-1 (Roche, Almanya), MTT (Serva, İsrail), Ribonükleaz A , Propidium Iodide,, Hoechst 6,12,48,96 well plate (Corning), 25 cm² ve 75 cm² lik hücre kültürü flaskı (Corning), 15 mL, 50 mL falkon tüp (Corning), Mikropipet(20µm-100µm-1000µm Scaltec, Almanya), Disposable pipet (2ml,5ml,10ml, Corning), Etanol (Merck, Almanya), PBS (fosfat buffer saline) (Sigma, ABD), Aljnik asit (Sigma, ABD), Kalsiyum klorür (Sigma, ABD), Serum fizyolojik , Toluidine blue (Bio Optica), Sodyum klorür (Amresco, İsrail), Dimetil metilen mavisi (sigma, ABD), Sodyum fosfat, EDTA (Amresco, İsrail), EDTA (Amresco, İsrail), Primer antikor (fibronektin) (Roche, Almanya) , Magnezyum sülfat (MgSO₄.7H₂O), Sitrik asit monohidrat, Potasyum fosfat, dibazik (susuz) (K₂HPO₄), Sodyum amonyum fosfat (NaH₂PO₄.4 H₂O), D (+) Glukoz monohydrate, L-Histidin.monohydrate (Sigma H-8125), D-Biyotin (Thermo scientific, 29129 cas: 58-85-5), NaOH, Ampisilin trihidrat, HCl, Tetrasiklin, Kristal Viyole, Nutrient broth No:2 (Oxoid) CM0067 veya (Merck) 1.05443.0500, Agar bacteriological agar no:1 (Oxoid) LP0011 veya (Conda pronadisa) 1802-00, NaCl, Sodyum fosfat, monobazik (NaH₂PO₄.H₂O), Sodyum fosfat, dibazik (Na₂HPO₄.H₂O), Magnezyum klorür (MgCl₂. 6H₂O), NADP (nicotine adenine dinucleotide phosphate), Glukoz-6-fosfat, S9 fraksiyonu (liver, pooled), 9-aminoakridin, 2-nitrofloren, Sodyum azid, Mitomisin-C, 2-aminoantrasen, TBS buffer (Santa Cruz), %30' luk H₂O₂ Solusyonu (Sigma), Ksilol (Merck), Etanol (Merck), Metanol (Merck), Sodyum Sitrat (Sigma), Sitrik Asit (Sigma), Protein Blokajı (Normal Swine Serum, Normal Goat Serum) (Santa Cruz), ABC HRP (Avidin Biotin Complex Horse Radish Peroxidase) (Santa Cruz), Hematoksilen (Merck), DAB (Diamino benzidin) (Santa Cruz), Eosin Y (Merck), Masson Trikrom, Kollajen tip I (Abcam-ab6586, USA), Kollajen tip IV (Abcam- ab34710, USA), Mezür, beher, erlenmayer, balon joje (isolab), %3'lük H₂O₂ (Hidrojen Peroksit) (Boster).

3.2 Deneyisel Çalışmalarda Kullanılan Çözeltiler ve Solüsyonların Hazırlanışı

3.2.1 Besiyeri Hazırlanması

%89 Dulbecco's Modified Eagles Medium/F-12 (DMEM/F-12)

%10 Fetal bovin serum

%1 Penicillin-Streptomycin ya da primer kültür için hazırlanan örnekler için; %1 Penicilin-Streptomycin-amphotericin

3.2.2 Double Staining Çalışma Solüsyonunun Hazırlanması

Ribonükleaz A'dan 1 mL PBS'de 10 mg RNA olacak şekilde hazırlandı. Hoechst ise 1 mL PBS'de 200 mikrogram olacak şekilde hazırlandı. Propidium Iodide 1 mL PBS'de 100 mikrogram olacak şekilde hazırlandı. Solüsyonlar kullanılana kadar – 20 °C'de saklandı. Çalışma solüsyonunun hazırlanışı:

10 mL PBS içine RNAaz stoktan 100 mikrolitre Hoechst stoktan 500 µl Propidium Iodide stoktan 100 mikrolitre ilave edilerek hazırlandı.

3.2.3 MTT Çalışma Solüsyonunun Hazırlanması

5mg MTT, 1ml PBS içerisinde çözdürüldü.

0,2µ'luk filtreden geçirildi.

Solüsyon kullanılana kadar +4°C de karanlıkta saklandı, etrafı alüminyum folyo ile sarılarak ışık geçirmesi engellendi.

3.2.4 Aljinat Çözeltisinin Hazırlanması

20 mL serum fizyolojik içerisinde 0,4 g aljinat tozu çözdürüldü.

Isıtcılı manyetik tabla üzerinde homojen bir karışım elde edene kadar manyetik balık yardımıyla bir gece karıştırıldı.

Hazırlanan %2'lik çözelti UV de yarım saat bekletilerek sterilizasyonu yapıldı.

3.2.5 Hyaluronik Asit Çözeltisinin Hazırlanması

10mL serum fizyolojik içerisinde 0,2 g hyaluronik asit tozu çözdürüldü.

Isıtcılı manyetik tabla üzerinde homojen bir karışım elde edene kadar manyetik balık yardımıyla bir gece karıştırıldı.

Hazırlanan %2'lik çözelti UV de yarım saat bekletilerek sterilizasyonu yapıldı.

3.2.6 Hyaluronik Asit-Aljinat Çözeltisinin Hazırlanması

Hazırlanmış olan 10 mL aljinat ve 10 mL hyaluronik asit çözeltisi temiz bir beherde karıştırıldı.

3.2.7 Çapraz Bağlayıcı Çözeltisinin Hazırlanması

100 mL serum fizyolojik içerisinde 5g CaCl₂ çözündürüldü.

Isıticılı manyetik tabla üzerinde homojen bir karışım elde edilene kadar manyetik balık yardımıyla karıştırıldı.

Hazırlanan %5'lik çözeltinin UV de yarım saat bekletilmesi ve 0.2 µm lik filtreden geçirilmesi ile sterilizasyonu yapıldı.

3.2.8 H₂O₂ Blokajı Solüsyonu Hazırlanışı

30 mL %30'luk H₂O₂ üzerine 470 mL metanol ilave edilerek hazırlandı.

3.2.9 Antijen Retrival Solüsyonunun Hazırlanışı

M, pH: 6.0): 2.101 gr sitrik asit (A) 100 mL distile suda; 0.1 M 14.7 gr sodyum sitrat (B) 500 mL distile suda çözöldü. 27 mL A solüsyonundan, 123 mL B solüsyonundan alınarak 1500 mL'ye distile su ile tamamlandı.

3.2.10 0.005 M Tris Tamponunun Hazırlanışı

60.55 gr tris base, 85.20 gr NaCl 500 mL distile suda çözölür. 370 mL 1 M HCl eklenerek pH: 7.6'ya getirilip 1 lt'ye tamamlanır. (1 mL TBS 100 mL distile suyla dilüe edilerek kullanılır.)

3.2.11 Drabkin Solüsyonu Hazırlanışı

1 g sodyum bikarbonat, 0,05 g Potasyum Cyonide, 0,2 g Potasyum Ferricyonid 1L distile su içerisinde çözönmüş ve +4 °C de karanlıkta saklanmıştır.

3.2.12 Vogel-Boner (VB) Medium E (50X) Hazırlanışı

670 mL distile su içerisinde; 10 g Magnezyum Sülfat (MgSO₄.7H₂O) 100 g Sitrik asit monohidrat, 500 g potasyum sülfat (K₂HPO₄) ve 180 g sodyum amonyum fosfat (NaH₂NH₄PO₄) karıştırılmış ve otoklav ile steril edildikten sonra kullanıma hazır hale getirilmiştir.

3.2.13 %40'lık Glukoz Çözeltisi Hazırlanışı

400 g D-Glukoz 1000 mL distile su ile karıştırılmış ve otoklav ile steril hale getirildikten sonra kullanıma hazır hale getirilmiştir.

3.2.14 Histidin Çözeltisinin Hazırlanışı

500 mg histidin 100 distile su ile karıştırılır ve otoklavlanır (20 dk 121 °C).

3.2.15 Biotin Çözeltisi Hazırlanışı

10 mg biotin 100 mL distile su ile karıştırılır ve otoklav ile steril hale getirilerek hazırlanır.

3.2.16 0.02 N NaOH Çözeltisi Hazırlanışı

80 mg NaOH 100 mL distile su ile karıştırılır.

3.2.17 Ampisilin Çözeltisinin Hazırlanışı

0.8 g Ampisilin trihidrat 100 mL 0.02 N NaOH çözeltisi ile karıştırılır, steril edildikten sonra kullanıma hazır hale gelir.

3.2.18 HCl Çözeltisi Hazırlanışı

160 µl HCl 100 mL distile su ile karıştırılır ve steril hale getirilir.

3.2.19 Tetrasiklin Çözeltisi Hazırlanışı

0.8 g tetrasiklin 100 mL 0.02 N HCl çözeltisi ile karıştırılır ve steril hale getirilir.

3.2.20 Kristal Viyole Çözeltisi Hazırlanışı

10 mg kristal viyole 10 mL distile su ile karıştırılır, ışık almamasına dikkat edilir.

3.2.21 Minimal Glukoz Agarlı (MGA) Besi Yeri Hazırlanışı

1000 mL distile su içerisine; 50 mL %40 glukoz çözeltisi, 20 mL 50X VB ve 15 g bakto agar ile karıştırılır ve otoklav ile steril hale getirilir ardından sıcaklığı 45-50 °C iken 90 mm plaklar içerisine 30 mL olacak şekilde dökülür ve soğumaya bırakılır. Plaklar soğuduktan sonra 1 gece 37 °C’de sterilite kontrolü için etüvde bekletilir herhangi bir üreme yok ise deney için kullanılabilir. Genetik işaretlerin kontrolü için yapılan testlerde (His-), kendiliğinden geri dönen koloni sayılarının saptanması deneylerinde ve mutajenite deneylerinde kullanılmaktadır.

3.2.22 MGA + Histidin (H) Besi Yeri Hazırlanışı

1000 mL distile su içerisine; 50 mL %40 glukoz çözeltisi, 20 mL 50X VB, 15 g bakto agar ve 10 mL histidin HCl çözeltisi ile karıştırılır, otoklav ile steril hale getirilir ardından sıcaklığı 45-50 °C iken 90 mm plaklar içerisine 30 mL olacak şekilde dökülür ve soğumaya bırakılır. Plaklar soğuduktan sonra 1 gece 37 °C’de sterilite kontrolü için etüvde bekletilir herhangi bir üreme yok ise deney için kullanılabilir. Genetik işaretlerin kontrolü için yapılan testlerde kullanılmaktadır.

3.2.23 MGA + Biotin (B) Besi Yeri Hazırlanışı

1000 mL distile su içerisine; 50 mL %40 glukoz çözeltisi, 20 mL 50X VB, 15 g bakto agar ve 6 mL biyotin çözeltisi ile karıştırılır, otoklav ile steril hale getirilir ardından sıcaklığı 45-50 °C iken 90 mm plaklar içerisine 30 mL olacak şekilde dökülür ve soğumaya bırakılır. Plaklar soğuduktan sonra 1 gece 37 °C’de sterilite kontrolü için etüvde bekletilir herhangi bir üreme yok ise deney için kullanılabilir. Genetik işaretlerin kontrolü için yapılan testlerde kullanılmaktadır.

3.2.24 MGA + Histidin + Biotin (HB) Besi Yeri Hazırlanışı

1000 mL distile su içerisine; 50 mL %40 glukoz çözeltisi, 20 mL 50X VB, 15 g bakto agar, 6 mL biyotin ve 10 mL histidin HCl çözeltisi ile karıştırılır, otoklav ile steril hale getirilir ardından sıcaklığı 45-50 °C iken 90 mm plaklar içerisine 30 mL olacak şekilde dökülür ve soğumaya bırakılır. Plaklar soğuduktan sonra 1 gece 37 °C’de sterilite kontrolü için etüvde bekletilir herhangi bir üreme yok ise deney için kullanılabilir. Genetik işaretlerin kontrolü için yapılan testlerde (his gereksinimi) ve R faktörü içermeyen suşlar için master plak hazırlamada kullanılmaktadır.

3.2.25 MGA + Histidin + Biyotin + Ampisilin (HBA) Besi Yeri Hazırlanışı

1000 mL distile su içerisine; 50 mL %40 glukoz çözeltisi, 20 mL 50X VB, 15 g bakto agar, 6 mL biyotin, 10 mL histidin HCl çözeltisi ve 3 mL ampisilin çözeltisi ile karıştırılır, otoklav ile steril hale getirilir ardından sıcaklığı 45-50 °C iken 90 mm plaklar içerisine 30 mL olacak şekilde dökülür ve soğumaya bırakılır. Plaklar soğuduktan sonra 1 gece 37 °C’de sterilite kontrolü için etüvde bekletilir herhangi bir üreme yok ise deney için kullanılabilir. Genetik işaretlerin kontrolü için yapılan testlerde (amp^r) kullanılmaktadır.

3.2.26 MGA + Histidin + Biyotin + Ampisilin + Tetrasiklin (HBAT) Besi Yeri

Hazırlanışı

1000 mL distile su içerisine; 50 mL %40 glukoz çözeltisi, 20 mL 50X VB, 15 g bacto agar, 6 mL biyotin, 10 mL histidin HCl çözeltisi, 3 mL ampisilin çözeltisi ve 0.25 mL tetrasiklin çözeltisi ile karıştırılır, otoklav ile steril hale getirilir ardından sıcaklığı 45-50 °C iken 90 mm plaklar içerisine 30 mL olacak şekilde dökülür ve soğumaya bırakılır. Plaklar soğuduktan sonra 1 gece 37 °C’de sterilite kontrolü için etüvde bekletilir herhangi bir üreme yok ise deney için kullanılabilir. Genetik işaretlerin kontrolü için yapılan testlerde ve pKM101 ve pKM101+pAQ1 plazmidlerini taşıyan suşların master plaklarının hazırlanmasında kullanılmaktadır.

3.2.27 Nutrient Agar Besi Yeri Hazırlanışı

1000 mL distile su içerisinde 15 g bacto agar ve 15 g nutrient broth karıştırılır otoklav ile steril hale getirilir ardından sıcaklığı 45-50 °C iken 90 mm plaklar içerisine 30 mL olacak şekilde dökülür ve soğumaya bırakılır. Plaklar soğuduktan sonra 1 gece 37 °C’de sterilite kontrolü için etüvde bekletilir herhangi bir üreme yok ise deney için kullanılabilir. Deneyde kullanılacak suşların rfa (kristal viyole testi) ve uvrB (UV testi) mutasyonlarının kontrolünde ve bakteri canlılığının belirlenmesinde kullanılmaktadır. Bakteri üretmek için kullanılan katı besi yeridir.

3.2.28 Sıvı Besi yeri (Nutrient Broth) Hazırlanışı

25 g nutrient broth 1000 mL distile su ile karıştırılır ve otoklav ile steril hale getirilir. Gecelik kültürlerin hazırlanmasında kullanılmaktadır.

3.2.29 Histidin-Biyotin çözeltisi (0.5 mM) Hazırlanışı

24 mg L-Histidin.HCl.H₂O, 30 mg D-Biyotin 250 mL distile su ile karıştırılır, otoklav ile steril edilir. Mutajenite deneyinde kullanılır. 100mL üst agara 10 mL olacak şekilde eklenir. Ortama eser miktarda histidin-biyotin eklemek, histidin oksotrofu olan bakterilerin birkaç bölünme geçirmesine olanak sağlar.

3.2.30 Üst Agar Hazırlanışı

5 g NaCl, 6 g bacto agar 1000 mL distile su ile karıştırılır ve otoklav ile steril edilir. Mutajenite deneylerinde MGA’lı plaklar üzerine ikinci bir tabaka olarak kullanılmaktadır. Kendiliğinden geri dönen suşların sayısının saptanmasında da

kullanılmaktadır.

3.2.31 Sodyum Fosfat, Monobazik Çözeltisi Çözeltisinin Hazırlanışı

2.5 g Sodyum fosfat, monobazik (NaH_2PO_4) 200 mL distile su ile karıştırılır ve otoklav ile steril hale getirilir.

3.2.32 Sodyum Fosfat, Dibazik Çözeltisinin Hazırlanışı

14 g Sodyum fosfat, dibazik (NaH_2PO_4) 1000 mL distile su ile karıştırılır ve otoklav ile steril hale getirilir.

3.2.33 Sodyum Fosfat Tamponu Hazırlanışı

60 mL sodyum fosfat monobazik çözeltisi, 440 mL sodyum fosfat dibazik çözeltisi ile karıştırılır, pH 7.4 e getirilir ve otoklavlanır. S9 içermeyen mutajenite deneyinde tampon ve S9 varlığında kofaktör olarak kullanılır.

3.2.34 Tuz Çözeltisi ($\text{KCl} + \text{MgCl}_2$) Hazırlanışı

61 g potasyum klorür, 40 g magnezyum klorür çözeltisi ile 500 mL distile su ile karıştırılır, otoklavlanır. S9 kofaktörü olarak kullanılır.

3.2.35 0.1 M NADP Çözeltisi Hazırlanışı

383 mg NADP 5 mL steril distile su ile karıştırılır, S9 kofaktörü olarak kullanılır.

3.2.36 Glukoz-6-Fosfat Çözeltisi Hazırlanışı

3 g Glukoz-6-fosfat 10 mL steril distile su ile karıştırılır, ışıktan korunması için alüminyum folyo ile sarılır. S9 kofaktörü olarak kullanılır.

3.3 Hücre Kültürü Testleri (In Vitro Testler)

3.3.1 Hücre İzolasyonu

Deney hayvanları laboratuvarında deney amaçlı kullanılan rat örneklerinden penis içerisinden katater, pens ve makas yardımı çıkartılan üretral kanal dokusu örnekleri antibiyotikli taşıma solüsyonu içeren şişelere alınarak polistiren kutularda buz kasetleri ile laboratuvara taşındı. Örnekler, laboratuvarında laminar akışlı kabinde antibiyotikli PBS ile yıkandıktan sonra petrilere ve 6 kuyucuklu plakalara yerleştirilerek, steril pens, makas ve bistüri yardımı ile dokunun önce dış kısmında

olabilecek doku parçaları uzaklaştırıldı. Örnekler yeterince temizlendikten sonra ayrı ayrı steril petri kutularına alındı.

Üretra kanalından üretra epitel hücrelerini izole etmek için kanal açılarak steril bir bistüri ile nazıkçe iç yüzeyi kazındı ve çok küçük parçalara ayrıldı. Ardından kollajenaz enzimi ile yarım saat muamele edildi ve santrifüj edilerek dipte kalan doku parçaları alındı. Daha sonra 25cm² lik flasklara koyulan parçaların üzerine 3mL medyum ilave edildi ve etüvde 37 derecede bekletildi. Ekim yapıldıktan sonra hücrelerin dökülmesini görmek için her gün mikroskop ile gözlemlendi. Hücrelerin çoğalmasına paralel olarak 48 saatte bir medyum değiştirildi. Çalışmanın tümünde hücre kültürleri 37°C de % 5 CO₂ % 95 hava içeren rutubetli ortamda genel hijyen kurallarına uyularak inkübe edildi. Yaklaşık 15. günden sonra hücreler dökülüp flaskın yüzeyini kapladıktan sonra pasajlama işlemi yapıldı.

3.3.2 Hücre Sayımı

Hücre sayımı hemositometri cihazı ile yapıldı. İnkübasyon sonrasında flask inkübatörden alındı ve steril ortamda Laminar kabin içerisinde, flask içerisindeki medyum uzaklaştırıldı ve 1 mL PBS ile yıkandı. Daha sonra 1 mL tripsin-EDTA ilave edilerek flask 3-4 dakika inkübatörde bekletildi. Tripsinli inkübasyon sonrasında mikroskopik olarak hücrelerin yapışık oldukları flask yüzeyinden ayrılıp ayrılmadıkları kontrol edildi. Hücrelerin yüzeyden ayrıldıkları mikroskopik olarak gözlemlendikten sonra, flask içerisine medyum eklenerek hücreler falkon tüpe aktarılarak 2500 rpm hızında 2 dakika santrifüj edildi. Santrifüj sonrasında süpernatant kısmı atıldı, tüpün dibinde kalan hücre pelletinin üzerine 1 mL (%10 FBS ve %1 antibiyotik içeren) DMEM/F-12 medyum ilave edildi. Pipet yardımıyla pellet ve DMEM/F-12 süspanse edildi ve süspanse karışımdan 10 µl alınıp mikrosantrifüj tüpüne koyuldu, üzerine 10 µl tripan blue boyası eklenip homojenize edildi. Elde edilen karışımdan 10 µl alınıp hemositometri lamına koyuldu. Lam cihaza yerleştirildikten sonra sayım yapıldı.

3.3.3 Hazırlanan Mikrokürelerin Toksisitesinin Belirlenmesi

3.3.3.1 MTT Testi

MTT testi ISO 10993-5 Standartına uygun olarak yapılmıştır. Pasajlanarak çoğaltılan üretra epitel hücrelerini flasktan kaldırmak için içindeki vasatı uzaklaştırıldı ve flask

1 mL PBS (1X) ile yıkandı ardından 1 mL Tripsin-EDTA eklendi ve 4 dakika boyunca etüvde bekletildi. İnkübasyon işleminden sonra hücrelerin yüzeyden ayrılmaları mikroskop yardımı ile gözlemlendikten sonra taze besiyeri eklenerek hücreler falkon tüpe aktarıldı. Aktarma işleminden sonra falkon tüpler 2000 rpm de, 2 dakika santrifüj edilmiştir. Yapılan santrifüj işleminin ardından süpernatant kısmı atılarak falkon tüpün en alt kısmında kalan pellet 1 mL taze besiyeri ile süspanse edildi. Süspanse edilen karışımdan 10 µl alınıp mikrosantrifüj tüpüne koyuldu, üzerine 10 µl tripan blue boyası eklenip homojenize edildi. Elde edilen karışımdan 10 µl alınıp hemositometri lamına koyuldu. Lam cihaza yerleştirildikten sonra sayım yapıldı. Tripan blue ile sayılan hücreler her bir kuyucuk başına 20.000 hücre düşecek şekilde 48 well-plate ekilir. Üzerlerine %10 FBS, %1 penisilin/streptomisin içeren DMEM eklendi. Hücreler 37°C de %5 CO₂'li inkübatörde 24 saat inkübe edildi. 24 saatlik inkübasyonun ardından her kuyucuğa farklı sayıda kaempferol yüklenmiş ve kaempferol yüklenmemiş küre, farklı konsantrasyonlarda kaempferol ve farklı konsantrasyonlarda Mit-C konuldu. Kuyucukların bir kısmına pozitif kontrol için lateks, negatif kontrol için sadece hücre konuldu. 5 farklı konsantrasyon ve 3 farklı tekrar olarak uygulandı. 24 saatlik inkübasyon sonrası uygulanan platelerin içindeki vasat atıldı ve her bir kuyucuk başına 50 µl fenol redsiz besiyerinde çözülmüş 1mg/mL konsantrasyonundaki MTT solüsyonundan eklendi ve solüsyon eklendikten sonra 2 saat etüvde bekletildi. 2 saatin sonunda MTT solüsyonu çekilip üzerine çözücüsü olan 100 µl izopropanol eklenir ve ELİSA okuyucuda 570 nm'de okutuldu. Aynı işlemler L929 Fibroblast hücrelerine de uygulanmıştır.

3.3.3.2 WST-1 Testi

WST-1 in vitro toksisite deneyi için 48 kuyucuklu plakalar kullanıldı. Pasajlanarak çoğaltılan üretra epitel hücrelerini ve L929 fibroblast hücrelerini (An2 Mouse C3/ An connective tissue) flasktan kaldırmak için içindeki vasatı uzaklaştırıldı ve flask 1 mL PBS (1X) ile yıkandı ardından 1 mL Tripsin-EDTA eklendi ve 4 dakika boyunca etüvde bekletildi. İnkübasyon işleminden sonra hücrelerin yüzeyden ayrılmaları mikroskop yardımı ile gözlemlendikten sonra taze besiyeri eklenerek hücreler falkon tüpe aktarıldı. Aktarma işleminden sonra falkon tüpler 2000 rpm de, 2 dakika santrifüj edilmiştir. Yapılan santrifüj işleminin ardından süpernatant kısmı atılarak falkon tüpün en alt kısmında kalan pellet 1 mL taze besiyeri ile süspanse edildi. Süspanse edilen karışımdan 10 µl alınıp mikrosantrifüj tüpüne koyuldu, üzerine 10 µl tripan blue boyası

eklenip homojenize edildi. Elde edilen karışımdan 10 µl alınıp hemositometri lamına koyuldu. Lam cihaza yerleştirildikten sonra sayım yapıldı. Tripan blue ile sayılan hücreler her bir kuyucuk başına 20.000 hücre düşecek şekilde 48 well-plate ekilir. Üzerlerine %10 FBS, %1 penisilin/streptomisin içeren DMEM eklendi. Hücreler 37°C de %5 CO₂'li inkübatörde 24 saat inkübe edildi. 24 saatlik inkübasyonun ardından her kuyucuğa farklı sayıda kaempferol yüklenmiş ve kaempferol yüklenmemiş küre, farklı konsantrasyonlarda kaempferol ve farklı konsantrasyonlarda Mit-C konuldu. Kuyucukların bir kısmına pozitif kontrol için lateks, negatif kontrol için sadece hücre konuldu. Fenol red'siz DMEM kullanılarak hazırlanan DMEM/F-12 medyumdan 200 µl kuyucuklara koyuldu, üzerine 10 µl WST-1 çözeltisi ilave edildi. 37 °C'de 4 saat inkübe edildikten sonra hücre yaşayabilirliğinin tespiti için 48 kuyucuklu plate'in absorbans yoğunluk değerleri ELİSA plate okuyucuda 420 nm'de okundu. Aynı işlemler L929 Fibroblast hücrelerine de uygulanmıştır.

3.3.4 İkili Boyama Metodu İle Apoptoz ve Nekrozun Belirlenmesi

İkili boyama metodu çekirdeği boyayarak apoptoz ve nekrozu göstermektedir. Bu çalışma için ikili boyama solüsyonunda; Değerlendirme yapılırken normal, apoptotik olmayan hücrelerin çekirdekleri sönük mavi, hücrede veziküller(keseler) oluşmamış, çekirdekte ise DNA dağılmamış olarak görülmektedir. Apoptoza girmiş hücrelerin çekirdekleri; normal hücre çekirdeklerine göre çok daha parlak, çekirdeğin homojenliği kaybolmuştur, çekirdek kenarları düzgün değildir ve DNA parçalanmış parlak mavi görünümündedir.

Ribonükleaz A, Hoechst boyası (33342) ve Propidium Iodide kullanıldı. Ribonükleaz A, - 20 °C'de saklanır (Sigma R-500) ve RNA'yı boyamaz. Bu sayede sitoplazmik RNA'yı yok eder. Hoechst (33342) boyası, +4 °C'da saklanır ve apoptotik hücreleri boyar. Bu sayede gerçek apoptotik hücreler belirlenmiş olur. Propidium Iodide, +4 °C'de saklanır ve DNA'yı ve RNA'yı kırmızıya boyayarak sekonder nekrozu gösterir. PI floresan boyası normalde canlı ve hücre zarlarında hasar olmayan hücrelere girememekte dolayısıyla hücreleri boyayamamaktadır. Fakat nekroza uğrayan hücrelerde hücre zarı hasar gördüğünden hücre içerisine girebilmekte ve çekirdeği kırmızıya boyamaktadır. Double staining çalışma solüsyonu için Ribonükleaz A, Hoechst boyası (33342) ve Propidium Iodide PBS içerisinde hazırlandı.

İkili boyama (doublestaining) uygulaması için 48 well plate kullanıldı. Pasajlanarak çoğaltılan üretra epitel hücrelerini ve L929 fibroblast hücrelerini (An2 Mouse C3/ An connective tissue) flasktan kaldırmak için içindeki vasatı uzaklaştırıldı ve flask 1 mL PBS (1X) ile yıkandı ardından 1 mL Tripsin-EDTA eklendi ve 4 dakika boyunca etüvde bekletildi. İnkübasyon işleminden sonra hücrelerin yüzeyden ayrılması mikroskop yardımı ile gözlemlendikten sonra taze besiyeri eklenerek hücreler falkon tüpe aktarıldı. Aktarma işleminden sonra falkon tüpler 2000 rpm de, 2 dakika santrifüj edilmiştir. Yapılan santrifüj işleminin ardından süpernatant kısmı atılarak falkon tüpün en alt kısmında kalan pellet 1 mL taze besiyeri ile süspanse edildi. Süspanse edilen karışımdan 10 µl alınıp mikrosantrifüj tüpüne koyuldu, üzerine 10 µl tripan blue boyası eklenip homojenize edildi. Elde edilen karışımdan 10 µl alınıp hemositometri lamına koyuldu. Hazırlanan lam cihaza yerleştirildikten sonra sayım yapıldı. Tripan blue (tripan mavisi) ile sayılan hücreler her bir kuyucuk başına 20.000 hücre düşecek şekilde 48 well-plate ekilir. Üzerlerine %10 FBS, %1 penisilin/streptomisin içeren DMEM eklendi. Hücreler 37°C de %5 CO₂'li inkübatörde 24 saat inkübe edildi. 24 saatlik inkübasyonun ardından her kuyucuğa farklı sayıda kaempferol yüklenmiş ve kaempferol yüklenmemiş küre, farklı konsantrasyonlarda kaempferol ve farklı konsantrasyonlarda Mit-C konuldu. Kuyucukların bir kısmına pozitif kontrol için lateks, negatif kontrol için sadece hücre konuldu. Üzerlerine hazırlanmış olan ikili boyama solüsyonundan (double staining çalışma solüsyonu) 70µl damlatıldı. Işık görmemesi için alüminyum folyo ile sarılan plate 15dk inkübe edildi. İnkübasyon sonunda floresan mikroskopta DAPI filtresi kullanılarak apoptoza uğramış hücreler ve FITC filtresi kullanılarak (480-520nm dalga boyunda) nekroza uğramış hücrelerin değerlendirilmesi yapıldı.

3.3.5 Gerçek Zamanlı Hücre Analiz Sistemi (xCELLigence RTCA) ile Hücre Proliferasyonunun Belirlenmesi

xCELLigence sistemi, etiketleme gerektirmeyen gerçek zamanlı hücre sayım cihazıdır, hücrelerin fizyolojik durumunu göstererek hücre çoğalmasının, canlılığının ve sitotoksitenin değerlendirilmesini sağlar. Sistemin çalışma mekanizması elektriksel empedansı ölçerek ilerler, bu ölçüm yaşayan hücrelerin sayısı ve morfolojileri hakkında niceliksel bilgiler vermektedir. Elektrotların üzerinde bulunan hücrelerin varlığı, elektrot-çözelti ara yüzeyindeki iyonik ortamı etkilemekte ve elektrot empedansı(özdirenç; her maddeye özgü ayırt edici bir özelliktir ve maddenin

kimyasal özelliğinden dolayı direncin artmasıdır) artmaktadır. Elektroda ne kadar çok hücre tutunursa, elektrot empedansındaki(CI) artışta o kadar çok artmaktadır. Ortamda hücre olmaması ya da elektroda iyi tutunamadıysa CI değeri sıfır ya da sıfıra yakın olur.

Hücrenin çoğalması, artış göstermesi olarak adlandırılan proliferasyon üç aşamalıdır: Lag fazı, log (logaritmik) büyüme fazı ve durağan faz olarak isimlendirilir. Lag fazı; hücrelerin yeni ortamda (tripsinizasyonda sonra yeni kültür kabında devam ettirilmesi) geri kazandığı hücre dışı matriks ve hücre iskeletinin sentezlendiği böylece hücre döngüsünün eklenmesi ve döngüye adapte olma süresidir. Bu aşamada hücrelerde bölünme gözlenmez, hücreler kültür koşullarına uyum sağlar. Bu fazın uzunluğu subkültür sırasında hücre hattının büyüme fazına ve ekilen hücrenin sayısına bağlı olarak değişkenlik gösterebilir. Subkültürden sonra başlatılan gecikme fazı olarak da geçmektedir. Hücreler aktif olarak çoğalmaya başlar ve hücre yoğunluğunda üstel bir artış meydana gelmektedir, hücre popülasyonu bu aşamada en yüksek canlılık oranına ulaşır. Her hücre hattı log fazı boyunca farklı hücre proliferasyon kinetiği göstermektedir, popülasyonun ikiye katlanma süresini belirlemek için en uygun aşamadır. Bu nedenle bu aşamada hücresel fonksiyonun değerlendirilmesi önerilir. Hücre için ideal olan log fazının sonuna doğru bir araya gelmesi ve büyüme hızının düşmesidir. Bazı durumlarda ise hücre çoğalması durur. Bu aşama hücrelerin bölünmesinin hücre kaybıyla dengelendiği durağan faza girmesidir. Aktif hücre döngüsündeki hücre sayısında düşüş başlar ve hücreler zarar görmeye en duyarlı olukları durumdadırlar. Hücre çoğalması hücrelerin birbirine temas etmesiyle yavaşlarken, fazın sonlarında canlı hücre sayısında ciddi azalmalar başlar. Besin miktarının azalmasıyla ve aynı zamanda hücresel döngünün doğal yolundan da hücre ölümleri başlar.

Üretra epitel hücreleri ve L929 fibroblast hücreleri, altın kaplı 96 kuyucuklu e-platelere ekilmeden önce gerçek zamanlı hücre analiz sistemi (xCELLigence, RTCA-SP instrument, Roche, Almanya) inkübatöre yerleştirildi. Zamana bağlı olarak hücre proliferasyonunun belirlendiği xCELLigence (RTCA-SP). E-plate'e 10×10^3 /kuyucuk olacak şekilde üretral epitel hücreleri ve L929 fibroblast hücreleri ekildi. Üzerlerine 100 µl DMEM/F12 hazır besiyeri (%79 DMEM/F-12 (Biological Industries, USA), %10 Fetal bovin serum (Biological Industries,USA), %1 Penisilin streptomisin (Biological Industries,USA)) eklendi. 24 saat boyunca ekimi yapılan hücrelerin bir

gün süre ile RTCA-SP sisteme bağlı inkübatör proliferasyonu takip edilmiştir. Hazırlanan e-plate etüvde bulunan xCELLigence cihazına yerleştirildikten sonra e-plate ile cihazın aynı sıcaklığa gelmesi için 10 dakika beklenmiştir. 1 dakika cihazda background okuması yapıldıktan sonra e-plate çıkarılmıştır. 24 saat boyunca hücre proliferasyonu belirlenmiş ve 21. saatin sonunda hücrelerin çoğalma fazına geçtiği tespit edilmiştir. Her bir kuyucuğa 100'er µl 50×10^3 hücre /kuyucuk olacak şekilde besiyeri eklenmiştir. Tekrar e-plate etüve yerleştirilmiş, 10 dakika beklendikten sonra okuma başlatılmıştır. Hücrelerin plağa tutunması ve çoğalması için 21 saat süre ile 37°C'de inkübasyonu yapılan hücrelerin xCELLigence sistemine bağlı proliferasyonu takip edildi. Hücrelerin log fazında inkübasyonun 21.saatinde sistem durduruldu, e-plate'teki vasatlar uzaklaştırıldı, kuyucuklara 100 µl besiyeri eklendi, her kuyucuğa farklı sayıda kaempferol yüklenmiş ve kaempferol yüklenmemiş küre, farklı konsantrasyonlarda kaempferol ve farklı konsantrasyonlarda Mit-C konuldu. Kuyucukların bir kısmına pozitif kontrol için lateks, negatif kontrol için sadece hücre konuldu. 96 saat süre ile kültürü yapılan hücrelerin 5 dakika ara ile sistemden gerçek zamanlı olarak empedans ölçümü alındı. İnkübasyon sonunda zamana bağlı hücre proliferasyonunu gösteren grafikler elde edildi.

3.3.6 Mikronükleus testi (OECD 487) ile genotoksitenin belirlenmesi

Hücre kültüründe çoğaltılan üretra epitel hücreleri ve L929 fibroblast hücreleri 5×10^5 olacak şekilde 6 kuyucuklu plakalara ekilip 24 saatlik inkübasyona bırakıldı. 24 saat inkübasyonun ardından kuyucuklardaki vasatlar atılarak taze besiyeri ilave edildi, besi ortamına her kuyucuğa farklı sayıda kaempferol yüklenmiş ve kaempferol yüklenmemiş küre, farklı konsantrasyonlarda kaempferol ve farklı konsantrasyonlarda Mit-C konuldu. Kuyucukların bir kısmına pozitif kontrol için mitomicin-C, negatif kontrol için sadece hücre konuldu. Mikronükleus testi için hazırlanan kültür ortamlarına inkübasyonun 44.saatinde binükleuslu hücreler elde etmek amacıyla 3µg/mL Sitokalazin-B (Santa cruz) ilave edildi. 72.saatte kuyucuklardaki vasatlar atılarak hücrelerin şişerek parçalanmalarını ve kromozomların birbirlerinden iyice ayrılmasını sağlamak amacıyla iki farklı fiksasyon yapıldı; ilki 5 dk oda sıcaklığında soğuk(+4°C) 0,075 M KCL(Ambresco) hipotonik solüsyonu (1,397 g toz KCL 250 mL'lik steril balon joje içerisinde steril distile su ile çözülür) ile inkübe edildi. İkinci fiksasyon ise; inkübasyon sonunda hipotonik solüsyon ile muamele sonucu açılmış olan metafaz plaklarının tespit edilmesi amacıyla, 3:1 oranında metanol: glasiyel asetik

asit (Merck,Germany) ile fikse edildi. Fiksasyon işlemi 3 kez tekrarlandı. Fiksatifler, uygulamada kullanılmadan iki saat önce hazırlanarak buzdolabında(+4°C) saklanmıştır.

Son aşamada mikronükleus oluşumu görülen binükleuslu hücrelerin görüntülenmesi için 150 µl propodium iodide floresan boyası (Life technologies, USA) damlatılarak 15 dk inkübe edildi. İnkübasyon sonunda inverted mikroskopta (Leica, DM6000B, Germany) FITC (480-520nm dalga boyunda) mikronükleuslu, binükleuslu ve çok nükleuslu hücrelerin değerlendirilmesi yapıldı. Çalışmadan elde edilen verilerin istatistiksel olarak analiz edilmesi için SPSS (Statistical Package for the Social Sciences) 13.0 paket programı kullanıldı, kontrol ve deney grupları arasındaki farklılıkların değerlendirilmesinde Tek Değişkenli Varyans Analizi (ANOVA Tukey Testi) uygulandı.

3.4 Hazırlanan Mikrokürelere L929 ve Üretra hücrelerinin Yapışma Testi

Genel olarak hyaluronik asit, kolajen, ipek ve aljinat gibi doğal olarak elde edilen ve kullanım açısından biyoyumluluk açısından olumsuz sonuç göstermeyen biyomalzemeler sentetik ya da kimyasal malzemelerle karıştırıldığında; biyoyumluluk, hücre yapışması ve hücre göçü sağlama avantajına sahiptirler (262). Hücre yapışması kullanım alanına göre hücrenin kaderini belirlemektedir. Hücre yapışması ile diğer hücreler ile olan iletişimi güçlenir ve hücreler rahatça çoğalabilir bu durum doku yenilenmesini, yara iyileşmesini ve malzemenin uyumunu hızlandırır (263). Hücre yapışması in vivo biyoyumluluk için önem arz etmektedir, uygulanan malzemeye hücrelerin yapışması ile hücre iletişimi ve düzenlenmesinde çok önemlidir ve dokuların gelişimi ve korunumu için de temel noktalardan biridir. Ancak burada tasarlanan biyomalzemenin kullanım alanı ve amacı iyi planlanmalıdır. Bazı durumlarda hazırlanan biyomalzemenin bazı hücreleri arttırması istenirken bazı hücreleri de arttırmaması, ortamdaki uzaklaştırılması istenmektedir. Bu durumda sentez yöntemi ve uygulama alanı ile malzeme tasarlanmalıdır. Bu tez çalışmasında hazırlanan mikrokürelere uygulama alanı olarak üretra kanalı seçilmiştir. Bu alanda oluşan darlıkta meydana gelen fibrozlu bölgede darlığın iyileşmesi için fibroblast hücrelerinin varlığı istenmezken, üretra epitel hücrelerinin canlılığı ve sayısının artması istenmektedir. Böylece doku normal haline dönebilmeli ve darlık bertaraf

edilmiş olmalıdır.

Hazırlanan ilaç yüklü ve boş mikroküreler, mit-c ve kaempferol tek başına ince uçlu kataterler etrafına %1 hyaluronik asit ve %2 aljinat içeren karışımdan sarıldı ve malzemeler bu karışım ile karıştırıldı ardından %4'lük CaCl_2 solüsyonu içerisinde çapraz bağlanması sağlandı. Kateterler boş 24'lük plakaların kuyucuklarına yerleştirildi. Hazırlanan her bir kataterin bulunduğu kuyucuğa 4×10^4 üretra epitel hücresi ve L929 fibroblast hücresi ilave edildi. 24 saat boyunca %5 CO_2 içeren 37 °C'de inkübasyona bırakıldı. İnkübasyon süresinin ardından kuyucuklar 1X PBS ile 2 defa yıkandı, fiksasyon için %3 gluteraldehit içeren solüsyona maruziyeti sağlandı ve fiksatif ortamdan uzaklaştırıldıktan sonra laminar kabin içerisinde kurumaya bırakıldı. Hücre yapışması, malzemeler üzerinde çoğalması ve yoğunluğunun değerlendirilmesi işlemi için SEM cihazında analiz edildi.

3.5 Diğer İn Vitro Biyouyumluluk Testleri

Hücre kültürü testleri hazırlanan mikrokürenin uyumluluğu ve dozajını belirlemek ve biyouyumluluğunun değerlendirilmesi için yapılmıştır. ISO 10993'e göre hazırlanan bir tıbbi cihaz ya da geliştirilen kimyasal ve ilaçlar için yapılması gereken kan testleri (hemolitik etki, pıhtılaşma faktörleri) ve mutojenik etkinin tespiti için AMES (OECD 471) tetleri yapılmıştır.

3.5.1 AMES Mutajenite Testi ile Mutojenik Etkinin Belirlenmesi

3.5.1.1 Ames Testi Yapılışı

✓ Liyofilize Suştan Donmuş Kalıcı Kültür Hazırlama

Liyofilize diskin bulunduğu vial oda sıcaklığına getirildi, aseptik koşullarda 1 disk alınır ve 1 mL nutrient broth (NB) ile aktive olması sağlandı. Hazırlanan çözeltiden bir öze yardımıyla nutrient agar (NA) plak üzerine tek koloni oluşacak şekilde ekim yapılır. Plak bir gece 37 °C'de inkübasyona bırakıldı. Plak üzerinde koloni oluşmaması ihtimaline karşı disk üzerinde 4 mL nutrient broth eklenir ve içerisinde 2 mL alınarak nutrient agar plağı üzerinde yayma yapıldı, bu plakta bir gece 37 °C'de inkübasyona bırakıldı. Kalan suş üzerine 2 mL NB ilave edilir ve falkon kapağı kapatılarak 37 °C'de çalkalamalı inkübatörde bir gece inkübasyona bırakıldı. İnkübasyonun ardından sıvı besi yeri ve bakteri ortamı +4 °C de suş üremesi olmaması ihtimaline karşı saklandı.

Hazırlanan plaklarda herhangi bir üreme olmaz ise sıvı besiyerinden öze ile yeniden bakteri ekimi yapılır.

✓ **Suş Saflaştırılması**

1 gece 37 °C’de inkübasyona bırakılmış olan suşların tek koloni üremeleri kontrol edilir. Tek koloni üremesi var ise; kolonilerden alınır ve suşlara özgü olan plaklar üzerine tek koloni ekimleri yapıldı. TA97, TA98 ve TA100 suşları için HBA agarlı besiyerine, TA102 suşu için HBAT agarlı besiyerine ve TA1535 suşu için HB agarlı besiyerine ekimleri gerçekleştirildi. 48 saatlik inkübasyonun ardından oluşan tek kolonilerden biri seçilir ve 2. kez suşa özgü MGA’lı plağa ekim yapıldı, 48 saat inkübe edildi. Bu işlem suşların saflaştırılması için 2 defa tekrar edildi. Saflaştırma işlemi yapılan son plaktan en az 5 tek koloni seçildi ve suşa özgü MGA’lı plakta 5 koloni kodlanarak çizik şeklinde ekim yapıldı ve 48 saat inkübasyona bırakıldı. 48 saatlik inkübasyonun ardından hazırlanan plaktan her 5 koloni için tek koloniler seçildi ve 5 mL NB içerisine ayrı ayrı kodlanarak alındı. NB içerisinde hazırlanan suşlar 1 gece inkübasyona bırakıldı. Genetik kontrol işlemleri için bu suşlar test edildi. Genetik kontrolleri yapıldıktan sonra %DMSO içeren NB de suşlar -80 °C’de saklandı. Her testten önce genetik işaretleme yeniden yapılmalıdır.

✓ **Suşların Genetik İşaretleme Kontrolü**

AMES test sisteminde kullanılan bakteri suşlarında genetik olarak modifikasyon yapıldığından bu mutasyonlarda bozunmalar diğer bakteri gruplarına göre daha hızlı olabilmektedir. Bu sebeple testte kullanılan suşların test malzemesi ile teste tabii tutulmadan önce genetik özelliklerini taşıyıp taşımadıklarının kontrolünün yapılması gerekmektedir.

Önceden hazırlanmış ve saflaştırması yapılan bakteri kültürlerinden hazırlanan 5 koloniden gecelik kültür hazırlandı. Alınan tek koloniler 5 mL NB içerisinde, 37 °C’de bir gece inkübasyona bırakıldı, inkübasyonun ardından çalkalamalı etüv içerisinde 120 rpm’de 2 saat karıştırıldı. Her suş için önceden hazırlanmış olan seçici besiyeri kullanılarak bu besiyerlerine ekimleri gerçekleştirildi.

✓ **Histidin gereksinimi kontrolü (his-)**

Tüm suş kültürlerinin “MGA B” plaklara ekimi yapıldı ve 48 saat 37 °C’de inkübe edildi. Testte kullanılan tüm suşlar histidin bağımlı olduğundan plakta üreme görülmemesi beklendi. Üreme tespit edilen suş var ise yeniden liyofilize suştan

açılmalı ve üreme olan suş teste alınmamalıdır.

✓ **Biyotin gereksinimi kontrolü (bio-)**

Tüm suş kültürlerinin “MGA H” plaklara ekimi yapıldı ve 48 saat 37 °C’de inkübasyona bırakıldı. TA102 dışındaki tüm suşlar biotin bağımlı olduğundan plakta üreme görülmemelidir. TA102 suşunda ise üreme beklenmektedir.

✓ **Histidin ve biyotin gereksinimi kontrolü (his-/bio-)**

Suş kültürleri “MGA HB” plaklara ekildi ve 48 saat 37 °C’de inkübe edili. Tüm suşlarda plakta üreme olması beklenmektedir.

✓ **rfa mutasyonu varlığının kontrolü**

Suş kültürleri “MGA HB” plaklara ekimi yapıldı. Ekim alanına 10 µl kristal viyole çözeltisi emdirilmiş disk yerleştirildi ve 48 saat 37 °C’de inkübe edildi. Tüm suşlarda disk etrafında inhibisyon zonu gözlenmesi gerekmektedir.

✓ **UvrB delesyonu kontrolü**

Suş kültürleri NA’lı plaklara ekildi. Plağın yarısı kartonla kapatıldı ve açıkta kalan kısmı 15 watt’lık UV lambası altında 8 sn tutuldu (TA97, TA98, TA100, TA102 bir NA’lı plakta). TA1535 ayrı bir NA’lı plağa çizildi ve 6 sn UV’de tutuldu. Plaklar 1 gece 37 °C’de inkübe edildi. İnkübasyon süresinin bitiminde TA102 hariç suşların UV’ye tutulan kısımlarında büyüme olmaması beklenir. Bununla birlikte, delesyon kromozomun uvrB-bio bölgesinde olduğundan, suşta biotin gereksiniminin gösterilmesi yeterli sayılabilmektedir.

✓ **pKM101 plazmid varlığı kontrolü (amp direnci)**

Suş kültürlerinin “MGA HBA” plaklara ekimi yapıldı. 48 saat 37 °C’de inkübe edildi. Kontrol olarak pKM101 plazmidi içermeyen suş kullanılır (TA1535). Büyüme sadece bu plazmidi içeren suşlarda görülür.

✓ **pAQ1 plazmid varlığı kontrolü (tet direnci)**

TA102 için yapılır. Kontrol olarak pAQ1 plazmidi içermeyen suş kullanıldı (TA102 dışındakiler). Suş kültürleri “MGA HBA” plaklara ekildi ve 48 saat 37 °C’de inkübe edildi. TA102 suşu büyümeli, kontrol olanda büyüme olmamalıdır.

✓ **Kendiliğinden geri dönen koloni sayısının kontrolü**

Histidin-biyotinli üst agarlara her suşun gecelik kültüründen eklenerek minimal

glukoz agarlı plaklara yayım işleminin yapılması ve 48 saat 37 °C’de inkübasyon süresinin ardından geriye dönen koloni sayısının saptanması işlemidir. Her suşun kendine özgü geriye dönüş frekansı ile uyum sağlayıp sağlamadığı kontrol edilmektedir.

Testte kullanılacak olan suşların genetik işaretleme kontrolü yapıldıktan sonra deneye başlandı. Deney sırasında MGA plakları kullanıldı, plaklar önceden hazırlanıp +4 °C’de muhafaza edildi ve deney başlamadan önce oda sıcaklığına gelmeleri sağlandı. Kullanılacak olan her bakteri suşundan gecelik kültür hazırlandı, 1 gecelik inkübasyonun ardından bakteri sayıları 5×10^5 CFU/mL olacak şekilde ayarlandı. Deney grupları üç tekrarlı, S9 içeren ve içermeyen üst agarlar hazırlanarak uygulandı. 5 mg/mL kaempferol, 5 mg/mL mit-c, 5 mg/mL kaempferol içeren ve boş mikroküreler, pozitif ve negatif kontrol grupları teste aşağı dilüsyon yapılarak 5 farklı konsantrasyonda uygulandı.

S9 içermeyen üst agar; 2 mL HB’li üst agar + 0.5 mL tampon çöz. + 0.1 mL bakteri, S9 içeren üst agar; 2 mL HB’li üst agar + 0.5 mL S9 mix + 0.1 mL bakteri olacak şekilde hazırlandı ve 0.2 mL deney numunesi üst agara ilave edildi. Hazırlanan üst agarlar hızlı bir şekilde MGA’lı plaklar üzerine yayıldı ve donmasının ardından 48 saat 37 °C’de inkübasyona bırakıldı. İnkübasyonun tamamlanmasının ardından tüm gruplarda oluşan kolonilerin sayımı yapıldı. Her doz için petri başına geri dönen koloni sayısı ortalaması $\pm$ SD hesaplandı.

3.6 Hemolitik Etki Testi

Bu test sisteminde 0.13 M sitratlı tüplere 3 donörden(tavşan) eşit hacimde olacak şekilde kan alındı ve mit-c, kaempferol, kaempferol yüklenmiş ve yüklenmemiş mikroküreler için 7 mL özütleme sıvısı tüplere bölündü, hemoglobin standartı seyreltilerek standart curve oluşturuldu ve F (kalibrasyon katsayısı) belirlendi. TS EN ISO 10993-12 standardına göre malzemelerin özütlemeleri yapıldı. Test maddesinin 0,2 gr başına 1 mL olacak şekilde özütleme sıvı hacmi hesaplandı. Daha sonra özütleme sonlandırılarak elde edilen özüt aynı gün içerisinde kullanıldı. Ayrıca numunelerin doğrudan kan ile etkileşimleri için (Direkt kontak (DK)) de $21\text{cm}^2:7.0\text{mL}$ olacak şekilde test günü hazırlandı. Her numune için 7 mL olan özüte 1 mL kan eklenmiş ve 3 saat boyunca 37 °C’de inkübe edilmiştir.

Numune ile etkileşen ve inkübasyonu tamamlanan kan ve kontrol grupları 700-800 G de 15 dk santrifüj edildi. Üstte kalan süpernatant ve drabkin 1:1 oranında karıştırılarak 15 dk inkübasyonun ardından 540 nm dalga boyunda spektrofotometrede ölçüldü. Pozitif kontrol için distile su, negatif kontrol için standart polietilen, blank için Mg/Ca içermeyen PBS kullanıldı.

3.6.1 Hesaplama Yöntemi

Hesaplama yöntemi için AST F-756-17 de bulunan denklem baz alınmıştır. Malzemelerin okunan absorbans değerleri ve standartın absorbans değerleri kullanılarak denklem kurulmaktadır. Supernatant hemoglobin konsantrasyonu= Malzeme absorbans x F x 2 (SHK)

Eğim (F)= kalibrasyon katsayısıdır.

Hemoliz oranı; aşağıdaki formüle göre hesaplanıp, sonuçlar yorumlandı.

$$\% \text{hemoliz} = \frac{\text{Supernatant hemoglobin konsantrasyonu}}{\text{Total hemoglobin konsantrasyonu}} \times 100\%$$

Ayrıca yapılan test sonunda supernatant renk gözlenmesi de nitel olarak gözlemlendi ve belirtildi.

3.7 Pıhtılaşma Faktörlerine Etkinin Belirlenmesi

3.7.1 PF 4'e Kaempferol Yüklenen ve Yüklenmeyen Mikrokürelerin Etkisi

Test yöntemi için TS EN ISO 10993-4 standartının yönlendirdiği makaleler ve ASTM F 1984 referans alınmıştır. TS EN ISO 10993-12 yegöre malzeme özütlemesi gerçekleştirilmiştir. Hazırlanan mikroküreler 0,1 g/mL olacak şekilde PBS ile 1 gece 37 °C'de inkübe edildi ve kan serumu ile 1/1 oranında etkileştirildi. Numune özütü ve kan serumu 37 °C'de 1 saat inkübasyona bırakıldı. Hazır hale gelen numune ELİSA kitinde belirlenen test prosedürü takip edilerek deney gerçekleştirildi. Test prosedürü aşağıdaki gibidir;

- 100 µl örnek ve standartlar kuyucuklara ekler, 90 dakika inkübasyona bırakıldı.
- Sıvı kısım atıldı ve 100 µl Biotinylated Detection Ab/Ag eklenir 1 saat inkübasyona bırakıldı.
- Sıvı kısım uzaklaştırılır ve 3 defa (her bir yıkama işlemi 5 dakika sürmüştür)

kit içerisinde bulunan washing solution (yıkama solüsyonu) ile yıkama işlemi yapıldı.

- Yıkama işlemini takiben kit içerisinde bulunan 100 µl HRP Conjugate eklendi ve 30 dakika 37 °C’de inkübe edildi.
- Sıvı kısım aspire edilir 5 defa (her bir yıkama işlemi 5 dakika sürmüştür) yıkama solüsyonu ile yıkama yapıldı.
- 90 µl Substrate Reagent eklendi ve 15 dakika inkübe edildi ve stop solution eklenerek deney tamamlandı. Absorbans okuması 450 nm de yapıldı.

Kit içerisinde bulunan standart referans maddenin seri dilüsyonları ve absorbans değerleri ile grafik çizildi ve elde edilen eğimden çıkarılan denklem ile absorbansa karşı miktar tayini yapıldı. Her bir test numunesi 3 tekrarlı olacak şekilde şekilde çalışıldı.

Yapılan ELİSA testlerinde hesaplama yöntemi için kitin belirlediği yöntem kullanılır. Standartın okunan absorbans değerleri ve miktrının bulunduğu grafik çıkarılarak denklem elde edilir elde edilen denklem üzerinden hesaplama yapılarak miktar belirlenir.

Değerlendirme için standartın yönlendirdiği iki parametre bulunmaktadır.

1. Negatif kontrol ile arasında fark olması/olmaması durumu değerlendirilir
2. İlk okuma değerinin üstünde bir miktar çıkıp/çıkması değerlendirilir.

3.7.2 BTG’ye Kaempferol Yüklenen ve Yüklenmeyen Mikrokürelerin Etkisi

Test yöntemi için TS EN ISO 10993-4 standartının yönlendirdiği makaleler ve ASTM F 1984 referans alınmıştır. TS EN ISO 10993-12 ye göre malzeme özütlemesi gerçekleştirilmiştir. Hazırlanan mikroküreler 0,1 g/mL olacak şekilde PBS ile 1 gece 37 °C’de inkübe edildi ve kan serumu ile 1/1 oranında etkileştirildi. Numune özütü ve kan serumu 37 °C’de 1 saat inkübasyona bırakıldı. Hazır hale gelen numune ELİSA kitinde belirlenen test prosedürü takip edilerek deney gerçekleştirildi. Test prosedürü bölüm 3.7.1. de belirtilen ELİSA test metodur.

Hesaplama yöntemi için kitin belirlediği yöntem kullanılır. Standartın okunan absorbans değerleri ve miktrının bulunduğu grafik çıkarılarak denklem elde edilir elde edilen denklem üzerinden hesaplama yapılarak miktar belirlenir.

Değerlendirme için standartın yönlendirdiği iki parametre bulunmaktadır.

1. Negatif kontrol ile arasında fark olması/olmaması durumu değerlendirilir
2. İlk okuma değerinin üstünde bir miktar çıkıp/çıkması değerlendirilir.

3.7.3 FPA'ya Kaempferol Yüklenen ve Yüklenmeyen Mikrokürelerin Etkisi

Test yöntemi için TS EN ISO 10993-4 standartının yönlendirdiği makaleler ve ASTM F 1984 referans alınmıştır. TS EN ISO 10993-12 yegöre malzeme özütlemesi gerçekleştirilmiştir. Hazırlanan mikroküreler 0,1 g/mL olacak şekilde PBS ile 1 gece 37 °C'de inkübe edildi ve kan serumu ile 1/1 oranında etkileştirildi. Numune özütü ve kan serumu 37 °C'de 1 saat inkübasyona bırakıldı. Hazır hale gelen numune ELİSA kitinde belirlenen test prosedürü takip edilerek deney gerçekleştirildi. Test prosedürü bölüm 3.7.1. de belirtilen ELİSA test metodur.

Hesaplama yöntemi için kitin belirlediği yöntem kullanılır. Standartın okunan absorbans değerleri ve miktrının bulunduğu grafik çıkarılarak denklem elde edilir elde edilen denklem üzerinden hesaplama yapılarak miktar belirlenir.

Değerlendirme için standartın yönlendirdiği iki parametre bulunmaktadır.

1. Negatif kontrol ile arasında fark olması/olmaması durumu değerlendirilir
2. İlk okuma değerinin üstünde bir miktar çıkıp/çıkması değerlendirilir.

3.7.4 TAT'a Kaempferol Yüklenen ve Yüklenmeyen Mikrokürelerin Etkisi

Test yöntemi için TS EN ISO 10993-4 standartının yönlendirdiği makaleler ve ASTM F 1984 referans alınmıştır. TS EN ISO 10993-12 yegöre malzeme özütlemesi gerçekleştirilmiştir. Hazırlanan mikroküreler 0,1 g/mL olacak şekilde PBS ile 1 gece 37 °C'de inkübe edildi ve kan serumu ile 1/1 oranında etkileştirildi. Numune özütü ve kan serumu 37 °C'de 1 saat inkübasyona bırakıldı. Hazır hale gelen numune ELİSA kitinde belirlenen test prosedürü takip edilerek deney gerçekleştirildi. Test prosedürü bölüm 3.7.1. de belirtilen ELİSA test metodur.

Hesaplama yöntemi için kitin belirlediği yöntem kullanılır. Standartın okunan absorbans değerleri ve miktrının bulunduğu grafik çıkarılarak denklem elde edilir elde edilen denklem üzerinden hesaplama yapılarak miktar belirlenir.

Değerlendirme için standartın yönlendirdiği iki parametre bulunmaktadır.

1. Negatif kontrol ile arasında fark olması/olmaması durumu değerlendirilir
2. İlk okuma değerinin üstünde bir miktar çıkıp/çıkması değerlendirilir.

3.7.5 Ne-Ela'ya Kaempferol Yüklenen ve Yüklenmeyen Mikrokürelerin Etkisi

Test yöntemi için TS EN ISO 10993-4 standartının yönlendirdiği makaleler ve ASTM F 1984 referans alınmıştır. TS EN ISO 10993-12 yegöre malzeme özütlemesi gerçekleştirilmiştir. Hazırlanan mikroküreler 0,1 g/mL olacak şekilde PBS ile 1 gece 37 °C'de inkübe edildi ve kan serumu ile 1/1 oranında etkileştirildi. Numune özütü ve kan serumu 37 °C'de 1 saat inkübasyona bırakıldı. Hazır hale gelen numune ELİSA kitinde belirlenen test prosedürü takip edilerek deney gerçekleştirildi. Test prosedürü bölüm 3.7.1. de belirtilen ELİSA test metodudur.

Hesaplama yöntemi için kitin belirlediği yöntem kullanılır. Standartın okunan absorbans değerleri ve miktranın bulunduğu grafik çıkarılarak denklem elde edilir elde edilen denklem üzerinden hesaplama yapılarak miktar belirlenir.

Değerlendirme için standartın yönlendirdiği iki parametre bulunmaktadır.

1. Negatif kontrol ile arasında fark olması/olmaması durumu değerlendirilir
2. İlk okuma değerinin üstünde bir miktar çıkıp/çıkması değerlendirilir.

3.8 Kaempferolün GAG Oluşumunun Üretra Epitel ve L929 Fibroblast Hücrelerinde Toluidine Blue ile Belirlenmesi

Toluidine blue testi ile boyama sonucunda kolajen içeren herhangi bir hücre ya da doku polikromatik (manyetik ışın saçılımı görünümü) boyama meydana gelir (260). Toluidin mavisi (TB), asidik doku bileşenlerini (sülfatlar, karboksilatlar ve fosfat radikalleri) boyayan asidofilik metakromatik bir boyadır. Bu nedenle, toluidin mavisi boyaması, proteoglikan (PG) üretiminin bir göstergesi olarak kullanılabilir (261).

Bu test yöntemi için için 48 kuyucuklu plakalar kullanıldı. Pasajlanarak çoğaltılan üretra epitel hücrelerini ve L929 fibroblast hücrelerini (An2 Mouse C3/ An connective tissue) flasktan kaldırmak için içindeki vasatı uzaklaştırıldı ve flask 1 mL PBS (1X) ile yıkandı ardından 1 mL Tripsin-EDTA eklendi ve 4 dakika boyunca etüvde bekletildi. İnkübasyon işleminin ardından hücrelerin yüzeyden ayrılması mikroskop

yardımı ile gözlemlendi ve taze besiyeri eklenerek hücreler falkon tüpe aktarıldı. Aktarma işleminden sonra falkon tüpler 2000 rpm de, 2 dakika santrifüj edilmiştir. Yapılan santrifüj işleminin ardından süpernatant kısmı atılarak falkon tüpün en alt kısmında kalan pellet 1 mL taze besiyeri ile süspanse edildi. Süspanse edilen karışımdan 10 µl alınıp mikrosantrifüj tüpüne koyuldu, üzerine 10 µl tripan blue boyası eklenip homojenize edildi. Elde edilen karışımdan 10 µl alınıp hemositometri lamına koyuldu. Lam cihaza yerleştirildikten sonra sayım yapıldı. Tripanblue ile sayılan hücreler her bir kuyucuk başına 20.000 hücre düşecek şekilde 48 well-plate ekildi. Üzerlerine %10 FBS, %1 penisilin/streptomisin içeren DMEM eklendi. Hücreler 37°C de %5 CO₂'li inkübatörde 24 saat inkübe edildi. 24 saatlik inkübasyonun ardından her kuyucuğa farklı sayıda kaempferol yüklenmiş ve kaempferol yüklenmemiş küre, farklı konsantrasyonlarda kaempferol ve farklı konsantrasyonlarda Mit-C konuldu.

Hazırlanan mikroküreler, kaempferol ve mitc'nin 24 saat uygulanmasının ardından plakadan vasat uzaklaştırıldı ve PBS ile yıkama işlemi yapıldı. Plakalar sırasıyla; %96, %80 ve %70 lik alkol serilerinden geçirildi. Daha sonra üzerlerine 1:10 oranında seyreltilmiş toluidine blue boyası damlatılıp 1 dk bekletildikten sonra boya aspire edildi ve kuyucuklar distile su ile yıkandı. Kuyucuklar kuruduktan sonra ışık mikroskobunda inceleme yapıldı.

3.9 Deney Hayvanları (İn Vivo) Testler

İn vitro deney sonuçlarından elde edilen veriler ışığında kaempferol ve mit-c için uygun konsantrasyonlar belirlendi ve uygulandı.

Çalışmamız; Hayvan Deneyleri Yerel Etik Kurulu onayı alınarak Kırıkkale Üniversitesi Bilimsel Teknolojik Uygulama ve Araştırma Merkezi/Hüseyin Aytemiz Deneye Hayvanları Laboratuvarı'nda uygulama laboratuvarlarında gerçekleştirildi.

Çalışmada; ağırlıkları 220 ile 250 gram arasında değişen, her grupta 13 adet olacak şekilde, toplam 65 adet Sprague Dawley cinsi erkek sıçan kullanıldı. Darlık modeli oluşturmak için anestezi altında sıçanların üretrasına darbe uygulanmış skar oluşması sağlanmıştır. Skar oluşum kontrolü hayvanların uyanmalarını takiben ağırlı durumları, kesik idrar yapmaları zaman zaman kanlı idrar yapmalarının gözlemlenmesi ile tespit edilmiştir. Darlık uygulanmış denekler 21 gün boyunca darlığın yerleşmesi ve artması için bekletilmiştir. Darlık oluşumu tamamlandıktan sonra hayvan gruplarına

sentezlenen kaempferol yüklenmiş mikroküreler, ilaç yüklenmemiş mikroküreler, mitomycin-c ve kaempferol uygulanmıştır. Uygulama ince kateter etrafına sentez materyalleri uygulanarak yapılmıştır. D

Denekler rastgele beş gruba ayrıldılar:

Grup 1: Üretral darlık oluşturulmuş, mit-c uygulaması yapılan grup.

Grup 2: Üretral darlık oluşturulmuş, kaempferol uygulaması yapılan grup.

Grup 3: Üretral darlık oluşturulmuş, kaempferol yüklenmiş mikroküre uygulaması yapılan grup.

Grup 4: Üretral darlık oluşturulmuş, kapmferol yüklenmemiş mikroküre uygulaması yapılan grup.

Grup 5: Darlık oluşturulmayan kontrol grubu

Hazırlanan deneklere işlem uygulanmadan önce anestezi işlemi yapılmıştır (anestezi için %2 ksilezin hidroklorür 8 mg/kg ve ketamin hidroklorür 100 mg/kg olacak şekilde intermuskular olarak uygulandı. Sıçanlar sırt üstü supin pozisyonunda uygulama masasına yatırıldı ve üretra kanallarının içerisinde olacak şekilde katater etrafına sarılı malzemeler yerleştirildi. İşlem öncesinde ve sonrasında operasyon bölgesi %10 povidine iodine (batikon) solüsyonu ile temizlendi.

3.9.1 Dokuların Tespit ve Takibi

Uygulama yapılmış olan hayvanlar sakrifiye edildikten sonra üretra dokuları tespit ve doku takibine tabii tutulmuştur. Dokuların morfolojilerinin bozulmaması ve doku bütünlüğünü kaybetmemek için doku tespit işlemi yapılmalıdır. Tespit işleminin amacı protoplazmadaki protein, lipid, karbonhidrat ve diğer maddeleri koagule veya presipite ederek mikroskopik kesit hazırlanıncaya kadar karşılaşılabilecek reaktiflere karşı aynen kalmalarını sağlamaktır. Tespit işlemi; dokuyu hücresel enzimlerin neden olduğu otolizi engellemek, bakteri ve mantarlardan korumak, enfeksiyon oluşturabilecek ajanları inaktive eder, dokuyu sertleştirir ve doku komponentlerini stabilize eder. Tespit işlemi için kullanılan malzemeler kimyasal maddelerdir. Yapılacak tespit işlemi doku türüne göre değişmekte ve bu adım deney tasarlanırken seçilmelidir.

Standart olarak en yaygın kullanılan fiksatif, formalindir. Klinikte inceleme yapılacak olan dokular için patoloji laboratuvarlarında kullanılan standart fiksatif %10'luk

formalindir. Formalin; sudaki formaldehidin %40'lık çözeltisidir. %10 olarak hazırlanmış bir formalin çözeltisinde içeriğinde %4 formaldehid kullanılmaktadır. Her türlü materyalin rutin fiksasyonu için formalin kullanılabilir. Kimyasalın ucuz olması, dokuda bozunmaya yol açmadan uzun süre saklanabilmesi ve tespit edilen dokulara birçok özel boya ve immunohistokimya uygulanabilmesi kullanımını arttırmaktadır. Formaldehit ile dokunun etkileşim süresi doku büyüklüğü ve dokunun içeriğine bağlı olarak belirlenmektedir.

Doku takibi temel olarak üç aşamadan oluşmaktadır. Bu aşamalar; dehidrasyon, şeffaflaştırma ve infiltrasyondur (sertleşme). Dehidrasyon aşaması fiksasyonu tamamlanmış olan dokuların takipte ilk sırasındır. Bu aşamada amaç dokunun gömülmesi sırasında kullanılacak olan parafinin sertleştiğinde dokunun gömülebilmesi gerekmektedir. Dehidrasyon aşamasında dokuların içerdiği su ortamdan uzaklaştırılır ve parafin sertleştiğinde dokuların arasına nüfus edebilir. Etil alkol dehidrasyon aşamasında en çok kullanılan ajandır. Şeffaflaştırma aşaması; bu aşamada amaç dehidrasyon maddesinin ortamdan uzaklaştırılmasıdır. Kullanılacak olan ajan dokuya zarar vermemeli ve uygulanacak olan parafinin yapısına sertleşmesine engel teşkil etmemelidir. En sık kullanılan şeffaflaştırıcı ajan ksilendir, uzun süre maruziyeti de dokuya çok zarar vermemekte olduğundan tercih edilmesini arttırır. Takibin son aşaması infiltrasyon aşamasıdır; bu aşamada amaç dokunun mikrotomda kesit almasını için sertleşmesini sağlamaktır. Dokuda bulunan şeffaflaştırıcı ile tutucu madde yer değiştirir. Bu işlem için hemen hemen her laboratuvar da parafin kullanılmaktadır.

Yapılan bu tez çalışmasında kullanılan sıçanlara 10 mg/mL kaempferol, 10 mg/mL kaempferol yüklenmiş mikroküreler, yalnızca hyaluronik asit ve aljinant içeren mikroküreler, 10 mg/mL mit-c ve hiçbir malzeme uygulanmıştır. Uygulama süresi sonunda kurban edilen hayvanlardan üretra dokuları %4 formaldehid içerisinde alınmıştır. 12 saatlik formaldehid fiksasyonu sonunda dokuların takibi Thermo Scientific Excelsior ES (EX3648 1012) doku takibi cihazı ile yapılmıştır. Yapılan doku takibinde kullanılan kimyasallar ve uygulama süreleri aşağıda verilmiştir.

- %10 formalin (vakum altında, 35°C) 2,5 saat
- Alkol-formalin 1,5 saat
- Alkol-formalin 1 saat

- %70 alkol 1 saat
- %80 alkol 1 saat
- %95 Alkol (vakum altında) 1,5 saat
- %95 Alkol 1 saat
- Absol alkol 1 saat
- Ksilen 1 saat
- Ksilen (vakum altında) 1 saat
- Parafin 30 dakika
- Parafin 1 saat
- Parafin (vakum altında) 1 saat

3.9.2 Hematoksilen Eosin Testi

Hematoksilen ve eosin (H&E) boyası genel doku doku boyası olarak patoloji laboratuvarlarında en sık kullanılan boyadır. Bu boya ile boyanan dokuların çekirdekleri mavi, sitoplazmaları pembe tonlarında görünmektedir, dokunun farklı bölümlerini farklı renkler ve tonlarında boyamaktadır. Bu boyama ile doku bütünlüğünün durumu, çekirdeklerin yapısı ve dokuda meydana gelebilecek herhangi bir morfolojik değişiklik, displazi durumu, kan damarlarının durumları gibi pekçok fenotipik değişiklik morfolojik olarak incelenebilmekte ve tespit edilebilmektedir.

Parafine gömülmüş okulan üretra dokularından 0,4 µm kalınlığında ince kesitler alınmış ve lam üzerine aktarılmıştır. H&E boyama prensibi dört temel aşamadan oluşmaktadır; deparafinizasyon işlemi, şeffaflaştırma boyama ve kapama. Uygulanan H&E yöntemi sırası aşağıda belirtilmiştir;

Ksilen 5 dk → Ksilen 5 dk → Ksilen 5 dk → Ksilen-Alkol 3 dk → %90 Alkol 3 dk → %80 Alkol 3 dk → %70 Alkol 3 dk → Çeşme suyunda yıkama 3 dk → Hematoksilen 10 dk → Yıkama 5 dk → %1 asit-alkol yıkama 2 dk → Amonyaklı su 1 dk → Yıkama 2 dk → Alkol 1 dk → Eosin 5 dk → %70 Alkol 3 dk → %80 Alkol 3 dk → %90 Alkol 3 dk → Ksilen 5 dk → Ksilen 5 dk → Kurutma 5 dk → Gliserin ile kapatma.

3.9.3 İmmunohistokimya Testi

Uygulanan bu yöntem hücre ve doku içinde bulunan enzimlerin ve makromoleküllerin yerleşiminin incelenmesinde ve ilgili enzimin varlığının tespit edilmesinde kullanılır. İncelenecek olan enzimin saptanmasında sistem ilgili makromoleküle karşı geliştirilmiş bir antikorla işaretlenmesiyle gerçeklerşir. Antijenlerin antikorlarla işaretlenerek görünür olmasını sağlayan bu yöntemde işaretleme tek aşamalı ya da iki aşamalı olarak yapılır. Tek aşamalı olarak adlandırılan direk yöntemde gösterilmek istenen antijene özgü antikor boyası seçilerek çalışılır ancak primer antikor işaretlendiği için hassasiyeti düşük ve antikorun reaksiyonu zayıf olabilmektedir. Bu sebeple en çok tercih edilen iki aşamalı olarak adlandırılan indirek yöntemdir. İn direk yöntemde polyclonal antikorlarla çalışılır, iki aşamalı olarak hem primer antikorlar antijene bağlanır hem de sekonder antikorlar primer antikorda açık kalan Fc bölgesine bağlanır böylece iki aşama indirek olarak işaretlenmiş olmaktadır. İşaretlemek için kullanılan ikinci antikor primer antikorun geliştirildiği hayvan türünün immunoglobulinine karşı oluşturulur. İndirek antikor işaretleme de en yaygın yöntem avidin-biotin yöntemidir. Bu tez çalışmasında uygulanan immunohistokimya (IHC) prosedürü aşağıda belirtilen basamaklar takip edilerek uygulanmıştır.

İmmunohistokimya Prosedürü

✓ 1. Basamak: Dokuların Deparafinizasyonu

- 1) Hazırlanan kesitler etüvde 70 °C’de 1 saat bekletilir
- 2) Preperatlar ısınmış ksilolde 30 dk bekletilir
- 3) Etüvden çıkarıldıktan sonra soğuma işlemi için oda sıcaklığında 10 dakika bekletilir
- 4) %90’lık alkolde 1dakika
- 5) %70’lik alkolde 1dakika
- 6) %50’lik alkolde 1dakika
- 7) Distile suda 1-2 dakika bekletilir.

✓ 2. Basamak

- 1) H₂O₂ blokajı ile endojen peroksidaz aktivasyonunun inhibisyonu için solusyonda 10 dakika bekletilir
- 2) Çeşme suyunda 5 dakika bekletilir
- 3) Antijen Retrieval Solusyonu içinde düdüklü tencerede 3 dakika kaynatılır

- 4) Non spesifik boyanma inhibisyonu için “Protein Block Solution” 10 dakika uygulanır
- 5) Primer antikor uygulanır (60 dakika)
- 6) PBS ile 3 defa yıkama işlemi yapılır ve her yıkama 5 dakika bekletilir
- 7) Sekonder antikor uygulanır (15 dakika)
- 8) PBS ile yıkama işlemi yapılır (3x5 dakika)
- 9) Streptavidin-peroksidaz kompleksi uygulanır (20 dakika)
- 10) PBS ile yıkama işlemi yapılır (3x5 dakika)
- 11) 3-10 dakika DAB kromojen uygulaması yapılır
- 12) 1 dakika distile suda bekletilir.

✓ **3. Basamak: Hematoksilen Boyaması**

- 1) Hematoksilende 1 dakika
- 2) Distile suda 1dakika
- 3) %50’lik alkolde 1 dakika
- 4) %70’lik alkolde 1 dakika
- 5) %90’lık alkolde 1 dakika
- 6) Absolü alkol-ksilolde 1dakika
- 7) Ksilolde 10 dakika

Dokular; sıçanlara 10 mg/mL kaempferol, 10 mg/mL kaempferol yüklenmiş mikroküreler, yalnızca hyalurnik asit ve aljinant içeren mikroküreler, 10 mg/mL mit-c ve hiçbir malzeme uygulanmış olarak gruplandırıldı. Poly-L-lysin kaplı lamalara alınan ilgili doku kesitleri deparafinizasyon işleminden sonra immunohistokimya (IHC) yöntemi ile Collogen Tip I (1:250), Tip II (1:200) ve Tip IV (1:500), fibrinojen (1:100) antikorları ile bölüm 3.5.3.1 de ayrıntılı olarak açıklanmış olan prosedüre göre boyandı. IHC uygulanan preparatlar ışık mikroskopunda boyama şiddetine göre değerlendirildi ve fotoğrafları çekildi. Değerlendirme kullanılan boyanma şiddeti için; boyanma yok (-), hafif boyanma (+1), orta şiddette boyanma (+2), şiddetli boyanma (+3) parametreleri baz alınarak değerlendirme yapıldı.

3.9.4 Masson Trikrom Boyama

Kollojen fibrinlerin (kollojen bağ dokusu liflerinin) tespit edilip gösterilmesinde patoloji laboratuvarlarında kullanılan bir boyama yöntemidir. Formalinle fikse

edilmiş, parafine gömülmüş dokularda kullanılabildiği gibi donmuş dokularda da kullanım kolaylığı sağlamaktadır. Boyama işlemi kit aracılığı ile yapılmaktadır; kolajenelr mavi, kaslar kırmızı, çekirdek ise siyah/mavi tonlarında boyanmaktadır. Boyama işleminin yapıldığı preperatlar fibrozis yönünden değerlendirilir, değerlendirmede; 0: boyama yok, 1 kesitteki alanın %25 inden azında fibrozis var, 2: kesit alanının %25-50'sinde fibrozis var, 3: kesitteki alanın %50'sinden fazlasında fibrozis var ölçütleri baz alınır.

3.9.4.1 Masson Trikrom Boyama Prosedürü

Deparafinizasyon işlemi 3.5.3.1 de bahsedilen basamalar uygulanarak yapılır ardından GBL Masson Trikrom Kiti kullanılır. Kit presnsibi aşağıda verilmiştir.

A solüsyonu: Weigert demirli hematoksin

B Solüsyonu: Weigert demirli hematoksin

C Solüsyonu: Pikrik asit alkolik çözeltisi

D Solüsyonu: Gelincik kızılı fuksin çözeltisi

E Solüsyonu: Fosfomolibdik asit çözeltisi

F Solüsyonu: Masson anilin mavisi çözeltisi

5 damla A-5 damla B solüsyonu karıştırılır ve dokunun üzerini kaplayacak kadar 10 dk uygulanır → Preperat yıkama yapılmadan 30-60 dk oda sıcaklığında kurutulur → C Solüsyonu 4 dakika uygulanır → Distile suyla yıkama (5 sn) → D solüsyonu 4 dakika uygulanır → Distile suyla yıkama (5 sn) → E Solüsyonu 10 dk uygulanır → Yıkama yapılmadan F solüsyonu 5 dk boyunca uygulanır → Distile su ile yıkama (2x5 sn) → %70 Alkol 30 sn → %80 Alkol 30 sn → %90 Alkol 30 sn → Ksilen 5 dk → Ksilen 5 dk → Preperatlar kurutulduktan sonra ksilen bazlı yapıştırıcıyla lamel kapatılır.

3.10 Hazırlanan Mikrokürelerin Karakterizasyon Testleri

3.10.1 Taramalı Elektron Mikroskobu (SEM) Analizi

Hyalurnik asit- aljinat ve hayalurnik asit-aljinat- kaempferol ile hazırlanmış mikroküreler ile mikrokürelerin toz haline getirilmesiyle meydana gelen malzemenin yapıları SEM (FEI Quanta FEG 450, Çek Cumhuriyeti) ile görüntülenmiştir. Ayrıca darlık oluşturulan hayvanlara uygulanacak olan katatere kaplanmış kürelerin kalınlığı

da bu cihazda görüntülenmiştir. Hazırlanan mikrokürelerin gözenekleri, boyutlandırılması SEM (FEI Quanta FEG 450, Çek Cumhuriyeti) ile incelenmiş ve fotoğraflandırılmıştır.

3.10.2 Diferansiyel termal analiz (DTA) ölçümleri

Boş aljinat/hyalurnik asit küreler ve kaempferol yüklenmiş aljinat/hyalurnik asit küreler bölümler 3.2.5 ve 3.2.6’da anlatıldığı şekillerde hazırlandı ve 2 gün boyunca 37 °C de etüvde kurutulduktan sonra agat havan yardımı ile öğütülerek toz hale getirildi. Ardından aljinat/hyalurnik asit tozları, kaempferol yüklenmiş aljinat/hyalurnik asit tozları ve kaempferol ve toz hale getirilen boş ve mit-c yüklü kürelerin nemleri uzaklaştırılan örneklerin DTA ölçümleri 0-800 °C aralığında 10 °C/dak olacak şekilde alındı.

3.10.3 Diferansiyel taramalı kalorimetre (DSC)

DSC analizi için hazırlanan küreler iki gün boyunca 37 °C’de kurutuldu ve agat havanda dövülerek toz haline getirildi. Ardından aljinat/hyalurnik asit tozları, kaempferol yüklenmiş aljinat/hyalurnik asit tozları ve kaempferol ve toz hale getirilen boş ve mit-c yüklü kürelerin nemleri uzaklaştırılan örneklerin DTA ölçümleri 0-800 °C aralığında 10 °C/dak olacak şekilde alındı.

3.10.4 Hazırlanan Mikrokürelerde kullanılan Mit-c ve Kaempferolün HPLC

Analizleri

HPLC ile test edilen maddelerin kolondan çıkış zamanına göre analiz edilmesini sağlamaktadır. Bu test yönteminde tes edilecek madde uygun bir çözücünde çözüldükten sonra mobil fazda kolon boyunca taşınan numuneler sabit fazda bir süre alıkonulduktan sıvının hareket etmesi için basınç uygulanır ve farklı bileşenler kolondan farklı zamanda geçmiş olur. Ardından dedektörle ile miktar tayini yapılır ve cihazın bağlı olduğu bilgisayar yardımıyla yorumlanır (45). Deneylerde kullanılan mit-c ve kaempferolün saflığını göstermek amacıyla yapılmıştır.



4. BULGULAR

4.1 Mikrokürenin Sentezlenmesi ve İlaç Salım Testleri

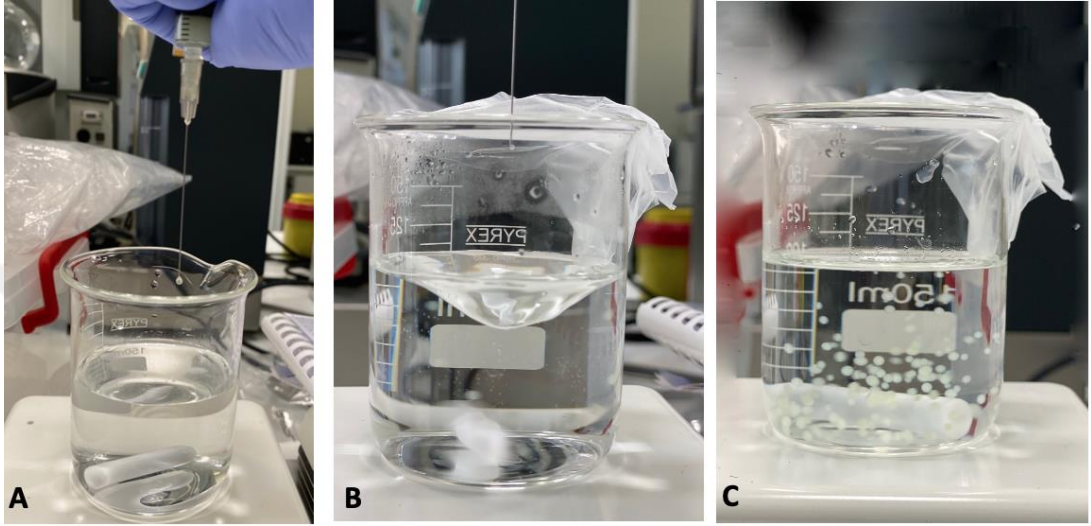
Hazırlanan Hyalurnik asit-aljinat çözeltisi 24 saat boyunca oda koşullarında manyetik karıştırıcı tabla üzerinde karıştırılmıştır. Çözelti içerisinde 1 mL konsantrasyonu 10 mg/mL olan kaempferol eklenmiştir. Malzemeler homojen bir şekilde karışana kadar beklenmiş ardından 2 mL enjektör içine alınmıştır. 100 mL %5 lik CaCl_2 manyetik karıştırıcı üzerinde manyetik balık ile karıştırılırken hazırlanan ve enjektör içine alınan jel tek tek düşecek şekilde çapraz bağlayıcı içine damlatılmıştır. 30 dk boyunca çağraz bağlanmaya devam etmesi beklenmiştir. Yapılan işleminin sonrasında hazırlanan küreler serum fizyolojik ile üç tekrarlı olarak yıkanmıştır.

Hazırlanan mikrokürelerin uygun pH, çapraz bağlayıcı konsantrasyonu ve ilaç konsantrasyonu ayarlama işlemi için birçok farklı konsantrasyon ve yöntem denendi. Asidik ortamda (pH:4, pH 4.5, pH 5, pH 5.5, pH 6) hazırlanan mikrokürelerin mikroküre yapısında olmadığı, mikroküre şeklini almadan parçalanarak dağıldığı tespit edildi. Ortam pH'sı 7.5'in üzerinde olduğunda ise mikroküre boyutlarının sabit olmadığı ve homojen yapının değiştiği gözlemlendi.

Çapraz bağlayıcı olarak kullanılan CaCl_2 'nin konsantrasyonu %1-10 arasında farklı konsantrasyonlarda denendi, mikroküre boyutlarının birbiri arasında en az farklılık gösterdiği, morfolojik bütünlüğünü koruduğu ve hazırlanan ilaç konsantrasyonunda esneklik sağladığı konsantrasyonun %4 CaCl_2 olduğu gözlemlendi. Çapraz bağlayıcıda partiküllerin kalma süresi ise yine morfolojik yapılarının bozunmadığı ve etken maddeyi bırakmadığı süre olarak 30 dk oda sıcaklığı (20-25 °C) olduğu belirlendi. Mikrokürelerin sentezi sırasında manyetik karıştırıcı en önemli basamaklardan bir tanesidir. Çapraz bağlayıcı ile temas eden polimerik yapının şekil alması ve şeklini kaybetmemesini sağladığı gibi çapraz bağlayıcının polimerle hızlı bir şekilde etkileşime girmesine de destek olur.

Mikrokürelerin sentezindeki son basamak etken madde yükleme basamağıdır. Etken maddenin konsantrasyonunun belirlenmesi, belirlenen konsantrasyonda ilaç salımı

süresi bu basamağın en önemli noktasıdır. pH 6.5, pH 7 ve pH 7.5 %4'lük CaCl_2 ile hazırlanan mikrokürelerin salımları incelendiğinde pH 7'de istenilen salım aralığında olduğu (10 gün) tespit edildi. Diğer pH'larda salım hızlı ve dengesiz bir tutum sergiledi. Test edilen tüm farklı koşullar ile birlikte; pH7'de, %4 CaCl_2 içeren çapraz bağlayıcı ortamında ve manyetik karıştırıcı üzerinde sentezlenmesi kararlaştırıldı ve gerçekleştirildi.



Şekil 4.1. Mikrokürelerin hazırlanma aşaması

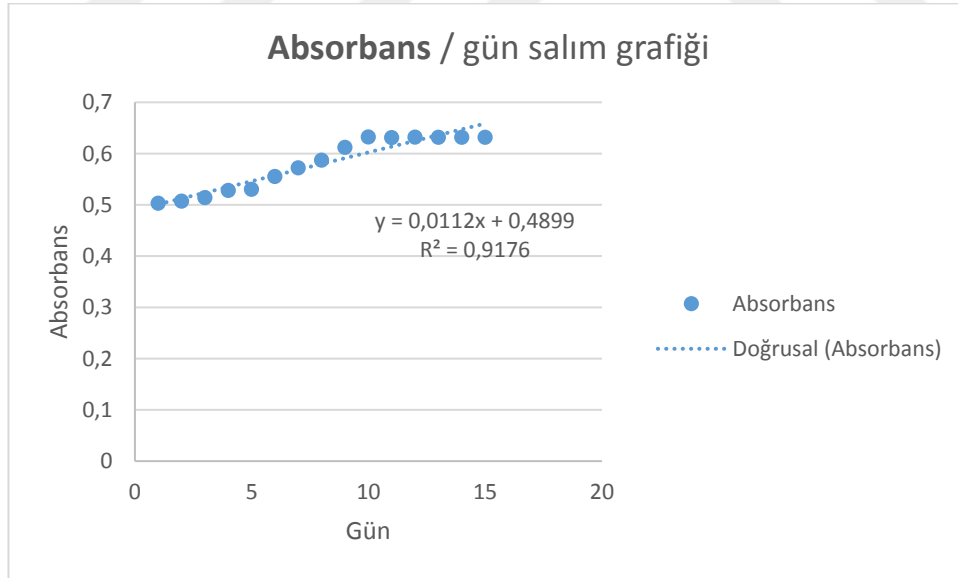
(A: hazırlanan hidrojinin içine damlatılacağı çapraz bağlayıcı solüsyonu ve ince uçlu enjektör, B: karıştırıcı çalışır durumdayken enjektörden kürenin damlatılması, C: Damlatma sonrası manyetik karıştırıcı üzerinde küreler)

4.2 İlaç Salım Süresinin Hesaplanması

Hazırlanan mikroküreler 10 mL SF içerisinde oda sıcaklığında ($22 \pm 2^\circ\text{C}$) bir falkon tüpe aktarılmış ve 15 gün boyunca 365 nm de Uv-Vis Mikroplaka okuyucu (SpektraMax 190) da absorbans ölçümleri yapılmıştır. Absorbasın okumasının yapıldığı günler ve alınan absorbans değerlerine göre dağılım grafikleri oluşturulmuştur. Okunan absorbans değerleri incelendiğinde; okunan absorbans değeri 10.günde maksimum seviyeye ulaştığı tespit edilmiştir. 10.günün ardından okunan absorbanslar benzer değerler göstermiştir, ilacın salındığını göstermektedir. Hazırlanan mikrokürelerin salım kapasitlerinden yapılan hesaplamalarda her bir kürenin 0,1 mg kaempferol içerdiği hesaplanmıştır.

Çizelge 4.1. Günlere göre okunan absorbands değerleri

Gün	Absorbans	Gün	Absorbans
1.gün	0,503	8.gün	0,587
2.gün	0,507	9.gün	0,612
3.gün	0,514	10.gün	0,6323
4.gün	0,528	11.gün	0,631
5.gün	0,53	12.gün	0,632
6.gün	0,555	13.gün	0,6316
7.gün	0,572	14.gün	0,6315
15.gün	0,6317		

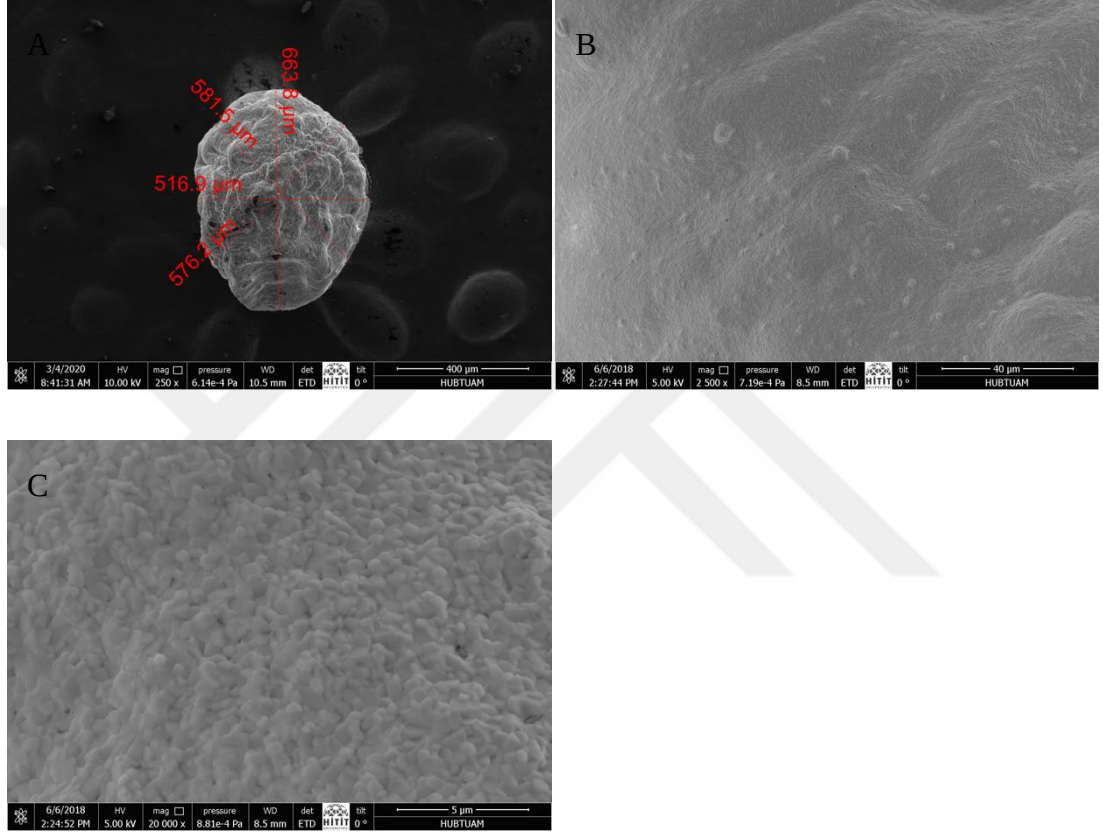


Şekil 4.2. Günlere göre okunan absorbands değerleri

(y: okunan absorbands değeri x: gün)

4.3 Hazırlanan Mikrokürelerin SEM Karakterizasyonu

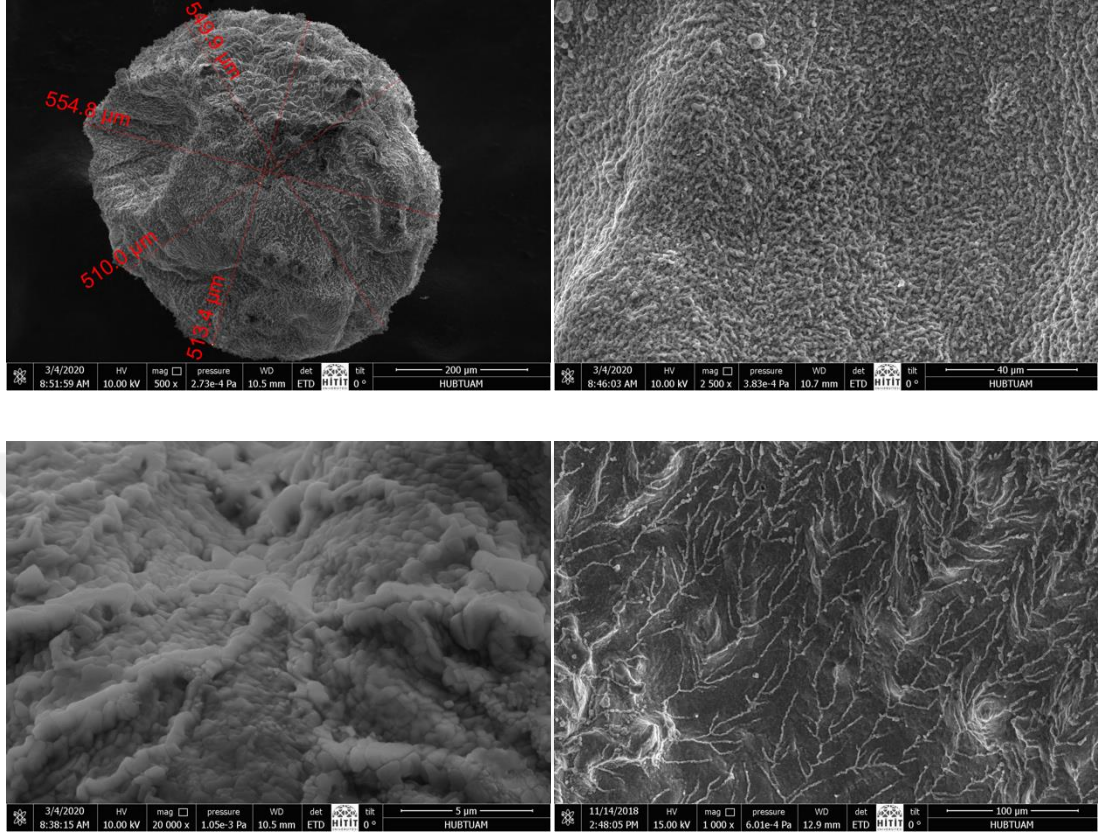
Hazırlanan mikrokürlerin boyutlandırılması için Quanta FEG 450 SEM cihazı ile görüntü alınmıştır. Görüntüler yüksek vakum altında 10.00 KV ve farklı büyütmelerde gerçekleştirilmiştir. Ölçeklendirme işlemi cihazın kendi yazılımı ile yapılmıştır. Ayrıca kürelerdeki gözenekler ve yapı yine SEM cihazı ile 10.000-20.000 büyütme aralığında gözlemlenmiştir.



Şekil 4.3. Hyalurnik asit (HA) mikroküresinin SEM görüntüleme resimleri

(A: mikrokürenin boyutları, B,C: Farklı büyütme aralıklarında mikrokürenin yapısı)

Kaemferol yüklenmeyen boş kürelerin boyutları 558 ± 14 µm arasında değişmektedir. Ayrıca kürelerin farklı alanlarından çekilen SEM görüntülerinde yapının aynı olduğu, bütünlüğünde farklılık olmadığı gözlemlenmektedir. Kurutma işlemine bağlı olarak çöküntüler gözlemlenmektedir.



Şekil 4.4. Kaempferol yüklenen mikrokürenin SEM görüntüleme resimleri

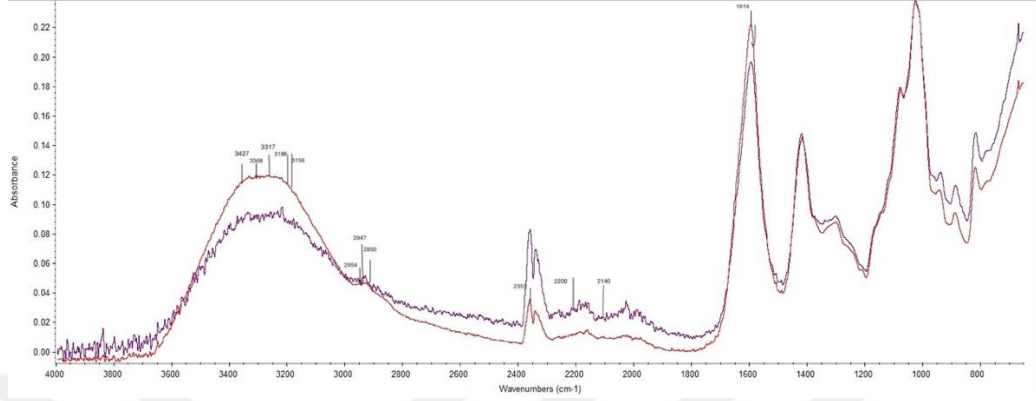
(A: mikrokürenin boyutları, B,C,D: Farklı büyütme aralıklarında mikrokürenin yapısı)

Kaempferol uygulanan mikrokürelerin morfolojik yapısı ve boyutlandırılması SEM cihazı ile yapılmıştır. Yapılan görüntüleme işleminde kürelerin farklı alanlarında aynı morfolojik yapıya sahip oldukları, por yapılarının bulunduğu ve kurutma işlemine ait çöküntüler mevcuttur. Alınan 80-85 farklı mikroküreden ölçeklendirmelere göre; kaempferol yüklü mikrokürelerin boyutları $525 \pm 15 \mu\text{m}$ arasında değişmektedir.

4.4 Hazırlanan Mikrokürelerin FT-IR Karakterizasyonu

FT-IR Spektrum okumasında kaempferol içermeyen hyalurnikasıit-aljinattan hazırlanan boş mikroküreler, kaempferol içeren mikroküreler ve yalnızca kaempferol kullanılmıştır. Alınan FT-IR değerleri aşağıdaki grafikte verilmiştir. Hazırlanan KYMK'ların spektrumu $\sim 3427 \text{ cm}^{-1}$, 3368 cm^{-1} ve 3317 cm^{-1} (fenolik OH stretching),

~2954- ~2850 cm^{-1} ve 2947 cm^{-1} (CH stretching) zirveleri göstererek kaempferolün karakteristik absorbans zirveleri ile örtüştüğü tespit edildi. Bu sonuçlar mikrokürelerde kaempferolün bulunduğunu ve kullanılan kaempferolün fenolik bileşik özelliğini kaybetmediğini göstermektedir. Şekil 4.5’ de FT-IR’a ait spektrum grafiği verilmiştir.



Şekil 4.5. Kaempferol yüklenen ve yüklenmeyen mikrokürelerin FT-IR spektrum okumasında pik değerleri

(kırmızı: KYMK, Mor: MK, kymk: Kaempferol yüklenen mikroküreler, MK kaempferol yüklenmemiş mikroküreler)

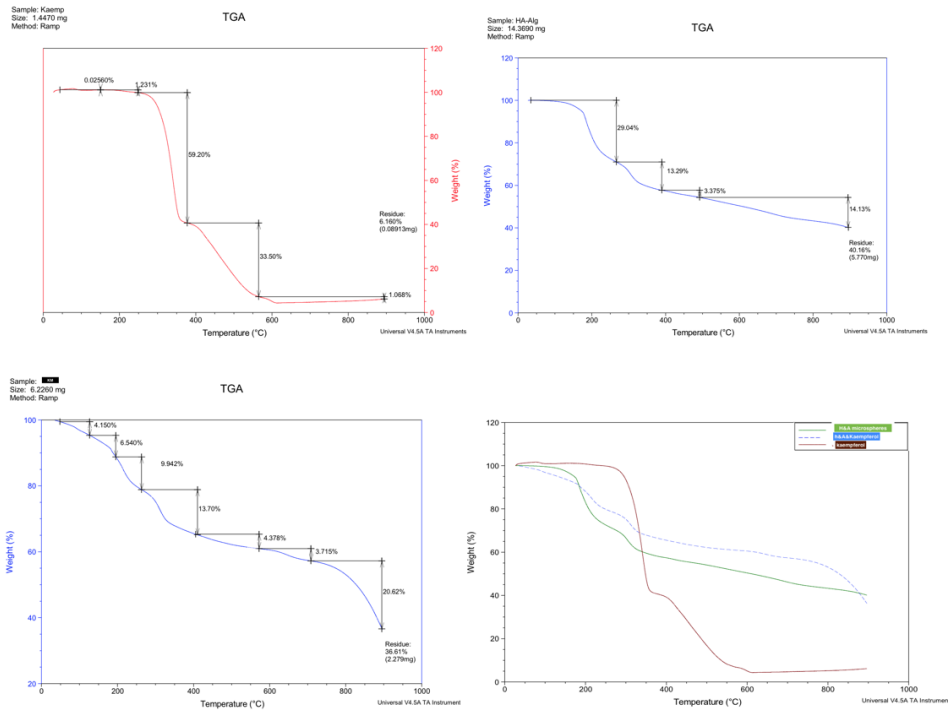
4.5 Hazırlanan Mikrokürelerin TGA Analizleri

TGA ile kütle kayıplarına bakılarak; kaempferol içermeyen hyalurnik asit-aljinattan hazırlanan boş mikroküreler, kaempferol içeren mikroküreler ve yalnızca kaempferol kullanılmıştır.

Uygulanan deney sonuçları incelendiğinde; hazırlanan MK, KYMK ve kaempferol aynı koşullar altında TGA testine tabii tutulmuş ve malzemelerin gösterdikleri kütle kayıplarına göre durumları tespit edildi. Bu veriler detaylı olarak incelendiğinde; TGA analizinde 1,4770 g kullanılan kaempferolün Tg 397,66 ° C’ye kadar %60’lık bir kütle kaybı belirlendi. Hazırlanan kaempferol yüklenmemiş boş mikrokürelerden test için 14,3690 g kullanıldı ve Tg 250 ° C’ye kadar %29.04’lük bir kütle kaybı belirlendi. 2.2260 mg kaempferol & hyalurnik asit & aljinat mikroküre için Tg sıcaklığı 150 ° C’ye kadar %4.150 kütle kaybı, 150 ° C ile 210 ° C arasında %6.540 kütle kaybı, 210 ° C -380°C’de %9.942 kütle kaybı, 280 ° C ile 410 ° C arasında %13.70, 410-580 ° C’de %4.378, 580 ° C’de -710 ° C’de % 3.715. 710-850 ° C arasında, % 20.62’lik bir kütle

kaybının olduğu belirlendi ve finalde kalan %36,61 (2.279 mg) olmuştur.

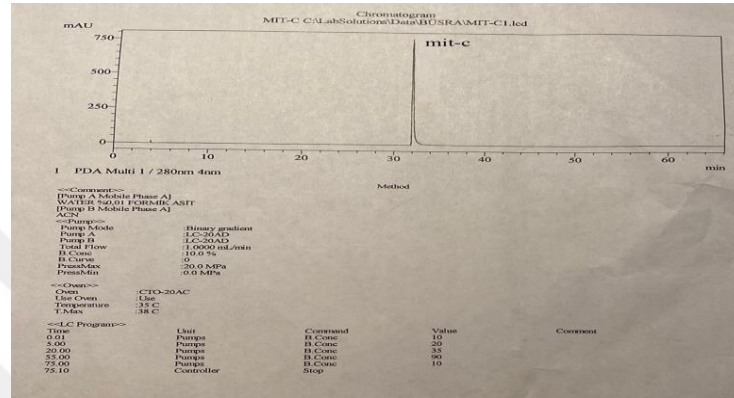
Hazırlanan polimerik mikrokürelerin arasındaki çapraz bağlanma ve etkileşim, polimer kompozitin termal stabilitesinde TGA ile gösterilebilen değişikliklere neden olabilir. Grafikte, ilk düşüş keskin olarak 210 °C'de %29,04 kütle kaybıyla gözlemlendi, bundan önce olan göz ardı edilen düşüş yapıda bulunana serbest suyun uzaklaşması olarak değerlendirildi. 400 °C ve 500 °C'de ikinci ve üçüncü bir ayrışma gözlemlendi ve ağırlık kaybı sırasıyla %13,29 ve %3,375'e ulaştı, buradaki kütle kaybı alijinat olarak değerlendirildi. Ardından deney sonlanmasına kadar geçen zamanda 800 °C'de %14,13'lük son düşüş gözlemlendi. Oda sıcaklığı ve 800°C arasında 10°C/dak da gerçekleşen deneyde toplam kütle kaybı %59,84 olmuştur. Ortamda kalan %40,16'lık sentez maddesi mikrokürelerin hazırlandığı polimerler arasında oluşan yüksek moleküller arası bağdan kaynaklanmaktadır. Ayrıca çapraz bağlama işlemi için kullanılan CaCl_2 solüsyonu iyonik etkileşimlerle mikrokürelerin termal stabilitesini arttırmış olabilir. Şekil 4.5'de verilen grafiklerde kütle kayıpları detaylı olarak gösterilmiştir.



Şekil 4.6. Kaempferol, boş mikroküre ve kaempferol yüklenen mikrokürelerin TGA grafikleri

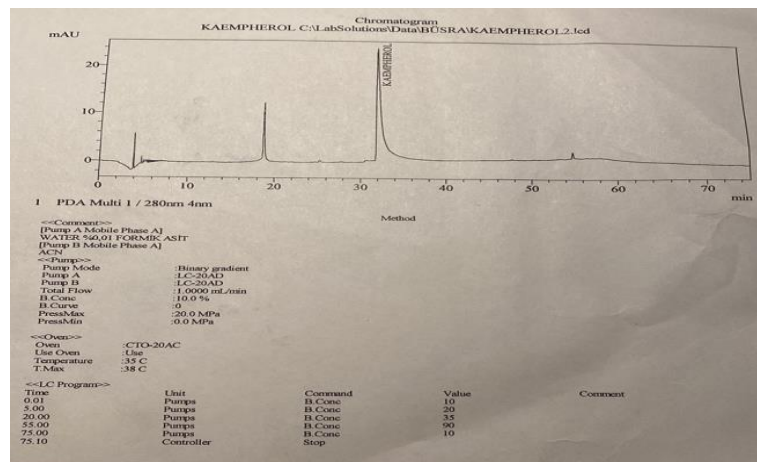
4.6 Hazırlanan Mikrokürelerde kullanılan Mit-c ve Kaempferolün HPLC Analizleri

Mit-c ve kaempferolün saflığının belirlenmesi için HPLC cihazı kullanılmıştır. Kimyasallara uygun kolonlar kullanılarak yapılan test sonrasındaki kromatogramı şekilde verilmiştir. Mit-c'ye ait kromatogramda deneylerde kullanılan mit-c'nin yüksek saflıkta olduğunu göstermektedir.



Şekil 4.7. Mit-c'ye ait HPLC kromatogramı

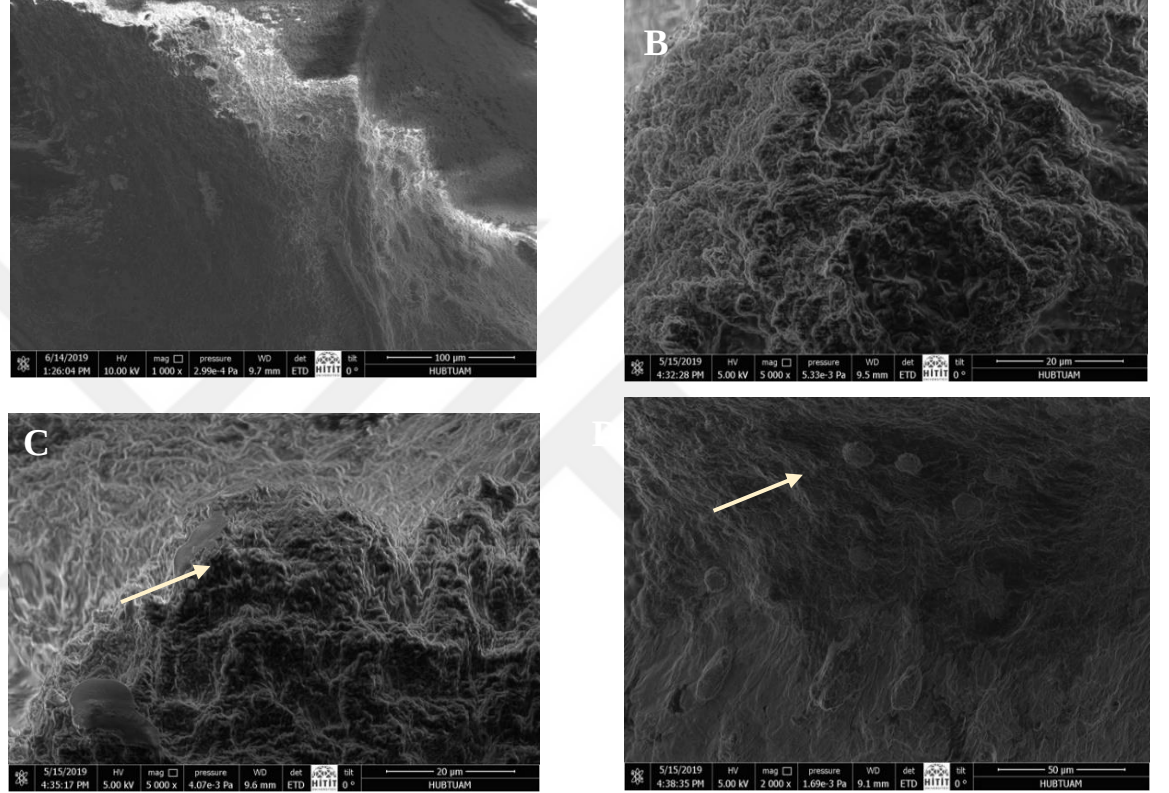
Kaempferole ait HPLC kromatogramı şekilde verilmiştir. Fenolik bileşikler yüksek saflıkta bile farklı kromatogram gösterebilmektedir. Yapılan hesaplamalar sonucunda kullanılan %98 saflıktaki kaempferolün pik değeri, ticari olarak satın alınan kaempferolünki ile eşleşmektedir.



Şekil 4.8. Kaempferole ait HPLC kromatogramı

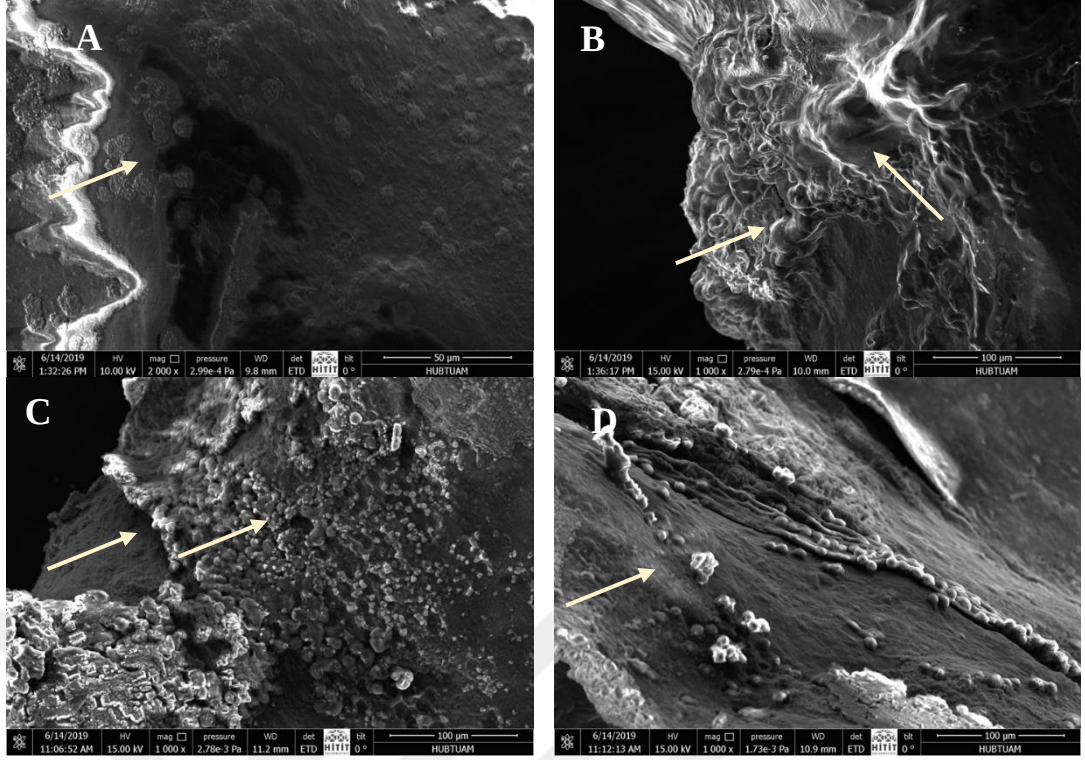
4.7 Hazırlanan Mikrokürelere L929 ve Üretra hücrelerinin Yapışma Testi

Katater etrafına kaplanan kaempferol, mit-c, ilaç yüklü ve ilaç yüklenmeyen küreler üretra ve L929 fibroblast hücreleri ile muamele edilmiş ve yapışan hücrelerin görüntülenmesi için SEM cihazı kullanılmıştır.



Şekil 4.9. L929 fibroblast hücrelerinin kaempferol yüklenmemiş ve kaempferol yüklenen mikrokürelere ait hücre yapışma resimleri

(A,B: L929 hücresi uygulanan kaempferol yüklenen mikrokürelerin SEM görüntüleri, C,D: L929 hücresi uygulanan kaempferol yüklenmemiş, boş kürelerin SEM görüntüleri)



Şekil 4.10. Üretra epitel hücrelerinin kaempferol yüklenmemiş ve kaempferol yüklenen mikrokürelere ait hücre yapışma resimleri

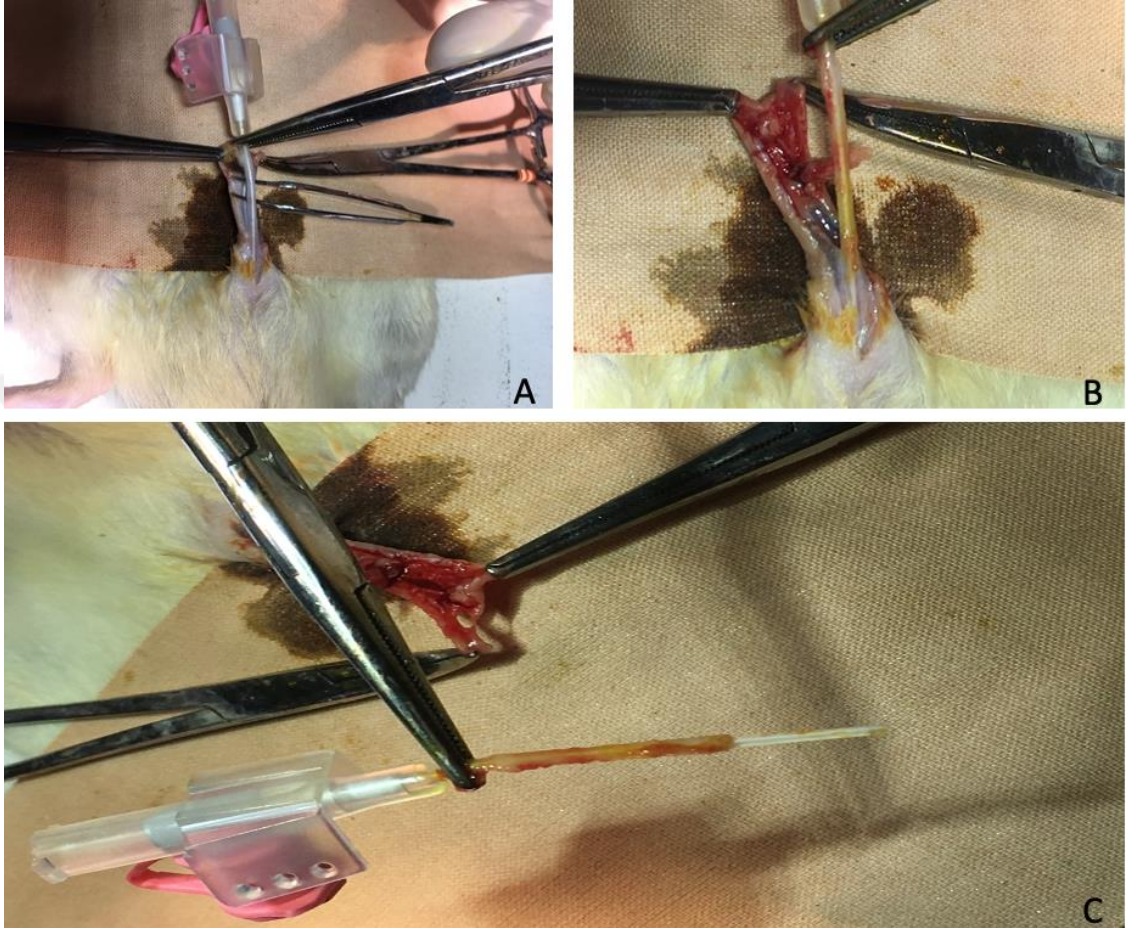
(A,B: üretra epitel hücresi uygulanan, kaempferol yüklenmemiş boş kürelerin SEM görüntüleri, C,D: üretra epitel hücresi uygulanan, kaempferol yüklenen mikrokürelere ait hücre yapışma SEM görüntüleri)

Yapılan hücre yapışma testi ile hazırlanan malzemelerin sadece hücreler üzerindeki etkisi değil, hücrelerin malzemeye tepsiği değerlendirilmiştir. L929 fibroblast hücreleri kaempferol yüklü mikrokürelere yaygın bir çoğalma göstermezken, üretra epitel hücreleri yaygın bir çoğalma göstermektedir.

4.8 Primer Dokudan Üretra Epitel Hücrelerinin İzolasyonu

Araştırmada yapılması planlanan in vitro testler ve ilaç için uygun konsantrasyon belirlemek amacıyla gerekli olan üretra epitel hücreleri; erkek sıçanların üretralarından elde edilmiştir. Bu amaç doğrultusunda hayvanlar anestezi etkisi altında iken üretra kanalına katater ile girilmiş; oşpenis ve üretranın etrafındaki diğer dokulardan arındırılmış ve Şekil 4.11 de detaylı bir şekilde fotoğraflandırılmıştır. Dokuların hayvandan çıkarılmasını takiben, doku örnekleri antibiyotikli taşıma solüsyonu içeren şişelere alınarak polistiren kutularda buz kasetleri ile laboratuvara taşındı. Dokunun

steril olduğuna emin olunduktan sonra steril besiyeri (DMEM) içerisine alınmış ve zaman kaybı yaşanmadan Kırıkkale Üniversitesi Bilimsel Teknolojik Uygulama ve Araştırma Merkezi (KÜBTUAM), İn vitro biyoyumluluk laboratuvarına götürülmüştür.

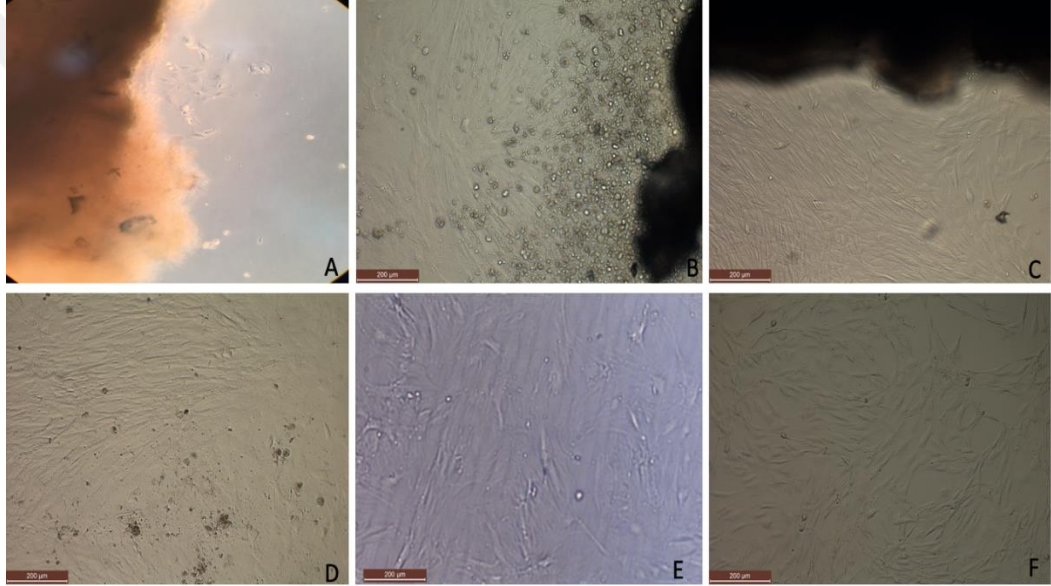


Şekil 4.11. Erkek sıçandan üretranın çıkarılması

(A: hayvan anestezi altındayken penis içerisinden üretranın belirlenmesi ve katater ile girilmesi, B: üretranın dış dokulardan arındırılması, C: üretra dışındaki dokulardan arındırılması ve katater üzerinde görünümü)

Örnekler, laboratuvarında laminar akışlı flow kabin içerisinde antibiyotikli PBS ile üç tekrarlı olarak yıkandıktan sonra petrilere yerleştirilerek, steril pens, makas ve bistüri yardımı ile dokunun önce dış kısmında kalan bağ doku ve damar parçaları uzaklaştırıldı. Dokular yeterince temizlendikten sonra her biri ayrı steril petri kutularına alındı. Bu işlem herhangi bir kontaminasyon ihtimaline karşı beş farklı erkek sıçandan alınmıştır.

Üretranın iç epitelinden hücreleri izole etmek için steril bir bistüri ile nazikçe kazındı ve çok küçük parçalara ayrıldı, bu işlem steril petri kaplarında yapıldı. Bu işlemlerin ardından kollajenaz enzimi ile 30 dakika inkübe edildi ve santrifüj edilerek dipte kalan doku parçaları alındı. Ardından 25cm² lik flasklara koyulan parçaların üzerine 3 mL medyum ilave edildi ve inkübatörde (37°C, %5 CO₂, %95 hava) inkübasyona bırakıldı. Doku örnekleri hergün mikroskop altında incelendi ve hücrelerin çoğalmasına paralel olacak şekilde 48 saatte bir vasat atılarak taze medyum eklendi. Hücrelerin dokudan dökülmesi gün gün takip edilmiş ve 4. Günden sonra hücrelerin dökülmeye başladığı tespit edilmiştir. Hücrelerin flasklara dokudan dökülmesi ve pasaj yapıldıktan sonraki görüntüleri şekil 16 da detaylı bir şekilde verilmiştir.



Şekil 4.12. Primer kültür ile elde edilen üretra epitel hücreleri

(A: 3.günde dokudan dökülen üretra epitel hücreleri, B: 9. günde dokudan dökülen üretra epitel hücreleri, C, D: 14. Günde flaskı kaplayan p0 olarak kabul edilen üretra epitel hücreleri, E: 2. Pasaj sonrası üretra epitel hücreleri, F: 5. Pasaj sonunda üretra epitel hücreleri)

Hüseyin Aytemiz Deney Hayvanları Laboratuvarı'nda gerçekleşen sakrifikasyon ile 7 farklı erkek sıçandan alınan üretra kanalı zaman kaybetmeden KÜBTAL In Vitro Biyoyumumluluk Laboratuvarına getirildi. Primer hücre kültürü yöntemi ile üretra epitel hücreleri elde edildi Üretra epiteli tipik epitel hücre morfolojisinde kısmen daha şeffaf ve geniş sitoplazma hacmine sahiptir. Bir hayvandan alınan ve primer kültürü yapılan dokudan elde edilen hücre pasaj sonlandırma sayısını belirlemek amacıyla

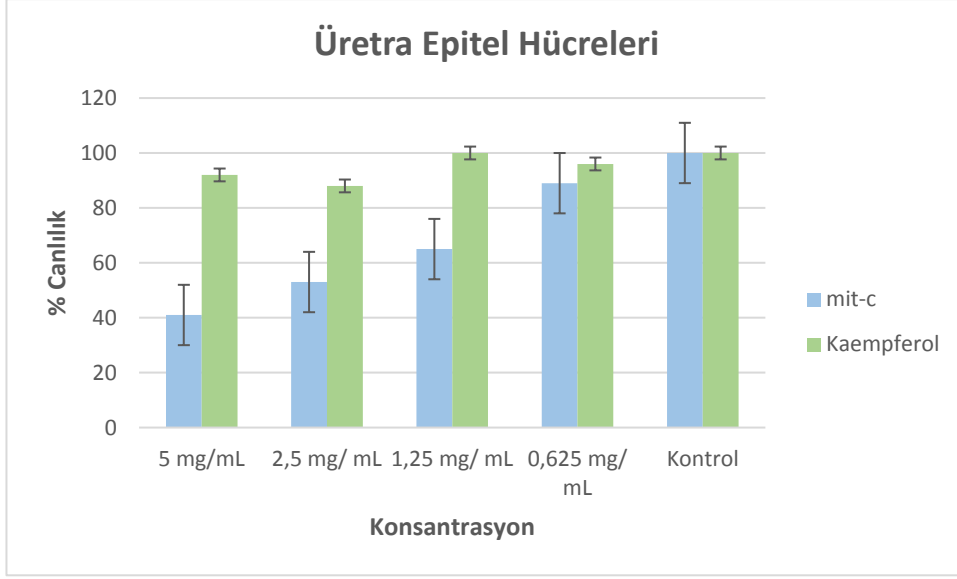
çoğalmasını takiben pasajlandı ve 8. Pasajdan alınan hücrelerin yeniden ekimi yapıldığında hücrelerin keratinosit farklılaşma yaptığı gözlemlendi. Bu sebeple in vitro testlerde kullanılan üretra epitel hücreleri 4-6 pasaj aralığında çalışıldı.

4.9 İlaç Yüklenmiş ve Yüklenmemiş Mikrokürelerin, Kaempferol ve Mit-c Uygulanan Üretra Epitel Hücrelerinin Toksisitesinin MTT ile Belirlenmesi

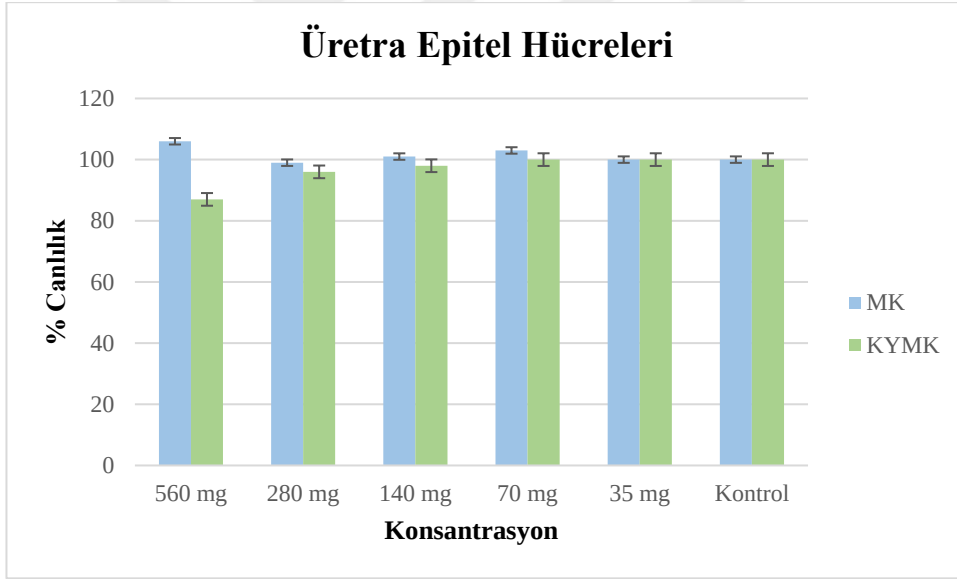
Çalışmada kaempferolün (10 mg/mL), mit-c'nin ve ilaç yüklenmiş ve yüklenmemiş mikrokürelerin L929 fibroblast hücrelerindeki ve üretra epitel hücrelerindeki toksisitesi MTT testi ile belirlenmiştir. Bu testte negatif kontrol grubu olarak sadece besiyeri, pozitif kontrol grubu olarak lateks kullanılmıştır. Çizelge 4.2'de farklı konsantrasyonlarda uygulanan kaempferolün (5 mg/mL, 2,5 mg/mL, 1,25 mg/mL, 0,625 mg/mL), mit-c'nin (5 mg/mL, 2,5 mg/mL, 1,25 mg/mL, 0,625 mg/mL) ve ilaç yüklenmiş 560 mg küre 5,6 mg/mL kaempferol, 280 mg küre 2,8 mg/mL, 140 mg küre 1,4 mg/mL, 70 mg küre 0,7 mg/mL, 35 mg 0,35 mg/mL kaempferol içermektedir.) ve kaempferol yüklenmemiş mikrokürelerin (560 mg/mL, 280 mg/mL, 140 mg/mL, 70 mg/mL ve 35 mg/mL mikroküre) 37°C 24 saat sonunda üretra epitel hücrelerindeki canlılığı gösterilmektedir. Kontrol gruplarında üretra epitel hücrelerinde sitotoksik etkisinin olmadığı, canlılığın %100 kabul edildiği gösterilmiştir

Çizelge 4.2. Hazırlanan kimyasalların ve mikrokürelerin üretra epitel hücreleri üzerindeki MTT sitotoksosite testi sonucundaki sitotoksik etkileri ve % canlılık değerleri

MTT		Absorbans (570nm)	% Canlılık
Mit-c	5 mg/mL	0,2205	41±1,23
	2,5 mg/ mL	0,2815	53±0,28
	1,25 mg/ mL	0,345	65±0,76
	0,625 mg/ mL	0,4695	89±0,66
K	5 mg/mL	0,4885	92±0,85
	2,5 mg/ mL	0,467	88±0,95
	1,25 mg/ mL	0,5285	100±0,85
	0,625 mg/ mL	0,5095	96±0,66
KYMK	5,6 mg Kaempferol içeren	0,4575	87±1,23
	2,8 mg Kaempferol içeren	0,506	96±0,57
	1,4 mg Kaempferol içeren	0,5175	98±0,09
	0,7 mg Kaempferol içeren	0,5295	100±0,28
	0,35 mg Kaempferol içeren	0,5275	100±0,09
MK	560 mg	0,558	106±8,37
	280 mg	0,5255	99±1,04
	140 mg	0,5345	101±0,47
	70 mg	0,5465	103±0,47
	35 mg	0,529	100±0,95
Kontrol	Besi yeri	0,5256	100±0,039



Şekil 4.13. Uygulanan kaempferol ve Mit-c'nin üretra epitel hücrelerinde MTT Testi sonucundaki canlılık düzeyleri (Mit-c: Mitomycin-c)



Şekil 4.14. Hazırlanan mikrokürelerin üretra epitel hücrelerinde WST-1 Testi sonucundaki canlılık düzeyleri

(KYMK: Kaempferol Yüklenmiş Mikroküre, MK: ilaç yüklenmemiş mikroküre, Kaempferol yüklü mikroküreler için; 560 mg küre 5,6 mg/mL kaempferol, 280 mg küre 2,8 mg/mL, 140 mg küre 1,4 mg/mL, 70 mg küre 0,7 mg/mL, 35 mg 0,35 mg/mL kaempferol içermektedir.)

Üretra ve L929 Fibroblast hücreleri üzerinde yapılan sitotoksikite testlerinden MTT sonucunda; kontrol ve test maddelerinin 24 saatlik inkübasyonu sonucunda elde edilen

absorbans verilerine göre ortalamalar hesaplandı. İn vitro değerlendirme sonucu elde edilen veriler, istatistiksel olarak F Testi uygulanarak belirlendi. F Test varyanslar için iki örnek sonuçlarına göre;

Üretra Hücreleri MTT İstatistik Sonuçları; ($F < F_{ölçüt}$; $p > 0.05$)

Kaempferol, KYMK ve MK için, yapılan Anova Tek Etken analizleri sonucunda ortalamalar yönünden karşılaştırılan iki grup birbiri ile uyumlu bulunmuştur ($F < F_{ölçüt}$; $p > 0.05$). Ayrıca, F test ile değerlendirilen sonuçların standart sapmalar yönünden de birbiri ile uyumlu olduğu ve gruplar arasında homojen bir dağılım olduğu görülmüştür ($F < F_{kritik}$). Saptanan değerler %95 güven aralığında belirlenmiş olup %5'lik anlamlılık düzeyinde yokluk hipotezi ($H_0: \mu_1 = \mu_2$) kabul edilmiştir.

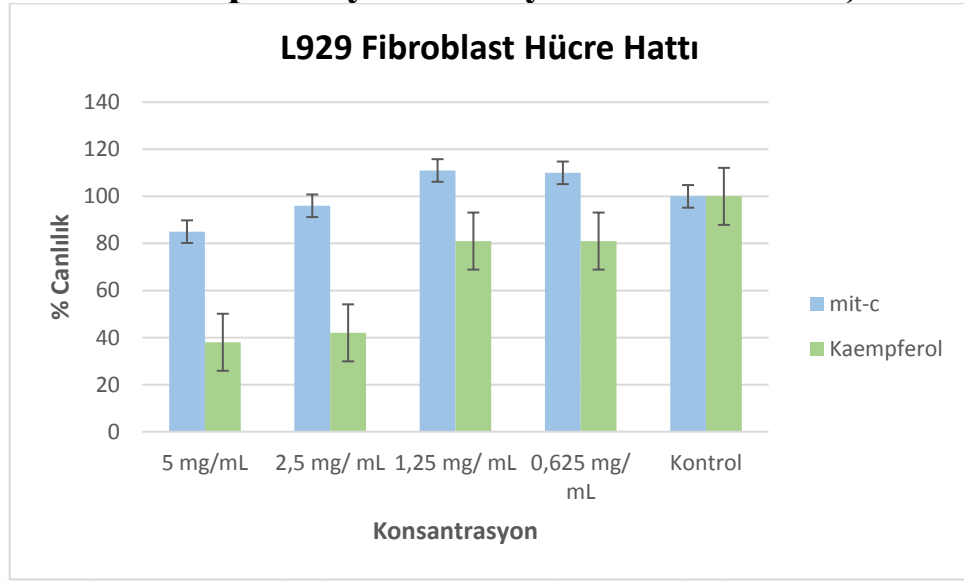
4.10 İlaç Yüklenmiş ve Yüklenmemiş Mikrokürelerin, Kaempferol ve Mit-c Uygulanan L929 Fibroblast Hücrelerinin Toksisitesinin MTT ile Belirlenmesi

Çalışmada kaempferolün (10 mg/mL), mit-c'nin ve ilaç yüklenmiş ve yüklenmemiş mikrokürelerin L929 fibroblast hücrelerindeki toksisitesi MTT testi ile belirlenmiştir. Bu testte negatif kontrol grubu olarak sadece besiyeri, pozitif kontrol grubu olarak lateks kullanılmıştır. Çizelge 4.3'de farklı konsantrasyonlarda uygulanan kaempferolün (10 mg/mL'lik konsantrasyondan 100 µl, 50 µl, 25 µl ve 12,5 µl), mit-c'nin (10 mg/mL'lik konsantrasyondan 100 µl, 50 µl, 25 µl ve 12,5 µl) ve ilaç yüklenmiş (56, 28, 14, 7 ve 3,5 mikroküre) ve kaempferol yüklenmemiş mikrokürelerin (56, 28, 14, 7 ve 3,5 mikroküre) 37°C 24 saat sonunda L929 fibroblast hücrelerindeki canlılığı gösterilmektedir. Kontrol gruplarında üretra epitel hücrelerinde sitotoksik etkisinin olmadığı, canlılığın %100 kabul edildiği gösterilmiştir.

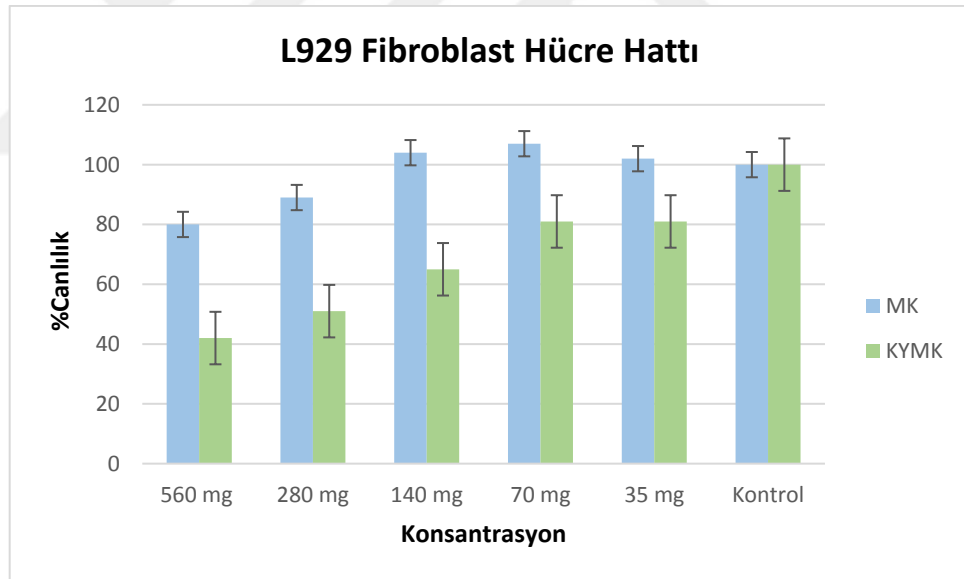
Çizelge 4.3. Hazırlanan kimyasalların ve mikrokürelerin L929 fibroblast hücreleri üzerindeki MTT sitotoksosite testi sonucundaki sitotoksik etkileri ve % canlılık değerleri

MTT		Absorbans (570nm)	% Canlılık
Mit-c	5 mg/mL	0,991	85±0,17
	2,5 mg/ mL	1,1204	96±3,41
	1,25 mg/ mL	1,287	111±0,13
	0,625 mg/ mL	1,274	110±0,6
K	5 mg/mL	0,443	38±0,99
	2,5 mg/ mL	0,489	42±0,73
	1,25 mg/ mL	0,942	81±3,24
	0,625 mg/ mL	0,938	81,±0,21
KYMK*	5,6 mg Kaempferol içeren	0,488	42±0,64
	2,8 mg Kaempferol içeren	0,590	51±0,64
	1,4 mg Kaempferol içeren	0,758	65±0,38
	0,7 mg Kaempferol içeren	0,939	81±0,34
	0,35 mg Kaempferol içeren	0,947	81±0,08
MK**	560 mg	0,941	80±0,43
	280 mg	1,04	89±0,77
	140 mg	1,208	104±0,04
	70 mg	1,239	107±2,42
	35 mg	1,181	102±0,17
Kontrol	Besi yeri	1,157	100±0,04

(*KYMK: Kaempferol yüklenen mikroküreler,** MK: Kaempferol yüklenmeyen mikroküreler)



Şekil 4.15. Uygulanan kaempferol ve Mit-c'nin üretra epitel hücrelerinde MTT Testi sonucundaki canlılık düzeyleri (Mit-c: Mitomycin-c)



Şekil 4.16. Uygulanan kaempferol ve Mit-c'nin L929 hücrelerinde MTT Testi sonucundaki canlılık düzeyleri (K: Doğrudan uygulanan kaempferol, Mit-c: Mitomycin-c)

(KYMK: Kaempferol Yüklenmiş Mikroküre, MK: ilaç yüklenmemiş mikroküre, Kaempferol yüklü mikroküreler için; 560 mg küre 5,6 mg/mL kaempferol, 280 mg küre 2,8 mg/mL, 140 mg küre 1,4 mg/mL, 70 mg küre 0,7 mg/mL, 35 mg 0,35 mg/mL kaempferol içermektedir.)

Üretra ve L929 Fibroblast hücreleri üzerinde yapılan sitotoksosite testlerinden MTT sonucunda; kontrol ve test maddelerinin 24 saatlik inkübasyonu sonucunda elde edilen absorbans verilerine göre ortalamalar hesaplandı. İn vitro değerlendirme sonucu elde edilen veriler, istatistiksel olarak F Testi uygulanarak belirlendi. F Test varyanslar için iki örnek sonuçlarına göre;

L929 Hücreleri MTT İstatistik Sonuçları; ($F < F_{ölçüt}$; $p > 0.05$)

Mit-C ve MK için, yapılan yapılan Anova Tek Etkin analizleri sonucunda ortalamalar yönünden negatif kontrol ile karşılaştırılmış ve sonuçlar uyumlu bulunmuştur ($F < F_{ölçüt}$; $p > 0.05$). Ayrıca, F test ile değerlendirilen sonuçların standart sapmalar yönünden de birbiri ile uyumlu olduğu ve gruplar arasında homojen bir dağılım olduğu görülmüştür ($F < F_{kritik}$). Saptanan değerler %95 güven aralığında belirlenmiş olup %5'lik anlamlılık düzeyinde yokluk hipotezi ($H_0: \mu_1 = \mu_2$) kabul edilmiştir.

Üretra epitel hücrelerinde MTT testi ile canlılık değerleri incelendiğinde; mit-c'nin 0.625 mg/mL, 1.25 mg/mL, 2.5 mg/mL ve 5 mg/mL konsantrasyonlarındaki yüzde canlılık değerleri sırasıyla; 89 ± 0.66 , 65 ± 0.76 , 53 ± 0.28 ve 41 ± 1.23 olarak hesaplanırken aynı konsantrasyonlarda kaempferolün yüzde canlılık değerleri sırasıyla; 96 ± 0.66 , 100 ± 0.85 , 88 ± 0.95 ve 92 ± 0.85 olarak hesaplandı. İçerdikleri kaempferol miktarları 5.6 mg, 2.8 mg, 1.4 mg, 0.7 mg ve 3.5 mg olan mikrokürelerin MTT testi ile %canlılık değerleri sırasıyla 87 ± 1.23 , 96 ± 0.57 , 98 ± 0.09 , 100 ± 0.28 ve 100 ± 0.029 olarak hesaplanırken kaempferol içermeyen hyalurnik asit ve aljinattan oluşan, ağırlıkları 280 mg, 140 mg, 70 mg, 35 mg ve 17.5 mg olan mikrokürelerin % canlılık değerleri; 106 ± 8.87 , 99 ± 1.04 , 101 ± 0.47 , 103 ± 0.47 ve 100 ± 0.095 olarak hesaplandı. Kaempferol yüklü mikroküreler (KYMK) ile boş olan mikrokürelerin (MK) % canlılık değerleri karşılaştırıldığında; boş mikroküreler ile kontrol grubu arasında anlamlı bir fark yokken, kaempferol yüklü mikrokürelerde kontrol grubu arasında da anlamlı bir canlılık farklı gözlemlenmedi ancak 5.6 mg kaempferol içeren kürelerin uygulandığı grupta canlılık değeri %12 daha düşük olsa da bu sonuç toksik etki göstermediğinden göz ardı edildi. Üretra epitel hücrelerinde mit-c uygulanan hücreler kaempferol yüklenen ve yüklenmeyen mikrokürelere oranla da toksik etki gösterdi. Aynı miktarda uygulanan mit-c ve kaempferolün üretra hücrelerindeki toksik etkisi değerlendirildiğinde kaempferol uygulanan konsantrasyonlarda toksik etki göstermezken mit-c 0.625 mg/mL konsantrasyonu dışında üretra epitel hücreleri

üzerinde toksik etki gösterdi. Kaempferol içermeyen mikroküreler ile kontrol grubu arasında herhangi bir farklılık gözlemlenmezken, 5.6 mg kaempferol içeren mikrokürelerde kontrol grubuna oranla %12'lik bir toksik etki gözlemlendi. 5.6 mg'dan daha düşük olan konsantrasyonlarda kontrol grubu ile arasında belirgin bir fark gözlemlenmedi.

Bir diğer in vitro sitotoksikite yöntemi olan WST-1'dan elde edilen verilen MTT testi ile benzer sonuçlar göstermektedir. Bu sonuçlara göre; canlılık değerleri incelendiğinde, mit-c'nin 0,625 mg/mL, 1,25 mg/mL, 2,5 mg/mL ve 5 mg/mL konsantrasyonlarındaki yüzde canlılık değerleri sırasıyla; %89.61, 60.17, 53.68 ve 45.89 olarak hesaplanırken aynı konsantrasyonlarda kaempferolün yüzde canlılık değerleri sırasıyla 104.76, 102.60, 87.88 ve 96.97 olarak hesaplandı. İçerdikleri kaempferol miktarları 5.6 mg, 2.8 mg, 1.4 mg, 0.7 mg ve 3.5 mg olan mikrokürelerin WST-1 testi ile %canlılık değerleri sırasıyla; 80.90, 86.15, 93.94, 98.70 ve 100,43 olarak belirlenirken kaempferol yüklenmemiş ağırlıkları 280 mg, 140 mg, 70 mg, 35 mg ve 17.5 mg olan boş mikrokürelerin % canlılıkları sırasıyla; 93.07, 99.13, 100.43, 102.16 ve 100 olarak belirlendi.

4.11 İlaç Yüklenmiş ve Yüklenmemiş Mikrokürelerin, Kaempferol ve Mit-c Uygulanan Üretra Hücrelerinin Toksisitesinin WST-1 ile Belirlenmesi

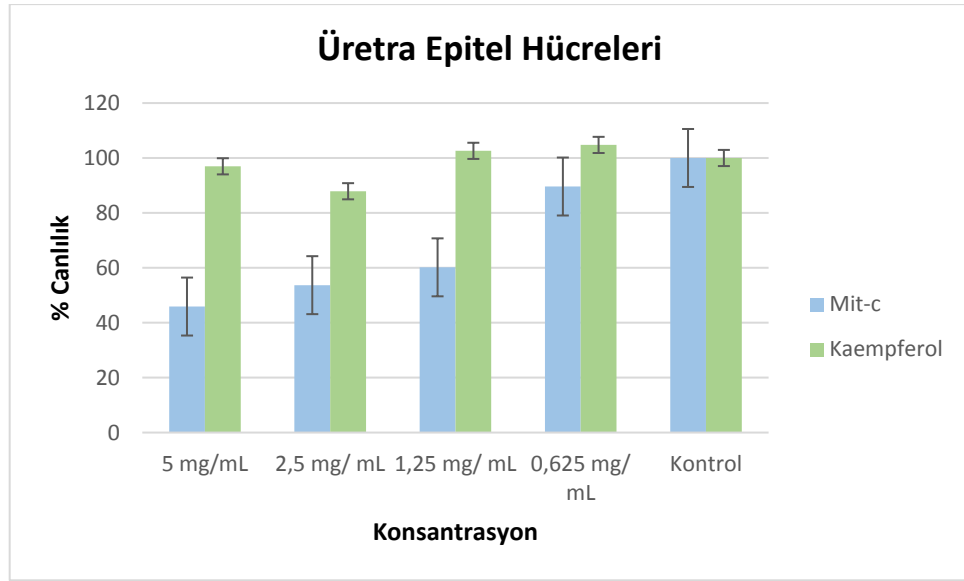
Çalışmada kaempferolün (10 mg/mL), mit-c'nin ve ilaç yüklenmiş ve yüklenmemiş mikrokürelerin üretra epitel hücrelerindeki toksisitesi WST-1 testi ile belirlenmiştir. Bu testte negatif kontrol grubu olarak sadece besiyeri, pozitif kontrol grubu olarak DMSO kullanılmıştır. Çizelge 4.4'de farklı konsantrasyonlarda uygulanan kaempferolün (5 mg/mL'lik konsantrasyondan 100 µl, 50 µl, 25 µl ve 12,5 µl), mit-c'nin (5 mg/mL'lik konsantrasyondan 100 µl, 50 µl, 25 µl ve 12,5 µl) ve ilaç yüklenmiş (56, 28, 14, 7 ve 3,5 mikroküre) ve kaempferol yüklenmemiş mikrokürelerin (56, 28, 14, 7 ve 3,5 mikroküre), 37°C 24 saat sonunda üretra epitel hücrelerindeki canlılığı gösterilmektedir. Kontrol grubunda üretra epitel hücrelerinde sitotoksik etkisinin olmadığı, canlılığın %100 kabul edildiği gösterilmiştir.

Çizelge 4.4. Hazırlanan kimyasalların ve mikrokürelerin üretra epitel hücreleri üzerindeki WST-1 Testi sonucundaki sitotoksik etkileri ve % canlılık değerleri

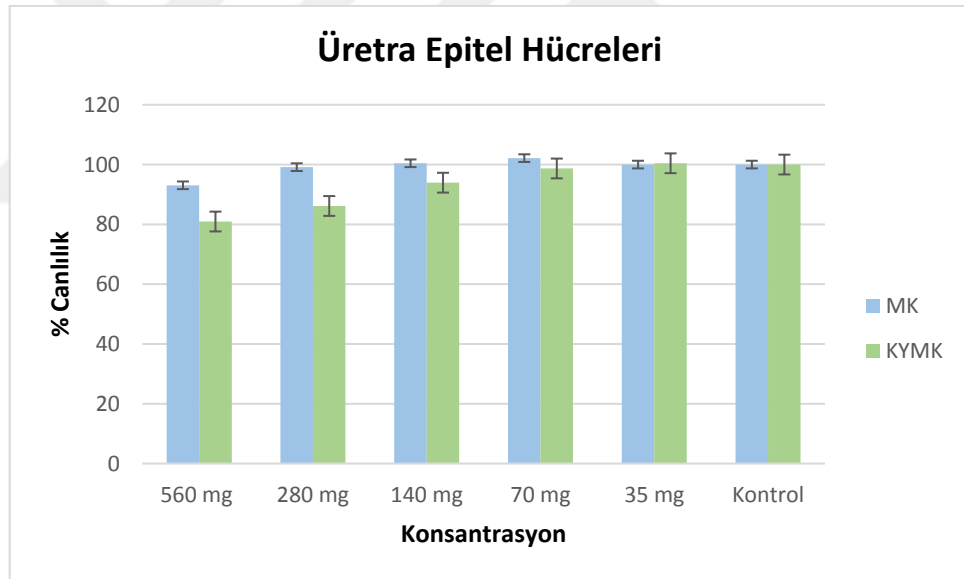
WST-1		Absorbans (440nm)	% Canlılık
Mit-c	5 mg/mL	0,106 ± 0,043	45,89
	2,5 mg/ mL	0,124 ± 0,072	53,68
	1,25 mg/ mL	0,139 ± 0,064	60,17
	0,625 mg/ mL	0,207 ± 0,039	89,61
K	5 mg/mL	0,194 ± 0,046	96,97
	2,5 mg/ mL	0,203 ± 0,053	87,88
	1,25 mg/ mL	0,237 ± 0,072	102,60
	0,625 mg/ mL	0,242 ± 0,034	104,76
KYMK	5,6 mg Kaempferol içeren	0,187 ± 0,027	80,95
	2,8 mg Kaempferol içeren	0,199 ± 0,064	86,15
	1,4 mg Kaempferol içeren	0,217 ± 0,049	93,94
	0,7 mg Kaempferol içeren	0,228 ± 0,082	98,70
	0,35 mg Kaempferol içeren	0,232 ± 0,023	100,43
MK	560 mg	0,215 ± 0,038	93,07
	280 mg	0,229 ± 0,051	99,13
	140 mg	0,232 ± 0,059	100,43
	70 mg	0,236 ± 0,072	102,16
	35 mg	0,231 ± 0,047	100,00
Kontrol	Besi yeri	0,231 ± 0,035	100,00

(Mitic: Mitomycin-c, K: Kaempferol, KYMK: Kaempferol Yüklenmiş Mikroküre, MK: ilaç yüklenmemiş mikroküre)

Çizelge 4.4' deki sonuçlara göre klinikte üretral darlık tedavisinde kullanılmakta olan mitomycin-c 5 mg/mL uygulandığı konsantrasyonda üretra epitel hücreleri üzerinde %45,89 canlılık göstermiştir yani %64,11 oranında üretra epitel hücrelerini öldürmüştür. Mitomycin-c konsantrasyonunun azalmasına bağlı olarak 50 µl uygulanan üretra epitel hücrelerinde canlılık %7,79 artış göstermiş olsa da hücreler üzerinde toksik etkisi devam etmektedir. 25 µl uygulanmış mit-c de konsantrasyon 100 µl uygulanana göre %14,28 oranında artmış ancak %70'in altında olduğundan hala sitotoksiktir. Ancak 12,5 µl uygulanan mit-c de canlılık ilk konsantrasyona göre %43,72 artmış ve %89,61 oranında canlılık göstermiştir. Kaempferolün üretra epitel hücreleri üzerindeki incelendiğinde canlılık tüm konsantrasyonlarda %70'in üzerindedir. Bu da üretra epitel hücreleri üzerinde sitotoksik bir etkisinin olmadığını göstermektedir. Yüksek konsantrasyonlarda (100 µl, 50 µl) canlılığı kısmen azaltmış olsa da toksik bir etki gözlemlenmemiştir, konsantrasyon azaldıkça canlılık kontrol grubuyla aynı seviyelerdedir. İlaç yüklenmemiş boş hyaluronik asitten oluşan kürelerin üretra epitel hücrelerindeki canlılık değerleri incelendiğinde toksik bir etkisi saptanmamıştır. Kaempferol yüklenmiş mikrokürelerin üretra epitel hücreleri üzerindeki sitotoksik etkileri incelendiğinde yüksek konsantrasyonda (56 küre, 5,6 mg kaempferol içermektedir) bile canlılığı azaltmamıştır. 28 adet küre uygulanmasında üretra epitel hücrelerinde canlılık %86,15'dir. Ayrıca küre sayısı 14, 7 ve 3,5 adette canlılık sırasıyla %93,9, %98,70 ve %100,43 olarak hesaplanmıştır. Bu değerler hazırlanan kaempferol içeren mikrokürelerin üretra epitel hücrelerinde in vitro toksik bir etkisi saptanmamıştır.



Şekil 4.17. Uygulanan kaempferol ve Mit-c'nin üretra epitel hücrelerinde WST-1 Testi sonucundaki canlılık düzeyleri (Mit-c: Mitomycin-c)



Şekil 4.18. Hazırlanan mikrokürelerin üretra epitel hücrelerinde WST-1 Testi sonucundaki canlılık düzeyleri (KYMK: Kaempferol Yüklenmiş Mikroküre, MK: ilaç yüklenmemiş mikroküre)

(KYMK: Kaempferol Yüklenmiş Mikroküre, MK: ilaç yüklenmemiş mikroküre, Kaempferol yüklü mikroküreler için; 560 mg küre 5,6 mg/mL kaempferol, 280 mg küre 2,8 mg/mL, 140 mg küre 1,4 mg/mL, 70 mg küre 0,7 mg/mL, 35 mg 0,35 mg/mL kaempferol içermektedir.)

Üretra epitel ve L929 fibroblast hücreleri üzerinde yapılan sitotoksosite testlerinden

WST-1 sonucunda; kontrol ve test maddelerinin 24 saatlik inkübasyonu sonucunda elde edilen absorbans verilerine göre ortalamalar hesaplandı. İn vitro değerlendirme sonucu elde edilen veriler, istatistiksel olarak F Testi uygulanarak belirlendi. F Test varyanslar için iki örnek sonuçlarına göre;

Üretra Hücreleri WST-1 İstatistik Sonuçları; ($F < F_{ölçüt}$; $p > 0.05$)

Kaempferol, KYMK ve MK için, yapılan Anova Tek Etken analizleri sonucunda ortalamalar yönünden karşılaştırılan iki grup birbiri ile uyumlu bulunmuştur ($F < F_{ölçüt}$; $p > 0.05$). Ayrıca, F test ile değerlendirilen sonuçların standart sapmalar yönünden de birbiri ile uyumlu olduğu ve gruplar arasında homojen bir dağılım olduğu görülmüştür ($F < F_{kritik}$). Saptanan değerler %95 güven aralığında belirlenmiş olup %5'lik anlamlılık düzeyinde yokluk hipotezi ($H_0: \mu_1 = \mu_2$) kabul edilmiştir.

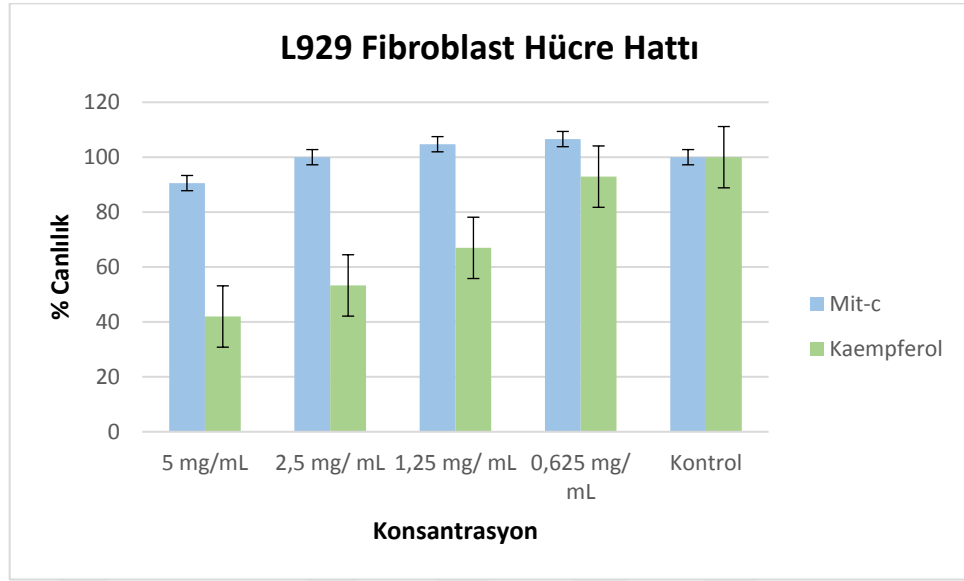
4.12 İlaç Yüklenmiş ve Yüklenmemiş Mikrokürelerin, Kaempferol ve Mit-c Uygulanan L929 Fibroblast Hücrelerinin Toksisitesinin WST-1 ile Belirlenmesi

Çalışmada kaempferolün, mit-c'nin ve ilaç yüklenmiş ve yüklenmemiş mikrokürelerin L929 fibroblast hücrelerindeki toksisitesi WST-1 testi ile belirlenmiştir. Bu testte negatif kontrol grubu olarak sadece besiyeri, pozitif kontrol grubu olarak DMSO kullanılmıştır. Çizelge 4.5'de farklı konsantrasyonlarda uygulanan kaempferolün (5 mg/mL'lik konsantrasyondan 100 µl, 50 µl, 25 µl ve 12,5 µl), mit-c'nin (5 mg/mL'lik konsantrasyondan 100 µl, 50 µl, 25 µl ve 12,5 µl) ve ilaç yüklenmiş (56, 28, 14, 7 ve 3,5 mikroküre) ve kaempferol yüklenmemiş mikrokürelerin (56, 28, 14, 7 ve 3,5 mikroküre) 37°C 24 saat sonunda L929 fibroblast hücrelerindeki canlılığı gösterilmektedir. Çizelge 4.5'de farklı konsantrasyonlarda uygulanan kaempferolün (5 mg/mL), mit-c'nin ve ilaç yüklenmiş ve yüklenmemiş mikrokürelerin 37°C 24 saat sonunda üretra epitel hücrelerindeki canlılığı gösterilmektedir. Kontrol gruplarında L929 fibroblast hücrelerinde sitotoksik etkisinin olmadığı, canlılığın %100 kabul edildiği gösterilmiştir. 100 µl uygulanan kaempferol ortamı 5 µg kaempferol içermektedir, dilüsyonun azalma oranı ve ilaç oranı aynıdır. 100 µl uygulanan mit-c ortamı 10 µl mit-c içermektedir, dilüsyonun azalma oranı ve ilaç oranı aynıdır.

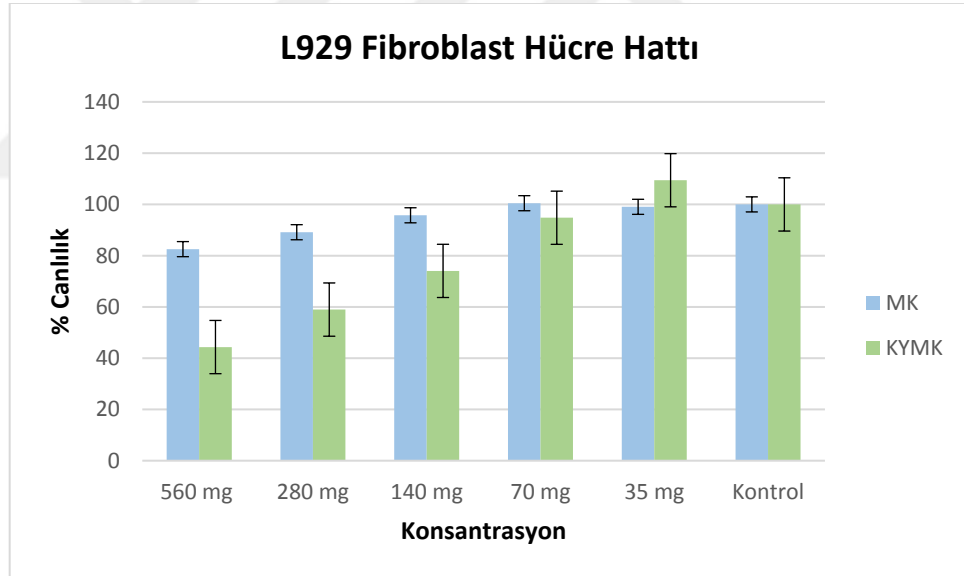
Çizelge 4.5. Hazırlanan kimyasalların ve mikrokürelerin L929 Fibroblast hücreleri üzerindeki WST-1 Testi sonucundaki sitotoksik etkileri ve % canlılık değerleri

WST-1		Absorbans (440nm)	% Canlılık
Mit-c	5 mg/mL	0,192 ± 0,048	90,57
	2,5 mg/ mL	0,212 ± 0,072	100,00
	1,25 mg/ mL	0,222 ± 0,067	104,72
	0,625 mg/ mL	0,226 ± 0,053	106,60
K	5 mg/mL	0,089 ± 0,042	41,98
	2,5 mg/ mL	0,113 ± 0,063	53,30
	1,25 mg/ mL	0,142 ± 0,082	66,98
	0,625 mg/ mL	0,197 ± 0,023	92,92
KYMK	5,6 mg Kaempferol içeren	0,094 ± 0,028	44,34
	2,8 mg Kaempferol içeren	0,125 ± 0,046	58,96
	1,4 mg Kaempferol içeren	0,157 ± 0,064	74,06
	0,7 mg Kaempferol içeren	0,201 ± 0,082	94,81
	0,35 mg Kaempferol içeren	0,232 ± 0,023	109,43
MK	560 mg	0,175 ± 0,032	82,55
	280 mg	0,189 ± 0,061	89,15
	140 mg	0,203 ± 0,069	95,75
	70 mg	0,213 ± 0,082	100,47
	35 mg	0,210 ± 0,034	99,06
Kontrol	Besi yeri	0,212 ± 0,027	100,00

(Mitic: Mitomycin-c, K: Kaempferol, KYMK: Kaempferol Yüklenmiş Mikroküre, MK: ilaç yüklenmemiş mikroküre)



Şekil 4.19. Uygulanan kaempferol ve Mit-c'nin L929 hücrelerinde WST-1 Testi sonucundaki canlılık düzeyleri (Mit-c: Mitomycin-c)



Şekil 4.20. Hazırlanan mikrokürelerin L929 hücrelerinde WST-1 Testi sonucundaki canlılık düzeyleri (KYMK: Kaempferol Yüklenmiş Mikroküre, MK: ilaç yüklenmemiş mikroküre)

(KYMK: Kaempferol Yüklenmiş Mikroküre, MK: ilaç yüklenmemiş mikroküre, Kaempferol yüklü mikroküreler için; 560 mg küre 5,6 mg/mL kaempferol, 280 mg küre 2,8 mg/mL, 140 mg küre 1,4 mg/mL, 70 mg küre 0,7 mg/mL, 35 mg 0,35 mg/mL kaempferol içermektedir.)

Üretra epitel ve L929 fibroblast hücreleri üzerinde yapılan sitotoksosite testlerinden WST-1 sonucunda; kontrol ve test maddelerinin 24 saatlik inkübasyonu sonucunda elde edilen absorbans verilerine göre ortalamalar hesaplandı. İn vitro değerlendirme sonucu elde edilen veriler, istatistiksel olarak F Testi uygulanarak belirlendi. F Test varyanslar için iki örnek sonuçlarına göre;

L929 Hücreleri WST-1 İstatistik Sonuçları; ($F < F_{ölçüt}$; $p > 0.05$) Mit-C ve MK için, yapılan yapılan Anova Tek Etken analizleri sonucunda ortalamalar yönünden negatif kontrol ile karşılaştırılmış ve sonuçlar uyumlu bulunmuştur ($F < F_{ölçüt}$; $p > 0.05$). Ayrıca, F test ile değerlendirilen sonuçların standart sapmalar yönünden de birbiri ile uyumlu olduğu ve gruplar arasında homojen bir dağılım olduğu görülmüştür ($F < F_{kritik}$). Saptanan değerler %95 güven aralığında belirlenmiş olup %5’lik anlamlılık düzeyinde yokluk hipotezi ($H_0: \mu_1 = \mu_2$) kabul edilmiştir.

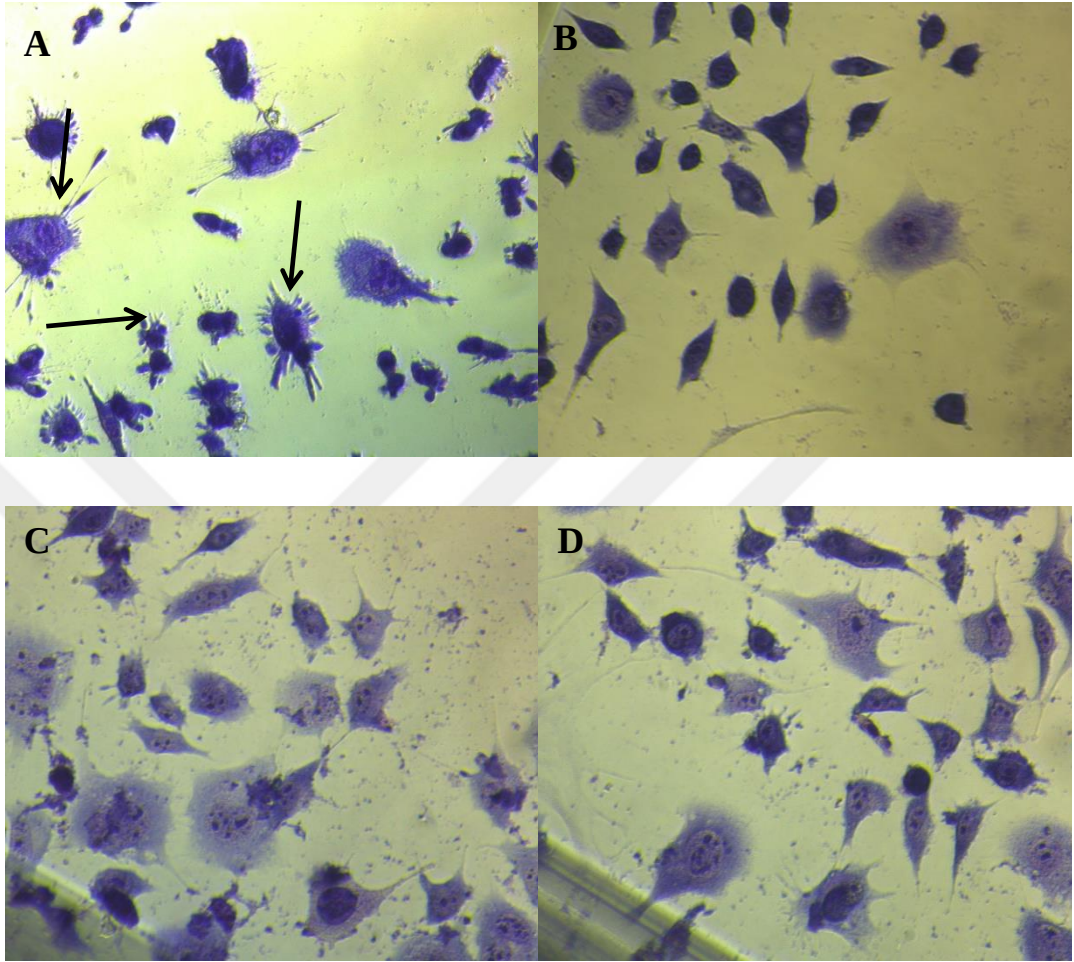
Elde edilen veriler incelendiğinde; MTT ve WST-1 sonuçları benzer değerler gösterdi ve uygulanan mit-c her iki testte de üretra epitel hücreleri için toksik etki gösterirken, kaempferol doğrudan uygulamasında da mikroküre içerisinde uygulanmasında da herhangi bir toksik etki göstermedi. Bu sonuçlar ile kaempferolün üretraya uygulanması durumunda üretra epitel hücrelerine hücre içinde ya da dışında toksik bir etki göstermeyeceği in vitro test yöntemleri ile gösterildi.

L929 hücre hattında da aynı test malzemeleri kullanılarak MTT ve WST-1 sitotoksosite testleri gerçekleştirildi. MTT testi ile L929 hücrelerinde mit-c’nin 0.625 mg/mL, 1.25 mg/mL, 2.5 mg/mL ve 5 mg/mL konsantrasyonlarındaki % canlılık değerleri sırasıyla; 110, 11, 96 ve 85 iken kaempferolün aynı konsantrasyonlarda sırasıyla % canlılık değeri; 81, 81, 42 ve 38 olarak belirlenmiştir. İçerdikleri kaempferol miktarları 5.6 mg, 2.8 mg, 1.4 mg, 0.7 mg ve 3.5 mg olan mikrokürelerin MTT testi ile %canlılık değerleri sırasıyla; 42, 51, 65, 81 ve 81 iken kaempferol yüklenmemiş ağırlıkları 280 mg, 140 mg, 70 mg, 35 mg ve 17.5 mg olan boş mikrokürelerin % canlılıkları sırasıyla; 80, 89, 104, 107 ve 102 olarak belirlendi.

4.13 Toluidine Blue Boyama

GAG içeriğini biyokimyasal yöntemlerle tanımlamak maliyetli ve zor bir işlemdir. Bu sebeple histolojik boyamalarla GAG’ lar görülür hale getirilebilir. Metakromatik

özellikle katyonik bir boya olan toluidin mavisi, GAG ları mavi-mor renge boyar, dağınık yıldız görünümünde bir görünüm ortaya çıkar (66).



Şekil 4.21. Toluiden blue boyama ile GAG'ların gösterilmesi

(A:5 mg/mL Mit-c uygulanan üretra epitel hücreleri (ok işaretleri GAG oluşumlarını göstermektedir), B: Uygulama yapılmayan kontrol grubu hücreleri, C: KYMK uygulanan üretra epitel hücreleri, D: Kaempferol uygulanan üretra epitel hücreleri)

4.14 İkili Boyama Metodu İle Apoptotik ve Nekrotik İndeks

Sonuçları

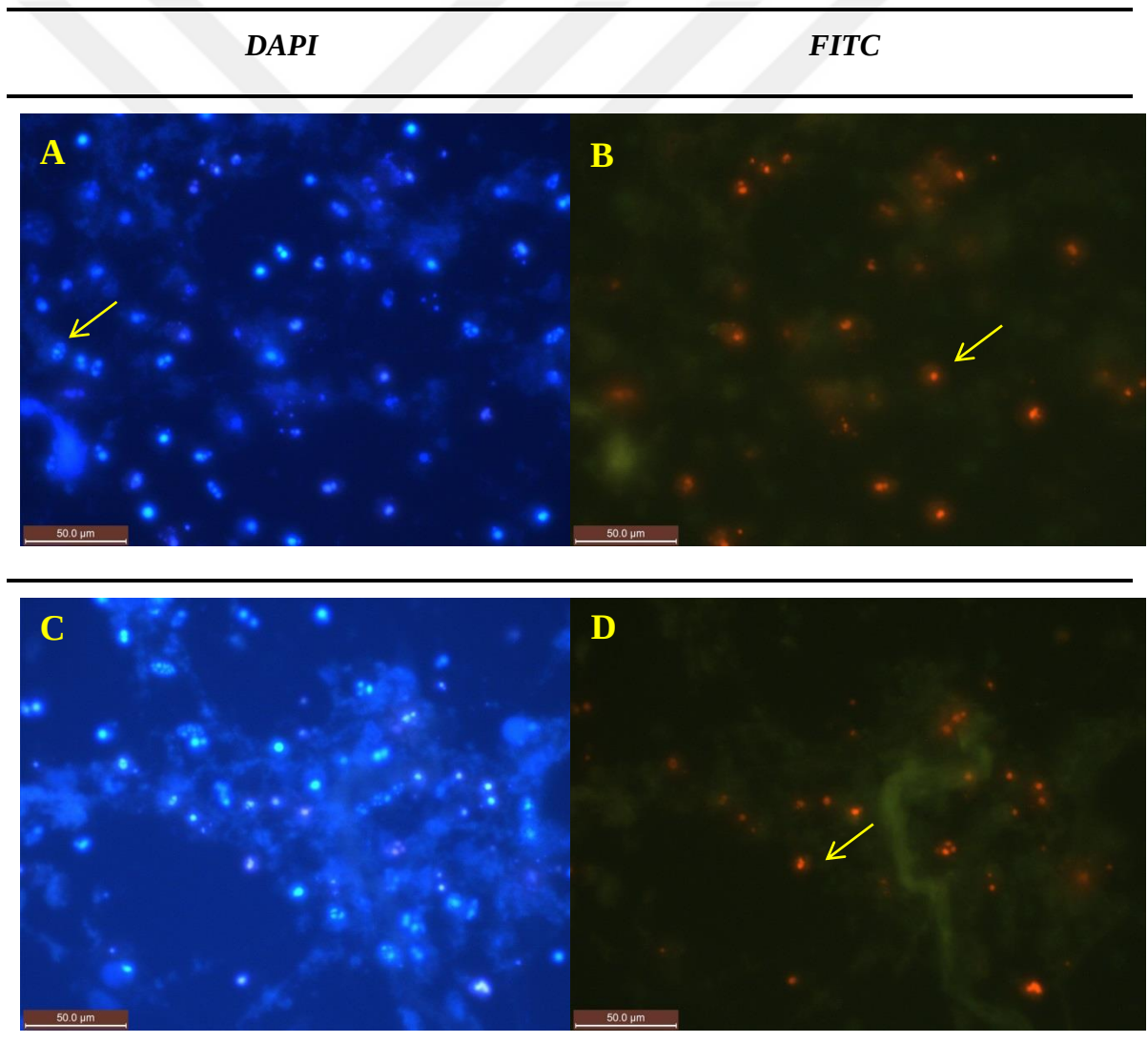
Primer kültürle elde edilen üretra epitel hücrelerinde ve L929 fibroblast hücrelerinde apoptozun belirlenmesi için ikili boyama (double staining) metodu kullanılmıştır. Hazırlanan ikili boyama solüsyonu içerisinde bulunan Hoechst (33342) flouresan boyası DNA'ya bağlanarak mavi flouresan ışık altında hücre çekirdeklerinin mavi

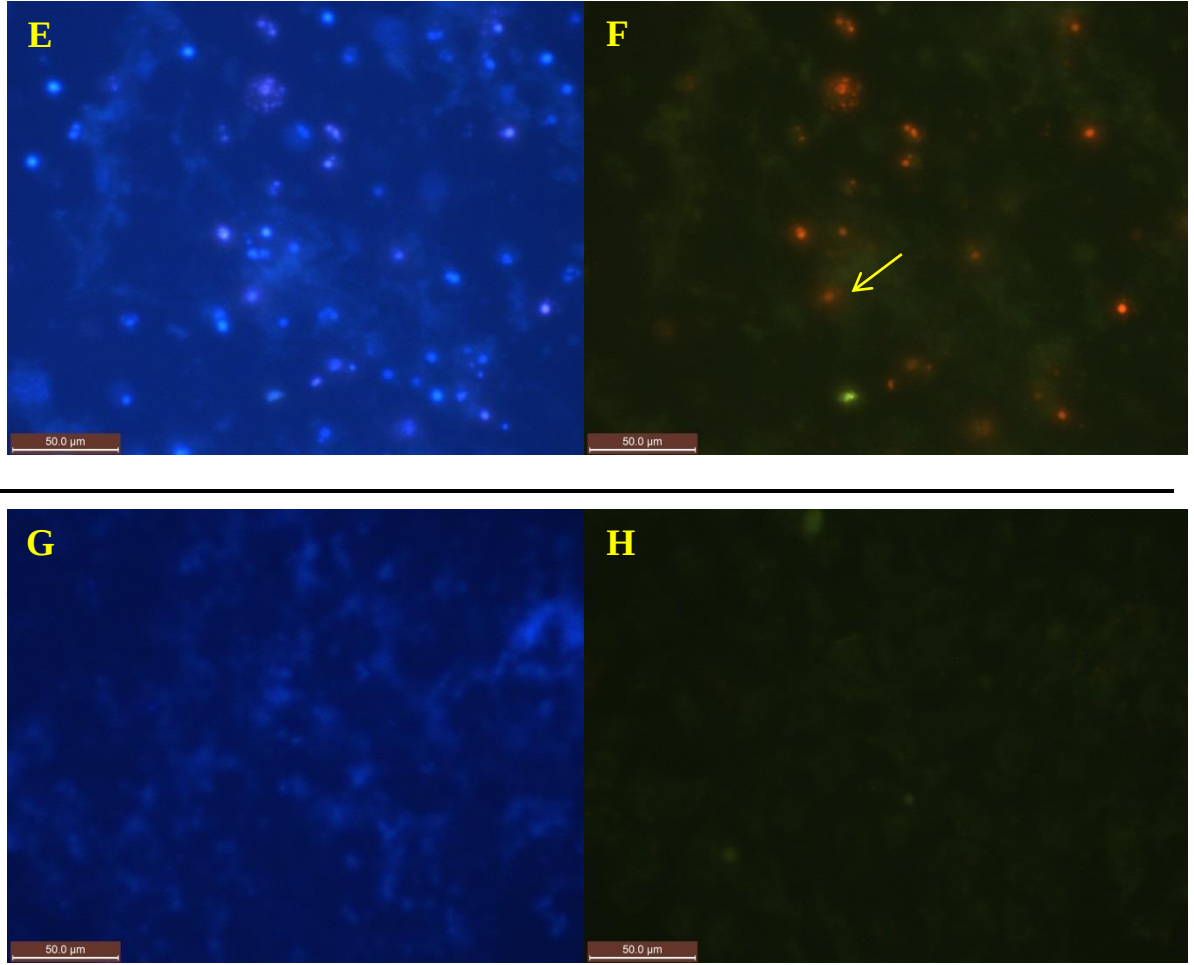
renge boyanmasını sağlar, böylece apoptotik parçacıklar ve DNA fragmentasyonları ışıma ile gözlemlenebilir. Genel prensipte apoptotik hücre çekirdekleri, düzgün parçalanmış, diğerlerine göre daha parlak ve çekirdek sınırları bozulması vb. özelliklerinden diğer mavi boyanmış çekirdeklerden ayırt edilirler. Hazırlanan ikili boyama solüsyonu içerisinde bulunan propodium iyodid floresan boyası ile boyandığında nekroza uğramış hücrelerin çekirdekleri kırmızı floresan ve yeşil floresan ışık altında kırmızı olarak görülmekte olup hücrelerin nekroza uğradığına işaret etmektedir.

Mit-c uygulanan üretra epitel hücrelerinde nekrotik indeksin apoptotik indeksten daha yüksek olduğu tespit edildi. 5 mg/mL konsantrasyonda uygulanan mit-c'nin ölüm oranları karşılaştırıldığında; %54 oranında ölüm gerçekleşmişken bu ölümlerin % 34'ü nekrotik %18'i apoptotik olduğu gözlemlendi. Konsantrasyonun azalmasına bağlı olarak ölüm oranlarında azalma gözlemlenirken, nekrotik ölüm oranı her koşul için apoptotik ölüm oranından yüksek olduğu gözlemlendi. Uygulanan konsantrasyona (5 mg/mL, 2.5 mg/mL, 1.25 mg/mL ve 0.625 mg/mL) bağlı olarak artmaktadır. Uygulanan en yüksek konsantrasyonda (5 mg/mL) %apoptoz oranı (hoescht boyanan) %18 iken %nekroz (pi boyanan) oranı %34 olarak gözlemlendi, uygulanan en düşük konsantrasyon olan 0.625 mg/mL'de ise apoptoz oranı %3'e düşerken nekrotik ölüm oranı da %5'e düşmüştür. Sitotoksikite verileri ile ilişkilendirildiğinde; üretra epitel hücreleri üzerinde toksik etki gösteren mit-c'nin nekrotik ölüm oranının daha fazla olması sebebiyle üretrada kullanımının uygun olmadığı düşünülmektedir. Çizelge 4.6'da detaylı olarak sonuçlar verilmekte, şekil 4.17 de DAPI ve FITC filtresindeki hücrelerin görüntüleri verilmektedir.

Çizelge 4.6. Mitomisin-c uygulanmış üretra hücrelerine ait apoptotik indeks sonuçları (Mit-c: mitomisin-c)

	Kontrol (uygulama yapılmamış hücre)	5 mg/mL Mit-c	2,5 mg/mL Mit-c	1,25 mg/mL Mit-c	0,625 mg/mL Mit-c
% Apoptoz	1±	18±0,1	15±0,2	10±0,2	3±0,2
% Nekroz	1±	34±0,2	29±0,4	25±0,3	5±0,3





Şekil 4.22. Mitomisin-c uygulanmış üretra hücrelerine ait DAPI ve FITC filtrelerindeki görüntüleri

(A,B: 5 mg/mL mit-c uygulanan üretra epitel hücrelerinin görüntüleri., C,D: 2,5 mg/mL mit-c uygulanan üretra epitel hücrelerinin görüntüleri., E,F:1.25 mg/mL mit-c uygulanan üretra epitel hücrelerinin görüntüleri., G,H: 0.625 mg/mL mit-c uygulanan üretra epitel hücrelerinin görüntüleri. DAPI filtresinde ok işareti ile gösterilen hücreler apoptotik ölen hücrelerdir, FITC filtresinde ok işareti ile gösterilen hücreler nekrotik ölen hücrelerdir.) (DAPI filtresinde ok işaretleri apoptotik ölümler, FITC filtresinde ok işaretleri nekrotik ölümleri göstermektedir.)

Kaempferol uygulanan hücrelere yapılan ikili boyama sonuçlarına göre; 5 mg/mL kaempferolde nekroz oranı %0,1 iken 0.625 mg/mL’de 0 olarak gözlemlenmiş, apoptoz oranları ise 5 mg/mL konsantrasyon için %4.2 iken 0.625 mg/mL konsantrasyonunda 0 olarak belirlendi. Çizelge 4.7’de detaylı olarak apoptotik indeks

ve nekrotik indeks sonuçları verilmekte, şekil 4.18 de DAPI ve FITC filtresindeki hücrelerin görüntüleri verilmektedir.

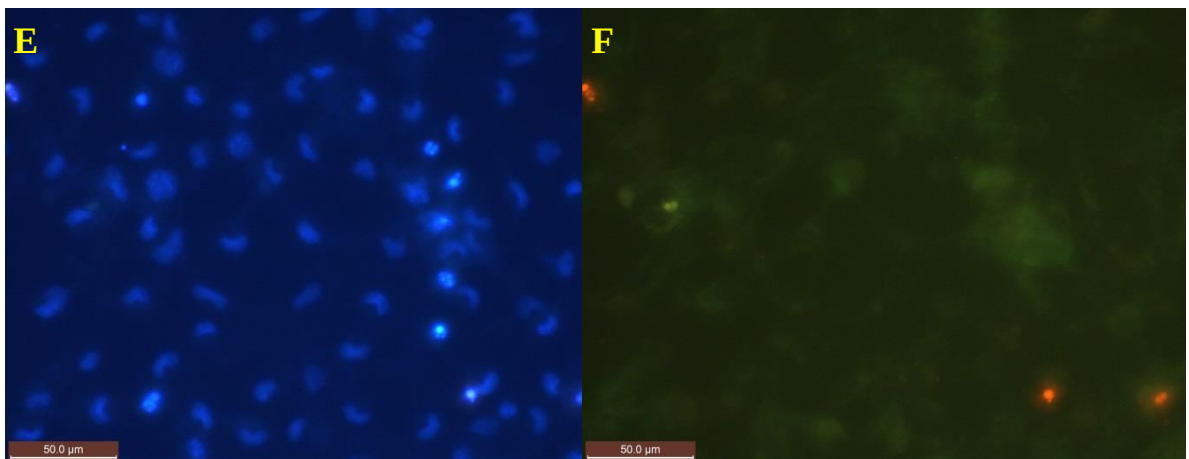
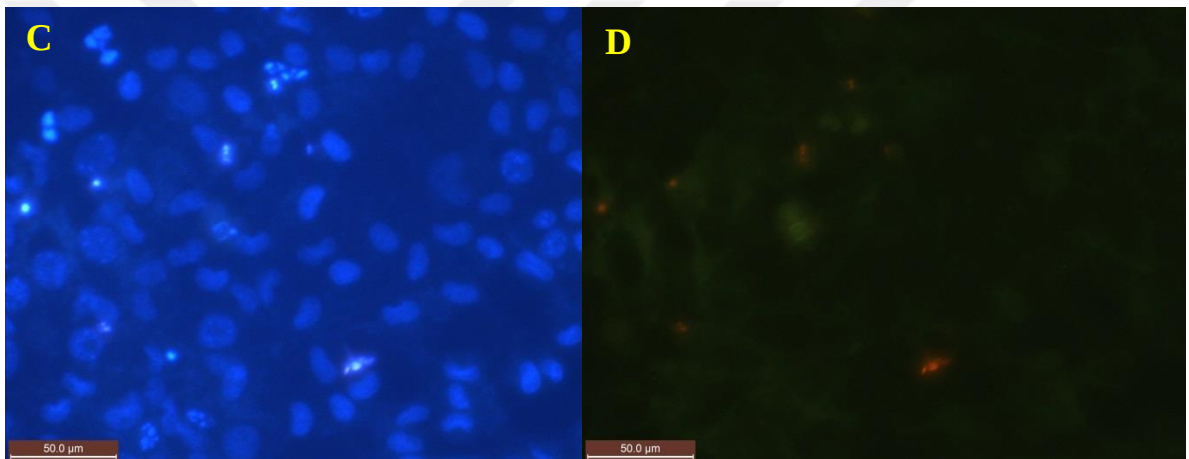
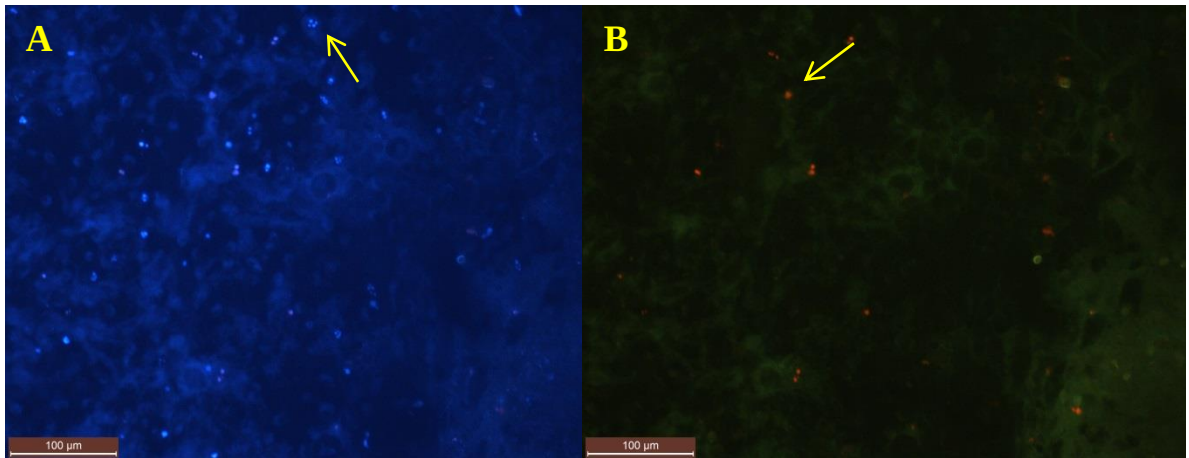
Çizelge 4.7. Kaempferol uygulanmış üretra hücrelerine ait apoptotik indeks sonuçları

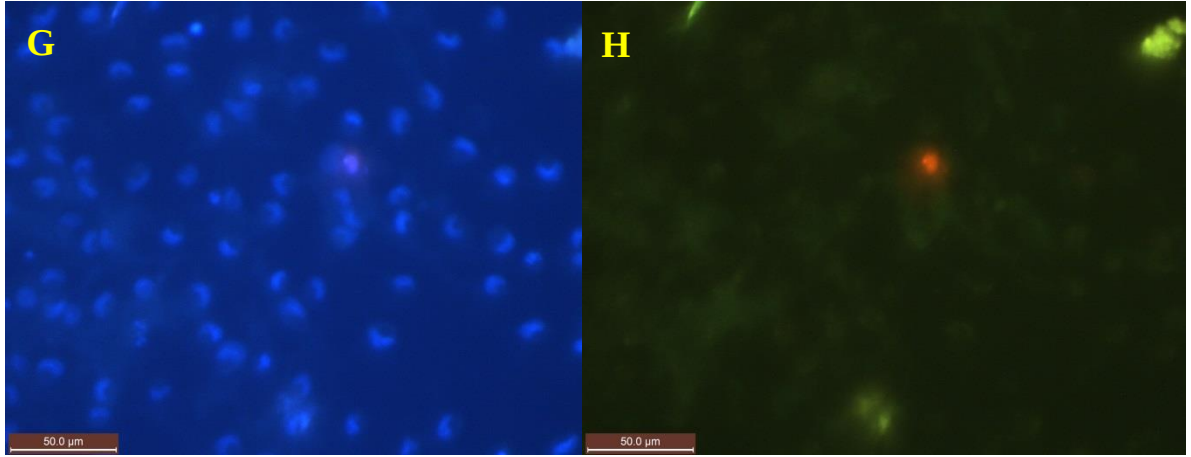
	Kontrol (uygulama yapılmamış hücre)	5 mg/mL K*	2,5 mg/mL K	1,25 mg/mL K	0,625 mg/mL K
% Apoptoz	1±	4,2±0,2	5,6±9,3	0	0
% Nekroz	1±	0,1±0,1	0,2±0,1	0	0

(*K: Kaempferol)

DAPI

FITC





Şekil 4.23. Kaempferol uygulanmış üretra hücrelerine ait DAPI ve FITC filtrelerindeki görüntüleri

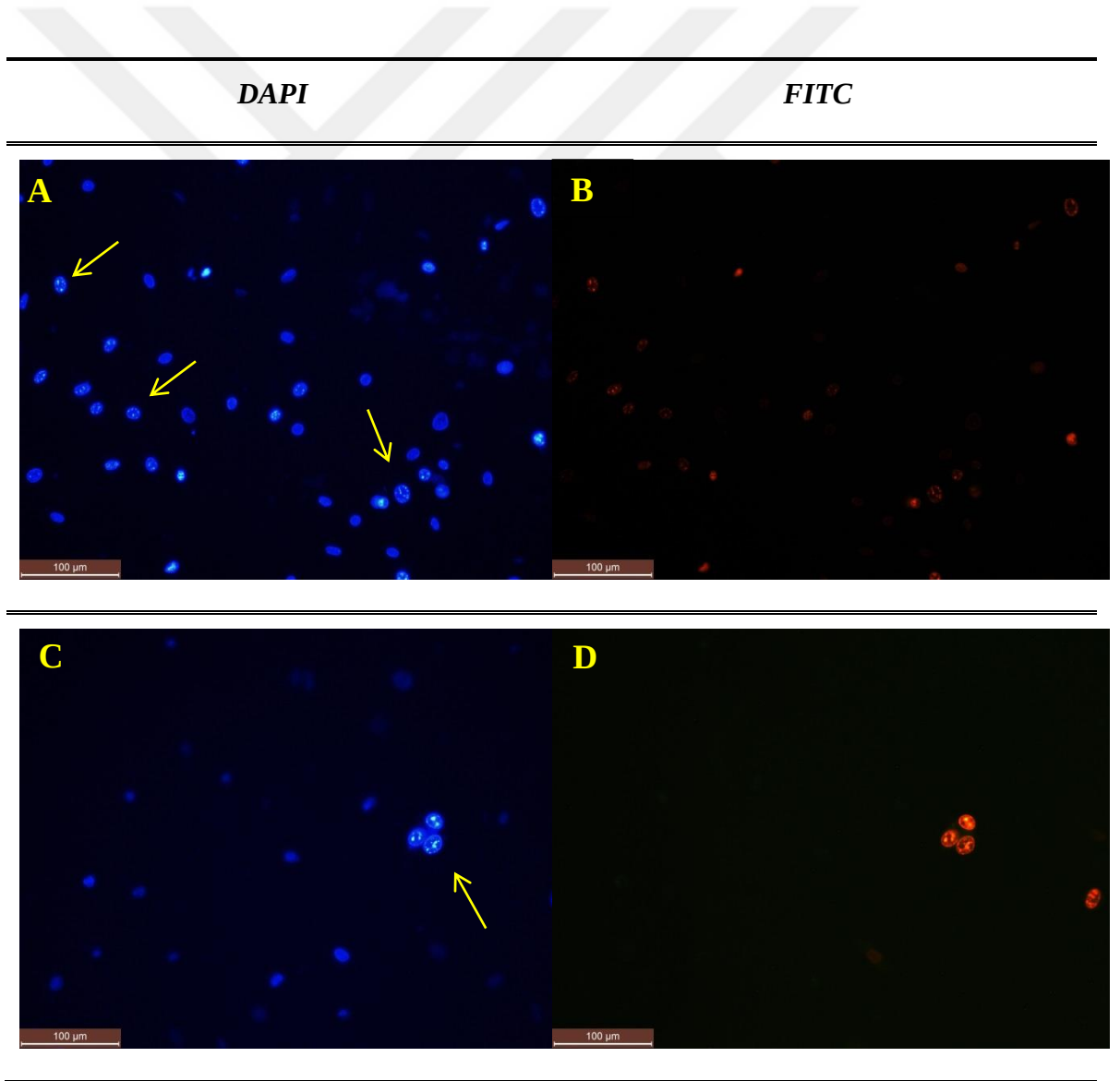
(A,B: 5 mg/mL kaempferol uygulanan üretra epitel hücrelerinin görüntüleri., C,D: 2,5 mg/mL kaempferol uygulanan üretra epitel hücrelerinin görüntüleri., E,F:1.25 mg/mL kaempferol uygulanan üretra epitel hücrelerinin görüntüleri., G,H: 0.625 mg/mL kaempferol uygulanan üretra epitel hücrelerinin görüntüleri. DAPI filtresinde ok işareti ile gösterilen hücreler apoptotik ölen hücrelerdir, FITC filtresinde ok işareti ile gösterilen hücreler nekrotik ölen hücrelerdir.)

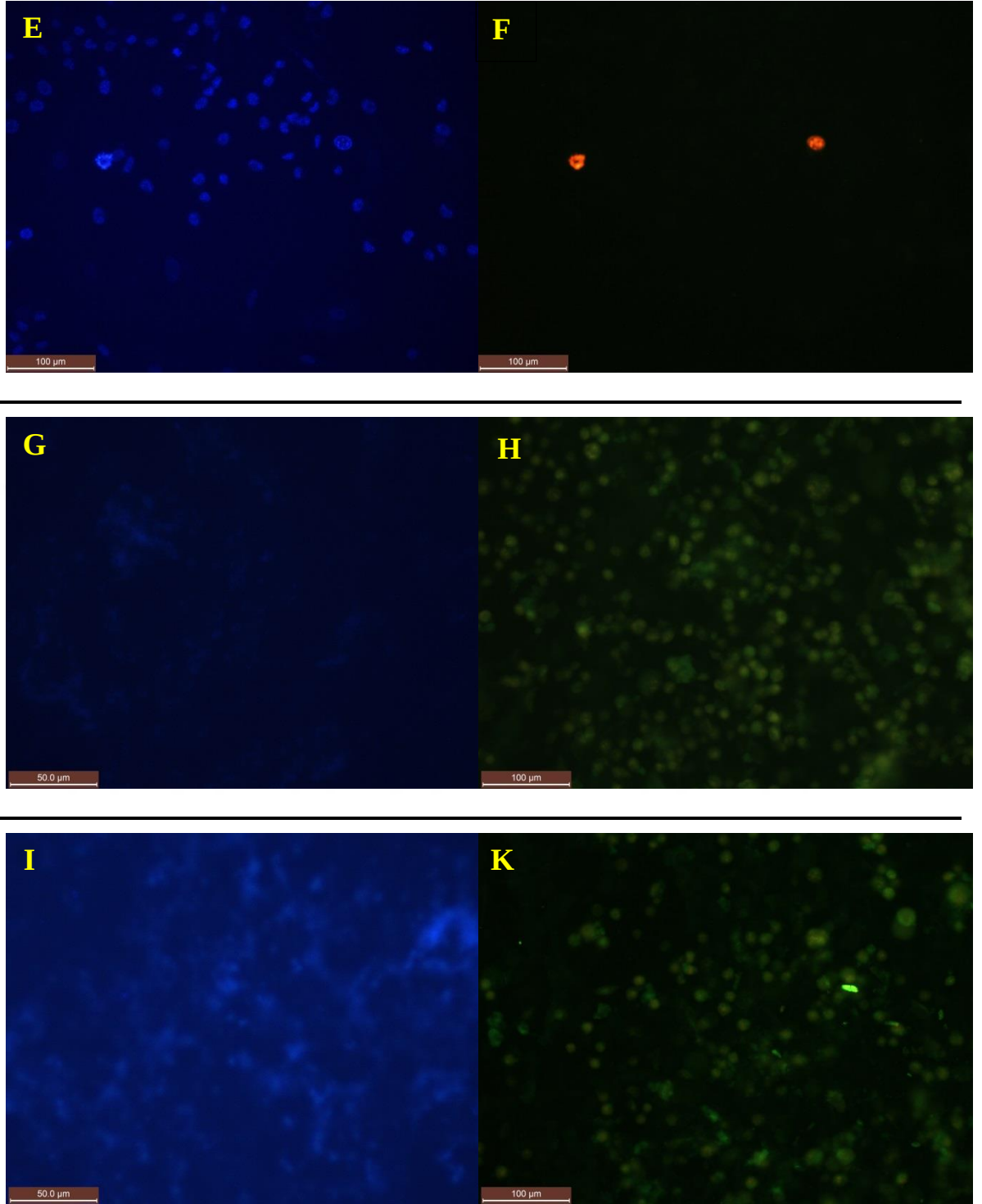
Kaempferol yüklenen mikrokürelerin uygulandığı üretra epitel hücrelerinde uygulanan konsantrasyonlarda nekrotik ölüm gözlemlenmezken apoptotik ölüm 5.6 mg/mL kaempferol içeren mikroküreler için %2 olarak gözlemlendi. Kaempferol yüklenmeyen mikrokürelerin tüm konsantrasyonlarında ise apoptotik ya da nekrotik herhangi bir ölüme rastlanmadı. Çizelge 4.8’de detaylı olarak apoptotik indeks ve nekrotik indeks sonuçları verilmekte, şekil 4.19 de DAPI ve FITC filtresindeki hücrelerin görüntüleri verilmektedir.

Çizelge 4.8. Kaempferol yüklenmiş kürelerin uygulandığı üretra hücrelerine ait apoptotik indeks sonuçları

	Kontrol (uygulama yapılmamış hücre)	5,6 mg Kaempferol içeren	2,8 mg Kaempferol içeren	1,4 mg Kaempferol içeren	0,7 mg Kaempferol içeren	0,35 mg Kaempferol içeren
% Apoptoz	1±	2±0,1	0,1±0,1	0	0	0
% Nekroz	1±	0,3±0,1	0	0	0	0

(MK: mikroküre)





Şekil 4.24. Kaempferol yüklenen mikrokürelerin DAPI ve FITC filtresindeki görüntüleri

(A,B: 5,6 mg/mL kaempferol içeren mikroküre uygulanan üretra epitel hücrelerinin görüntüleri., C,D: 2,8 mg/mL kaempferol uygulanan üretra epitel hücrelerinin görüntüleri., E,F:1,4 mg/mL kaempferol uygulanan üretra epitel hücrelerinin

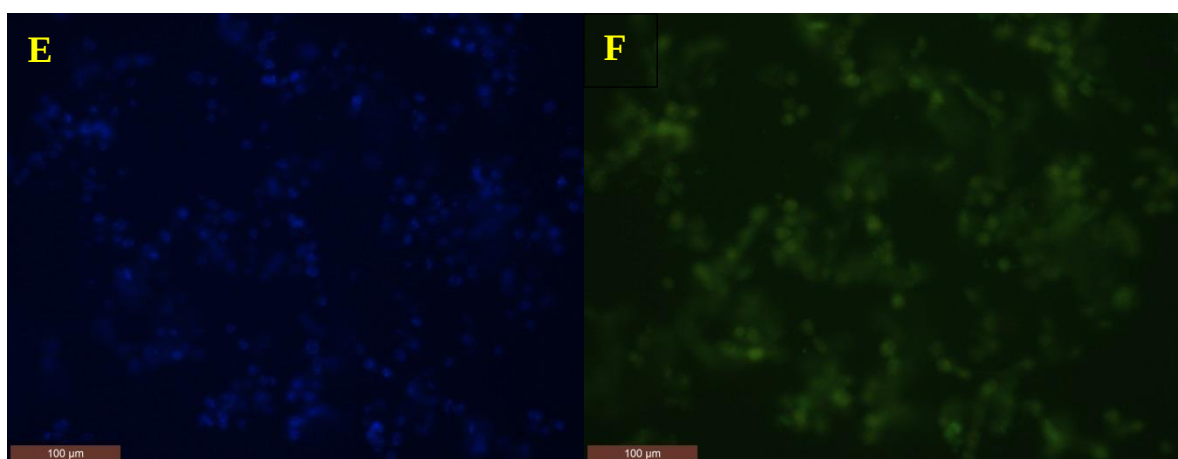
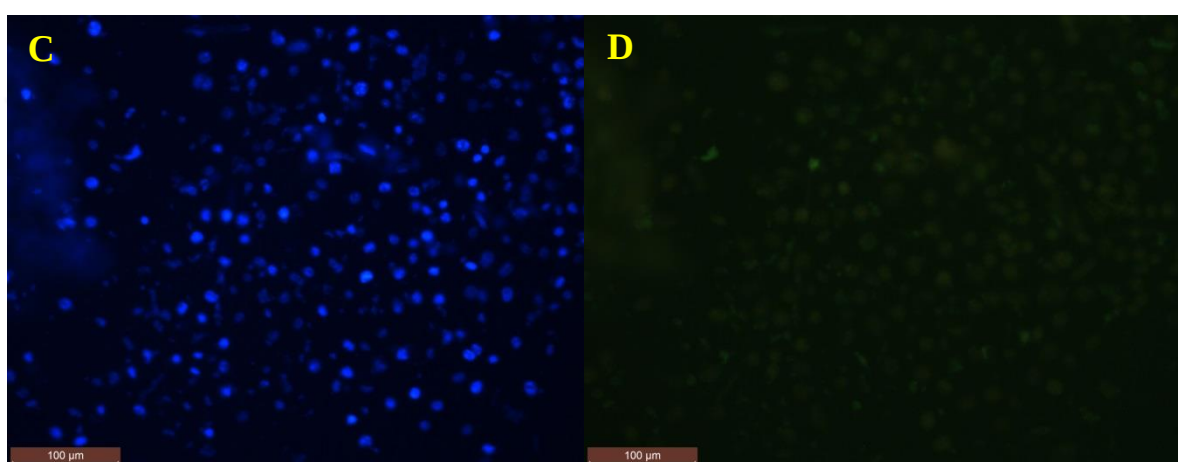
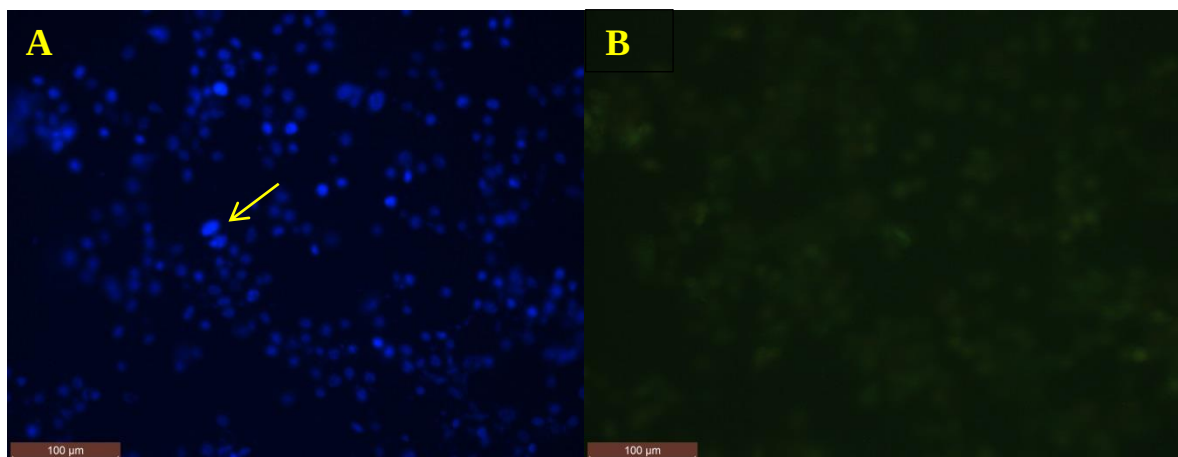
görüntüleri., G,H: 0.7 mg/mL kaempferol uygulanan üretra epitel hücrelerinin görüntüleri., I,K:0.35 mg/mL kaempferol uygulanan üretra epitel hücrelerinin görüntüleri., DAPI filtresinde ok işareti ile gösterilen hücreler apoptotik ölen hücrelerdir.)

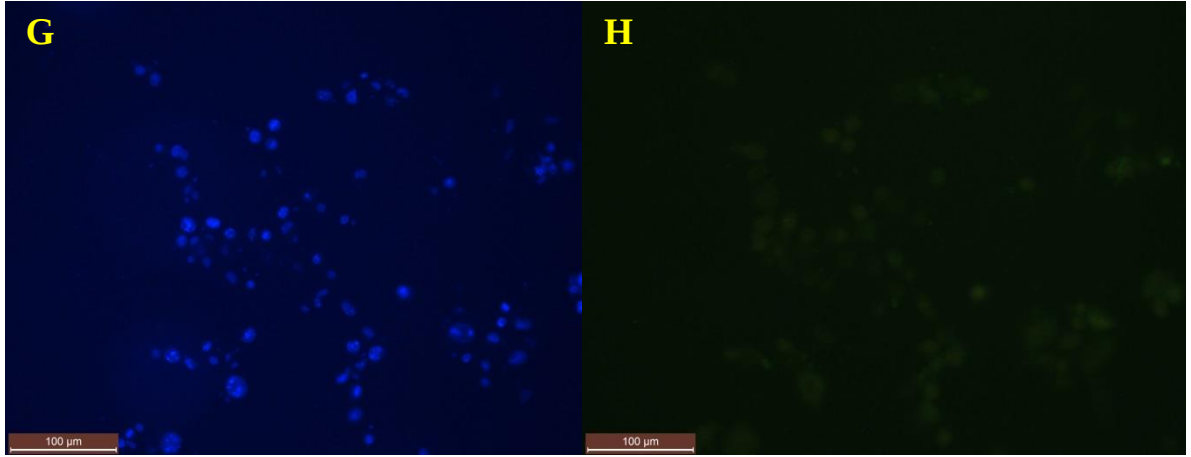
Kaempferol yüklenmemiş boş küreler kaempferol içeren mikrokürelerin ağırlığı ile aynı oranda uygulanmıştır. 5,6 mg kaempferol içeren mikrokürenin ağırlığı 560 mg gelmediğinden boş küreler de bu şekilde uygulanarak kaempferolün göz ardı edildiği değerlendirme yapılmıştır. Hazırlanan mikrokürelerin hücreler üzerinde dikkate değer bir ölüme sebep olmadığı, gözlemlenen düşük ölümlerin ise apoptotik olduğu tespit edilmiştir. Çizelge 4.9’de detaylı olarak apoptotik indeks ve nekrotik indeks sonuçları verilmekte, şekil 4.20 de DAPI ve FITC filtresindeki hücrelerin görüntüleri verilmektedir.

Çizelge 4.9. Kaempferol yüklenmemiş kürelerin uygulandığı üretra hücrelerine ait apoptotik indeks sonuçları

	Kontrol (uygulama yapılmamış hücre)	560 mg MK*	280 mg MK	140 mg MK	70 mg MK	35 mg MK
% Apoptoz	1±	2±0,2	0,5±0,2	0	0	0
% Nekroz	1±	0,1±0,1	0	0	0	0

*MK: mikroküre





Şekil 4.25. Kaempferol yüklenmeyen mikrokürelerin uygulandığı üretra epitel hücrelerinin apoptoz-nekroz görüntüsü

(A,B:560 mg mikroküre uygulanan üretra epitel hücreleri, C,D: 280 mg mikroküre uygulanan üretra epitel hücreleri, E,F: 140 mg mikroküre uygulanan üretra epitel hücreleri, G,H: 70 mg mikroküre uygulanan üretra epitel hücreleri)

Klinikte uygulanan mit-c'nin yapılan ikili boyama ile L929 fibroblast hücrelerindeki öldürücü etkisinde nekrozun ağırlıklı olduğu gözlemlenmektedir. Konsantrasyonun azalmasına bağlı olarak ölüm oranında azalma görülmesine rağmen nekroz oranı apoptoz oranından daima yüksek olarak tespit edilmiştir. Çizelge 4.10'da detaylı olarak apoptotik indeks ve nekrotik indeks sonuçları verilmekte, şekil 4.21 de DAPI ve FITC filtresindeki hücrelerin görüntüleri verilmektedir.

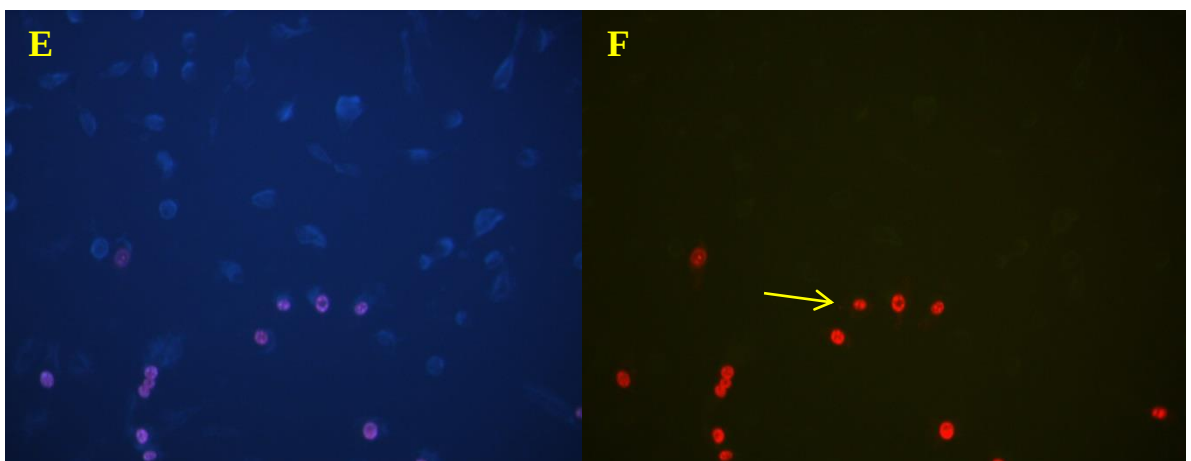
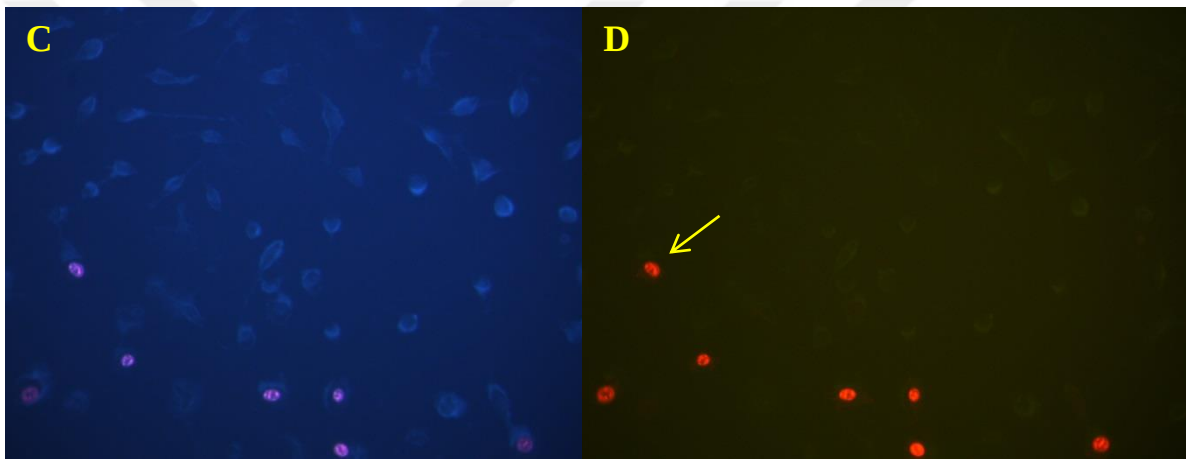
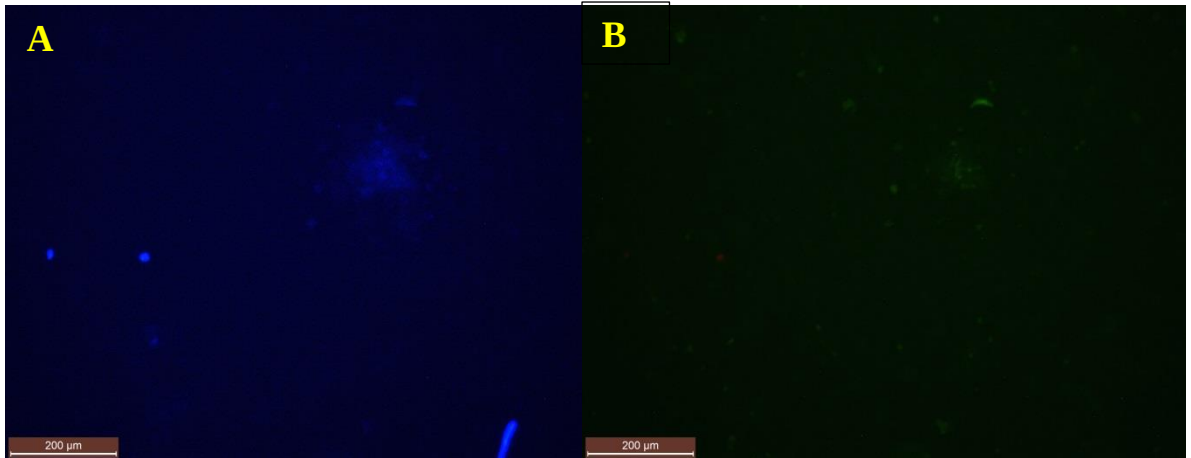
Çizelge 4.10. Mitomisin-c uygulanmış L929 hücrelerine ait apoptotik indeks sonuçları

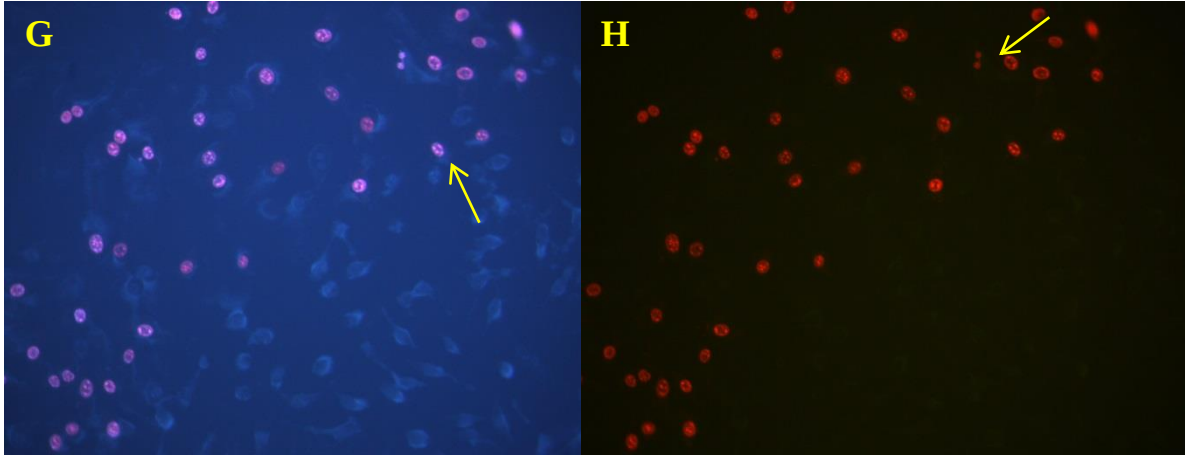
	Kontrol (uygulama yapılmamış hücre)	5 mg/mL Mit-c	2,5 mg/mL Mit-c	1,25 mg/mL Mit-c	0,625 mg/mL Mit-c
% Apoptoz	1±	3±0,2	0,3±0,1	0	0
% Nekroz	1±	8,2±0,1	2±0,1	0	0

(Mit-c: mitomisin-c)

DAPI

FITC





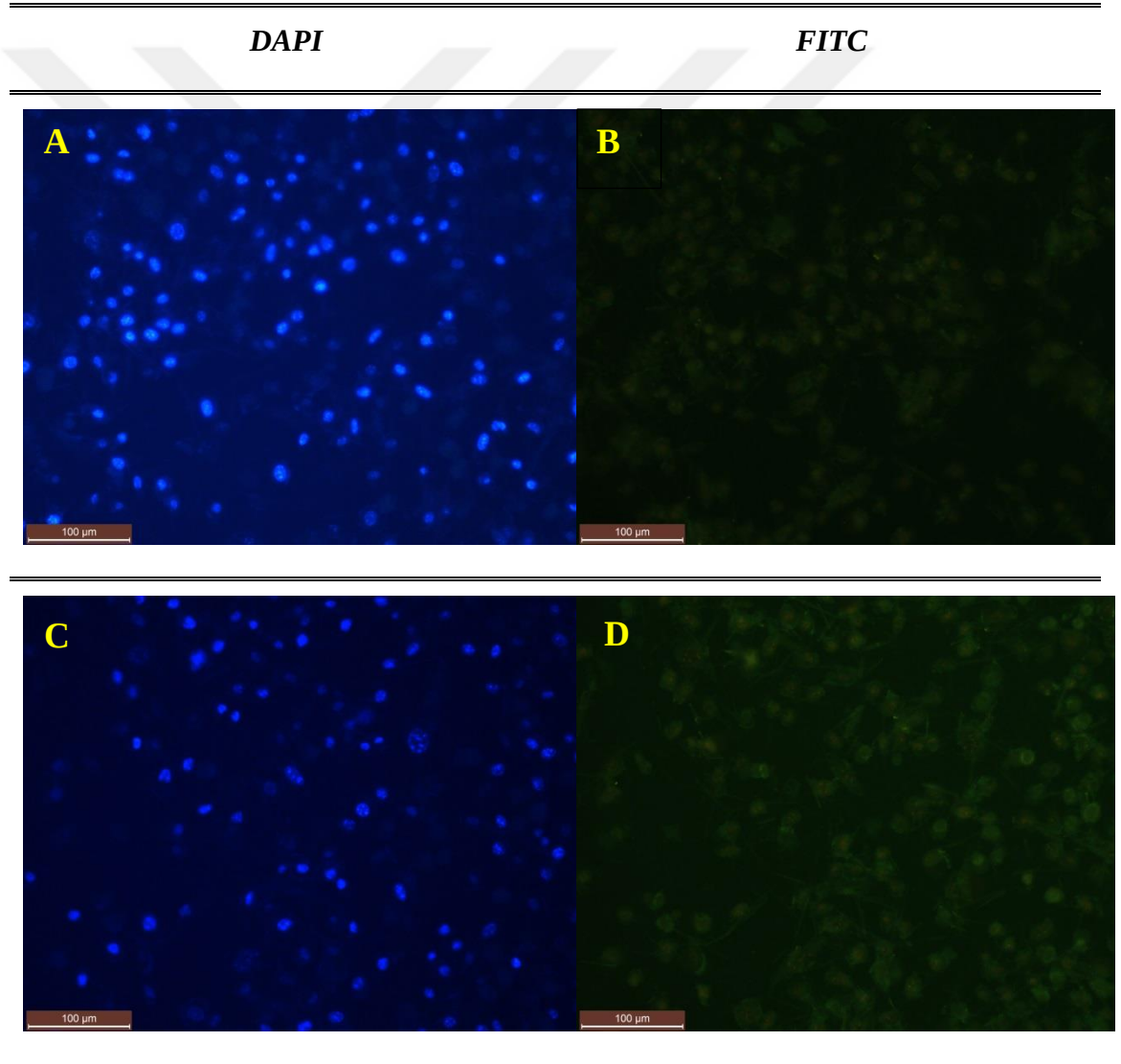
Şekil 4.26. L929 Hücre hattında Mit-c uygulanmış hücrelerin apoptoz-nekroz boyama görüntüleri

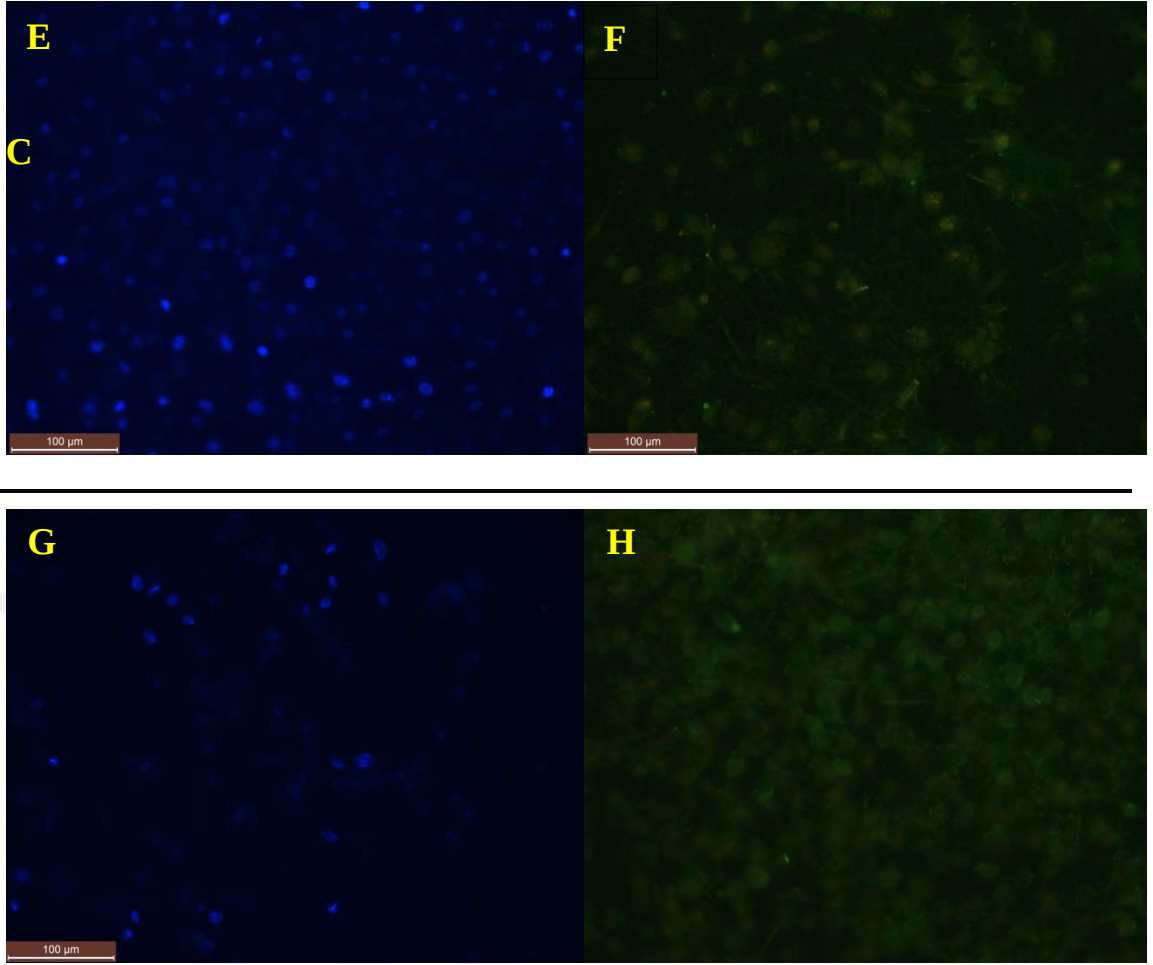
(A,B: 0.625 mg/mL mit-c uygulanan üretra epitel hücrelerinin görüntüleri., C,D: 1.25 mg/mL mit-c uygulanan üretra epitel hücrelerinin görüntüleri., E,F: 2,5 mg/mL mit-c uygulanan üretra epitel hücrelerinin görüntüleri., G,H: 5 mg/mL mit-c uygulanan üretra epitel hücrelerinin görüntüleri. DAPI filtresinde ok işareti ile gösterilen hücreler apoptotik ölen hücrelerdir, FITC filtresinde ok işareti ile gösterilen hücreler nekrotik ölen hücrelerdir.)

Yapılan double stanning boyaması ile L929 hücrelerine uygulanan kaempferolün toksik etkisinin olduğu tespit edilirken, apoptotik indeksinin nekrotik indeksinden yüksek olduğu gözlemlenmiştir. Elde edilen bu sonuç ile L929 hücrelerinde toksik etki gösteren kaempferolün hücrede rastgele bir ölüm gerçekleştirmediğinin göstergesi olmaktadır. Kaempferolün uygulama konsantrasyonunun azalmasına bağlı olarak ölüm oranlarında azalma gözlemlenirken; her durumda apoptotik indeksin nekrotik indeksten yüksek olduğu da gözlemlenmektedir. Çizelge 4.11’de detaylı olarak apoptotik indeks ve nekrotik indeks sonuçları verilmekte, şekil 4.22 de DAPI ve FITC filtresindeki hücrelerin görüntüleri verilmektedir.

Çizelge 4.11. Kaempferol uygulanmış L929 hücrelerine ait apoptotik indeks sonuçları

	Kontrol (uygulama yapılmamış hücre)	5 mg/mL K*	2,5 mg/mL K	1,25 mg/mL K	0,625 mg/mL K
% Apoptoz	1±	35,7±0,3	30,4±0,2	10,3±0,2	9,8±0,3
% Nekroz	1±	2,1±0,2	2±0,3	1,6±0,2	1,2±0,2





Şekil 4.27. L929 Hücre hattında kaempferol uygulanan hücrelerin apoptoz-nekroz boyama görüntüleri

(A,B: 5 mg/mL kaempferol uygulanan üretra epitel hücrelerinin görüntüleri., C,D: 2,5 mg/mL kaempferol uygulanan üretra epitel hücrelerinin görüntüleri., E,F:1.25 mg/mL kaempferol uygulanan üretra epitel hücrelerinin görüntüleri., G,H: 0.625 mg/mL kaempferol uygulanan üretra epitel hücrelerinin görüntüleri. DAPI filtresinde ok işareti ile gösterilen hücreler apoptotik ölen hücrelerdir, FITC filtresinde ok işareti ile gösterilen hücreler nekrotik ölen hücrelerdir.)

Kaempferol yüklenen mikrokürelerin uygulandığı L929 fibroblast hücrelerinin apoptotik-nekrotik indeks sonuçları incelendiğinde; 5,6 mg/mL konsantrasyonda kaempferol içeren mikrokürelerin fibroblast hücrelerinde apoptotik etkisinin nekrotik indeksinden yüksek olduğu görülmektedir. Konsantrasyona bağlı olarak hücreler üzerindeki toksik etki azalsa da apoptotik indeksin nekrotik indeksten her koşulda yüksek olduğu tespit edilmiştir. Çizelge 4.12’de detaylı olarak apoptotik indeks ve

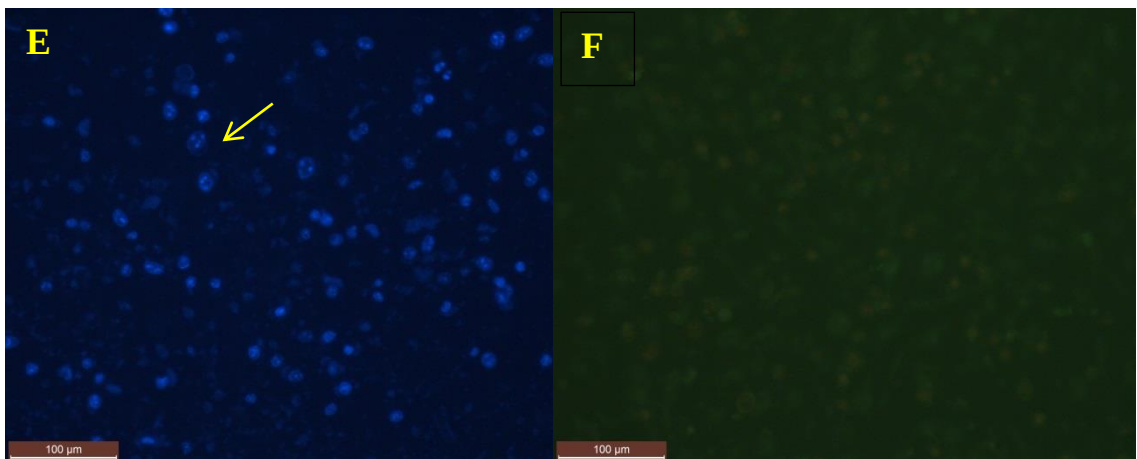
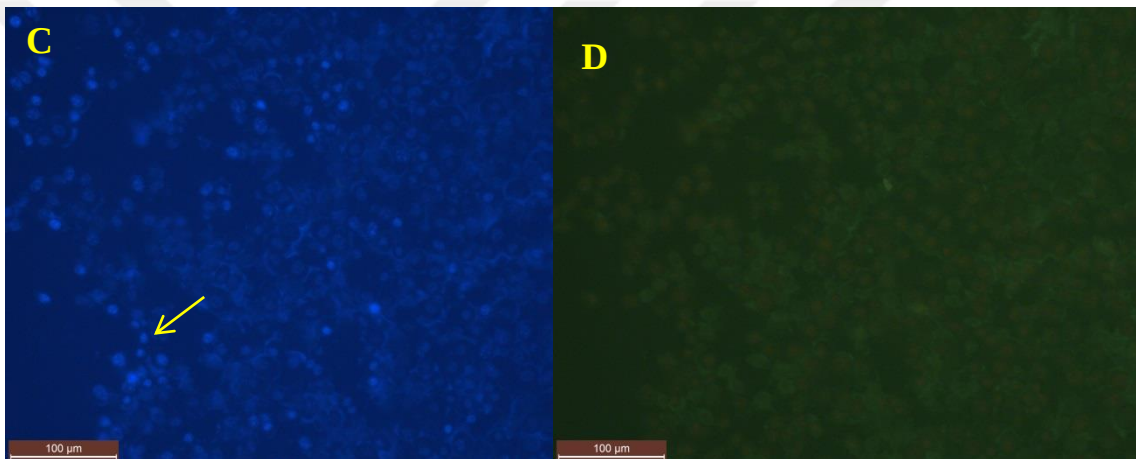
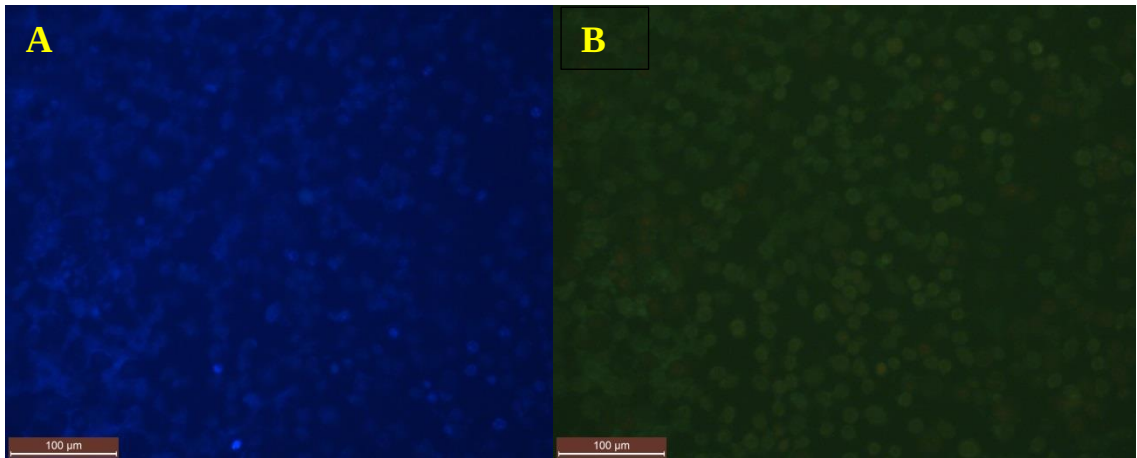
nekrotik indeks sonuçları verilmekte, şekil 4.23’de DAPI ve FITC filtresindeki hücrelerin görüntüleri verilmektedir.

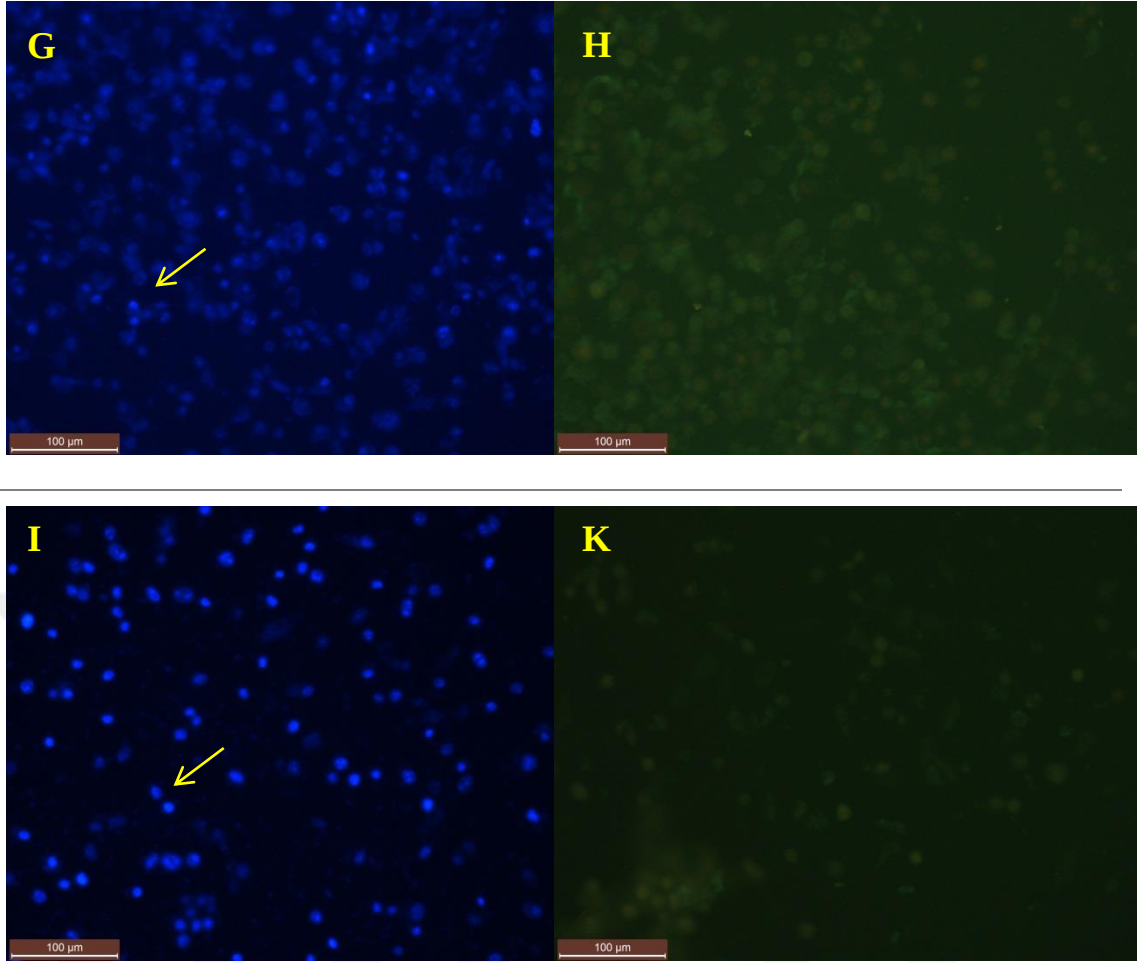
Çizelge 4.12. Kaempferol yüklenmiş kürelerin uygulandığı L929 hücrelerine ait apoptotik indeks sonuçları

	Kontrol	5,6 mg Kaempferol içeren	2,8 mg Kaempfero l içeren	1,4 mg Kaempferol içeren	0,7 mg Kaempfero l içeren	0,35 mg Kaempfero l içeren
% Apoptoz	1±	34,5±0,2	30±0,2	20±0,4	14±0,5	8±0,4
% Nekroz	1±	1,2±0,1	1,0±0,1	0,5±0,2	0,3±0,2	0

DAPI

FITC





Şekil 4.28. L929 hücre hattında Kaempferol yüklenmiş mikrokürelerin (KYMK) apoptoz-nekroz boyama görüntüleri

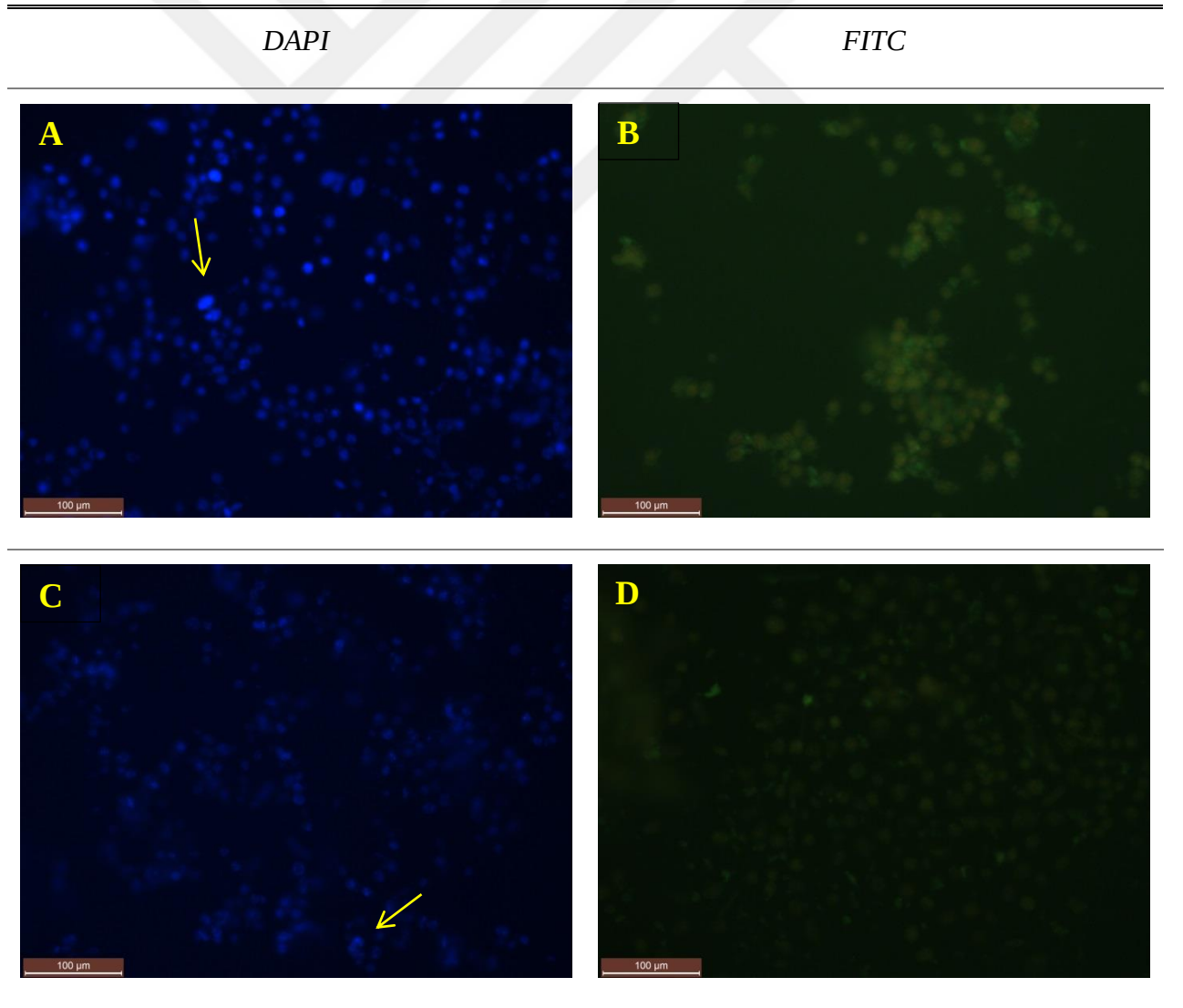
(A,B: 0,35 mg/mL kaempferol uygulanan üretra epitel hücrelerinin görüntüleri., C,D: 0,7 mg/mL kaempferol uygulanan üretra epitel hücrelerinin görüntüleri., E,F: 1,4 mg/mL kaempferol uygulanan üretra epitel hücrelerinin görüntüleri., G,H: 2,8 mg/mL kaempferol uygulanan üretra epitel hücrelerinin görüntüleri., I,K: 5,6 mg/mL kaempferol uygulanan üretra epitel hücrelerinin görüntüleri. DAPI filtresinde ok işareti ile gösterilen hücreler apoptotik ölen hücrelerdir, FITC filtresinde ok işareti ile gösterilen hücreler nekrotik ölen hücrelerdir.)

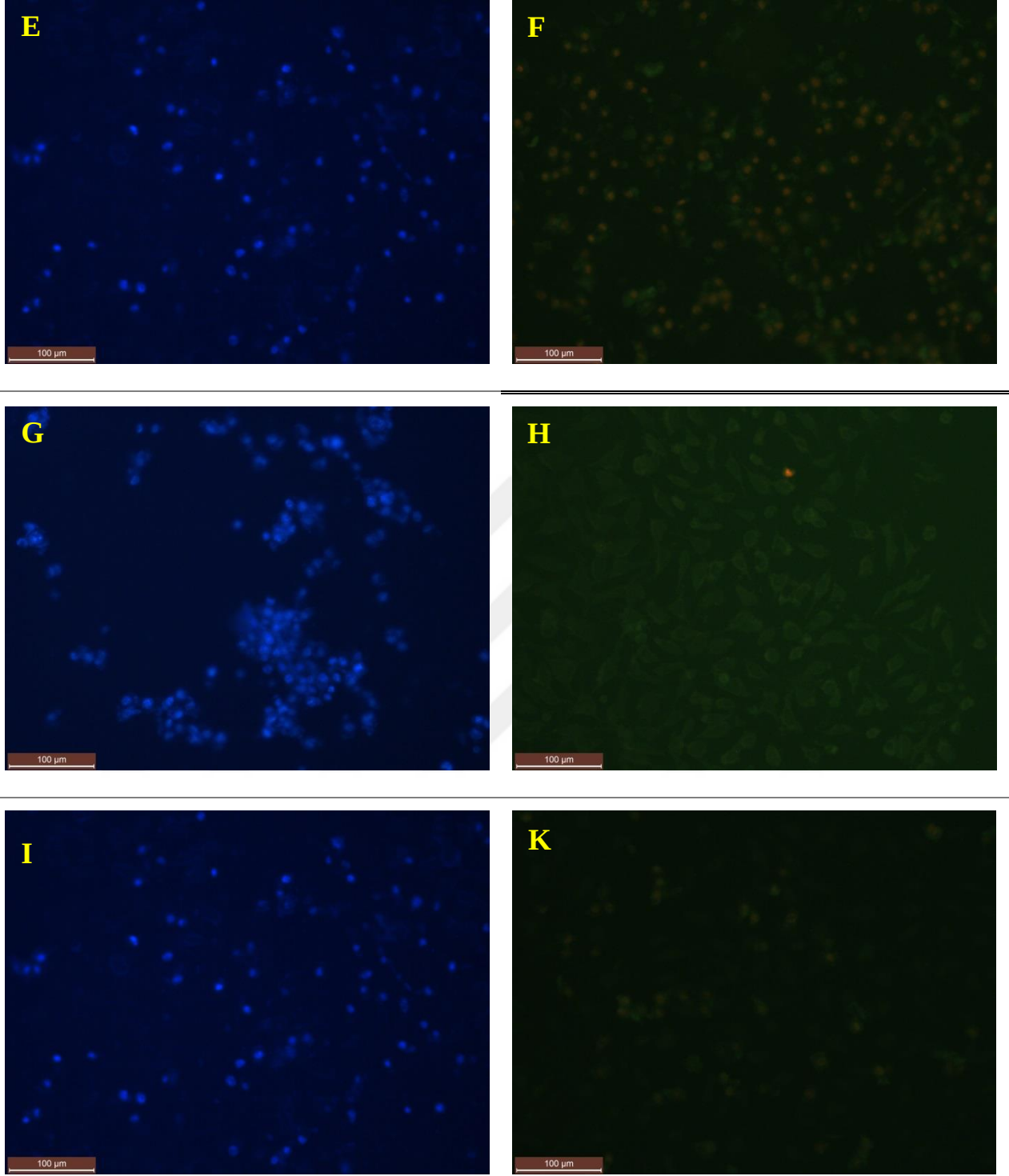
L929 fibroblast hücre hattında kaempferol yüklenmeyen mikrokürelerin uygulanması sonucunda nekrotik ölüme rastlanılamamıştır. Apoptotik ölüm ise en yüksek konsantrasyon olan 560 mg uygulanan mikrokürelerde $8\pm0,4$ oranında tespit edilmiştir. Çizelge 4.13 de apoptotik nekrotik ölüm oranları detaylı olarak verilirken şekil 4.24' DAPI ve FITC filtrelerinde hücrelerin görüntüleri verilmiştir.

Çizelge 4.13. Kaempferol yüklenmemiş kürelerin uygulandığı L929 hücrelerine ait apoptotik indeks sonuçları

	Kontrol (uygulama yapılmamış hücre)	560 mg MK*	280 mg MK	140 mg MK	70 mg MK	35 mg MK
% Apoptoz	1±	8±0,4	4,7±0,4	0	0	0
% Nekroz	1±	0	0	0	0	0

*MK: mikroküre



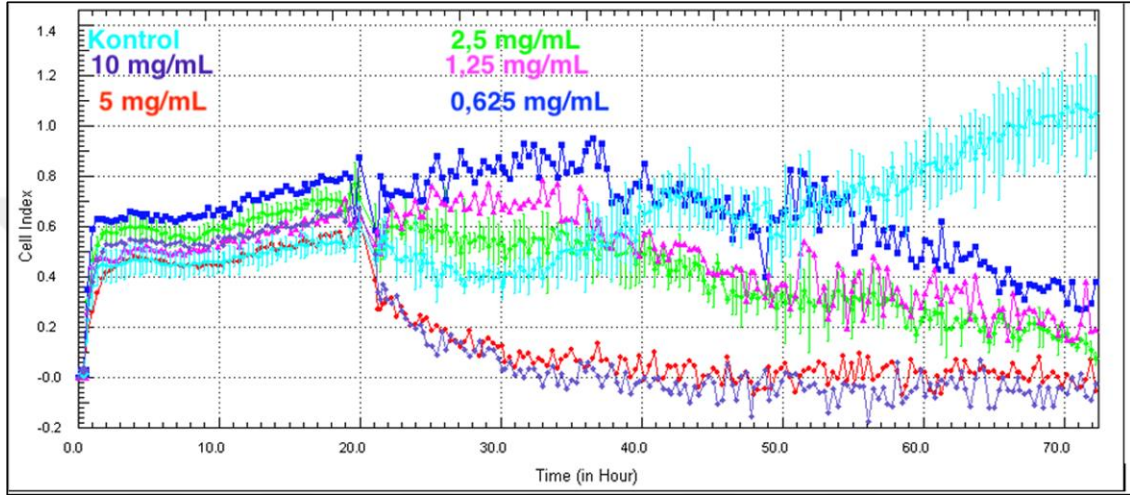


Şekil 4.29. L929 hücre hattında Kaempferol yüklenmemiş boş kürelerin apoptoz-nekroz görüntüleri

(A,B:560 mg mikroküre uygulanan L929 fibroblast hücreleri, C,D: 280 mg mikroküre uygulanan L929 fibroblast hücreleri, E,F: 140 mg mikroküre uygulanan L929 fibroblast hücreleri, G,H: 70 mg mikroküre uygulanan L929 fibroblast hücreleri)

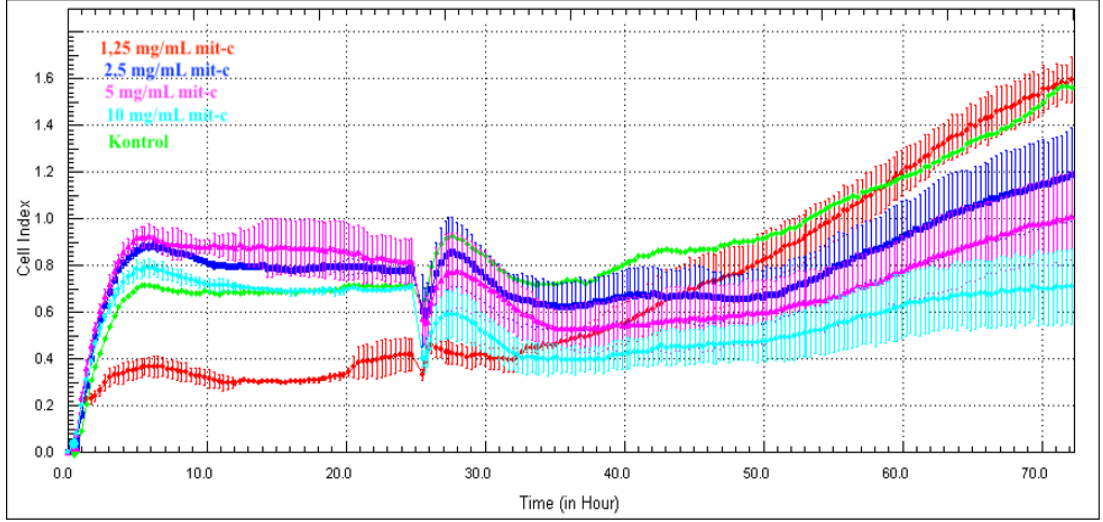
4.15 Gerçek Zamanlı Hücre Analiz Sistemi (xCELLigence RTCA) ile Hücre Proliferasyonu Sonuçları

Hazırlanan ilaç yüklenmiş ve yüklenmemiş mikrokürelerin, kaempferolün ve mit-c'nin L929 fibroblast hücrelerindeki ve üretra epitel hücrelerine ait proliferasyon grafikleri şekil 4.30-4.36'da verilmiştir.



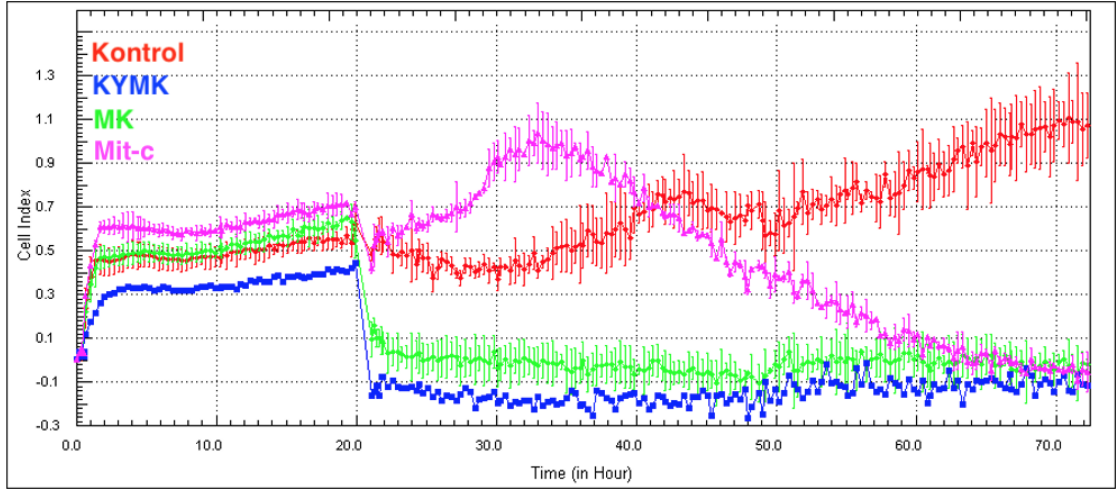
Şekil 4.30. Kaempferolün konsantrasyonlarının L929 Fibroblast hücre proliferasyon grafiği

L929 fibroblast hücrelerinde kaempferol farklı konsantrasyonlarda uygulanmış ve 48 saat süre hücre proliferasyonları incelenmiştir. Uygulamanın ardından ilk 24 saatte hücrelerin proliferasyonu incelendiğinde 5 mg/mL ve 10 mg/mL konsantrasyonlarındaki kaempferolün uygulamanın ardından geçen 8 saatte hücre proliferasyonunu düşürdüğü ve uygulama süresinin sonunda proliferasyonun kontrol grubundan oldukça düşük olduğu tespit edilmiştir. Daha düşük konsantrasyonlarda (2,5 mg/mL, 1,25 mg/mL ve 0,625 mg/mL) uygulanan kaempferolün 52. Saate kadar kontrol grubu ile arasında anlamlı bir proliferasyon farkı göstermediği ancak sonrasında proliferasyonda azalma gösterdiği gözlemlenmiştir. Kaempferol düşük konsantrasyonlarda uygulama zamanı arttırıldığında fibroblast hücreleri üzerinde etkili olmuştur.



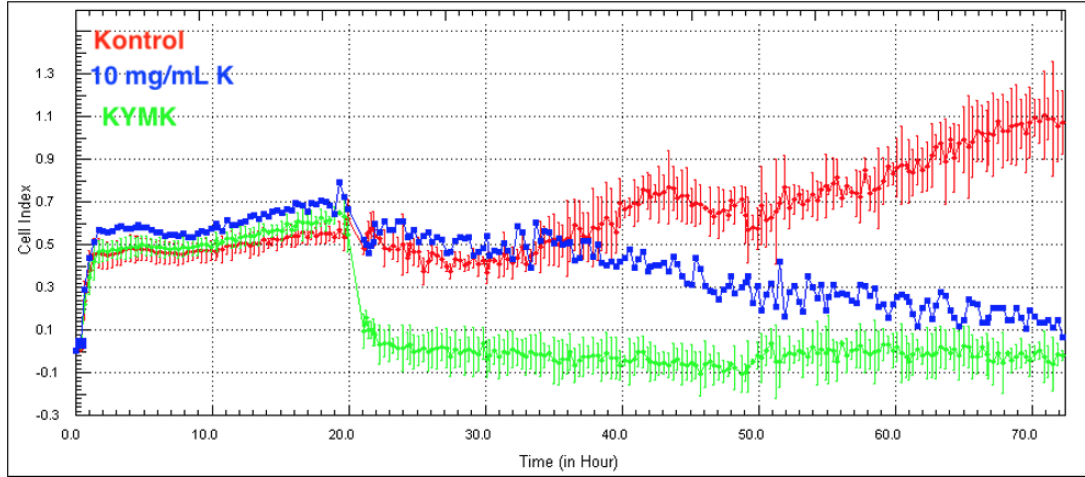
Şekil 4.31. Mit-c konsantrasyonlarının L929 fibroblast hücre proliferasyon grafiği

Klinikte üretral darlık için sık tercih edilen mit-c'nin L929 hücrelerinde proliferasyonları incelendiğinde kontrol grubu ile arasında bütün konsantrasyonlar için anlamlı bir fark görülmemiştir. Yalnızca yüksek konsantrasyonda uygulanan (10 mg/mL) hücre proliferasyonunda azalmaya sebep olduğu gözlemlenmiştir.



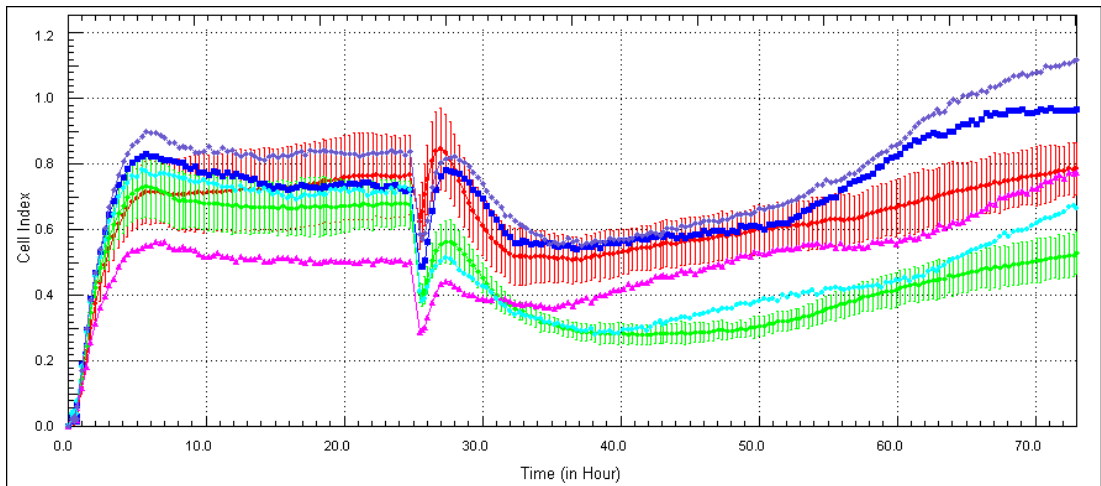
Şekil 4.32. KYMK, MK, Mit-c ve kontrol grubunun L929 hücre proliferasyon grafiği (KYMK: Kaempferol Yuklenmiş Mikroküre, MK: ilaç yüklenmemiş mikroküre, Mit-c: Mitomycin-c)

Mit-c, kaempferol yüklenen ve yüklenmeyen mikrokürelerin L929 fibroblast hücrelerinde proliferasyonları incelendiğinde; mikrokürelerin, ve kaempferol yüklü mikrokürelerin hücre proliferasyonunda azalmaya sebep olduğu, mit-c'nin bu tip bir etkisinin olmadığı tespit edilmiştir. Ayrıca kaempferol yüklü mikroküreler yüklenmeyen mikrokürelere göre daha etkilidir.



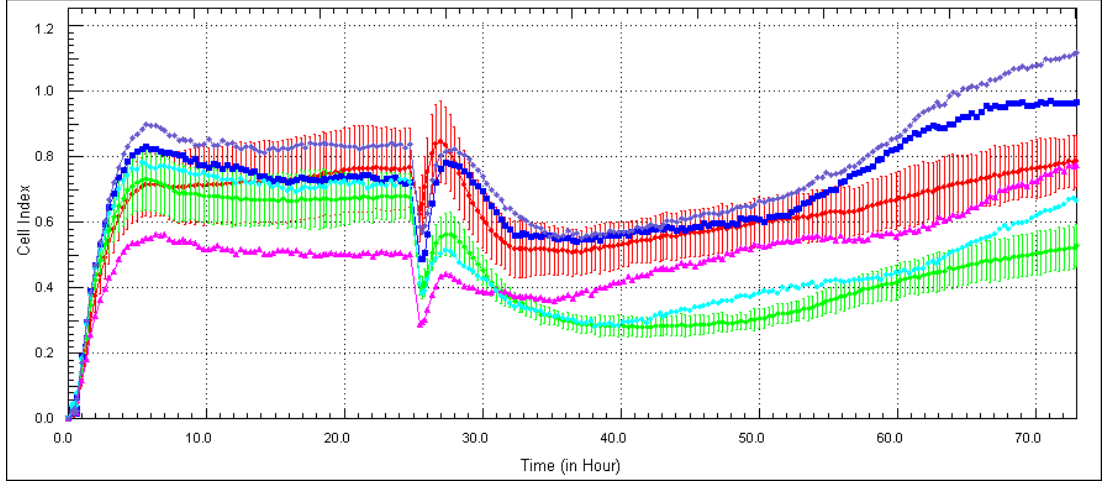
Şekil 4.33. KYMK, kaempferol ve kontrol grubunun L929 hücre proliferasyon grafiği (KYMK: Kaempferol Yüklenmiş Mikroküre, K: kaempferol)

Kaempferol yüklü mikroküreler ve kaempferolün L929 hücrelerinde proliferatif etkisi incelendiğinde; kaempferol yüklü mikrokürelerin proliferasyonu kaempferole göre daha fazla azalttığı tespit edilmiştir. Kaempferol uygulanan hücrelerin proliferasyonu incelendiğinde kontrol grubundan daha az proliferasyona sahip olduğu tespit edilmiştir. Uygulama süresi sonunda kaempferol yüklü mikroküreler ve kaempferolün proliferatif etkisi hemen hemen aynı olmuştur.



Şekil 4.34. Kaempferol yüklenmemiş mikrokürelerin L929 hücrelerinde proliferasyon grafiği

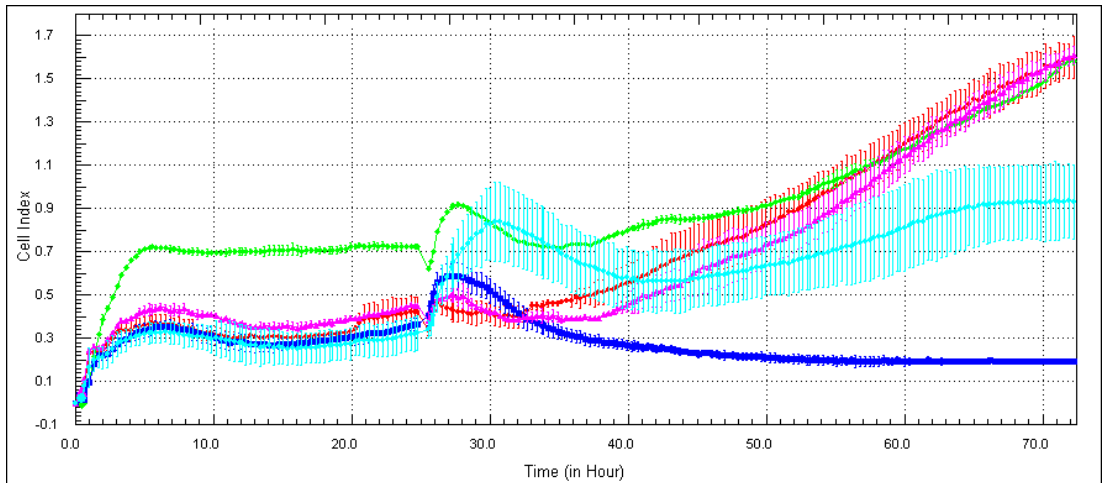
(Kırmızı: kontrol grubu, mor: 35 mg mikroküre, lacivert:70 mg mikroküre, pembe: 140 mg mikroküre, turkuaz: 280 mg mikroküre, yeşil: 560 mg mikroküre)



Şekil 4.35. Kaempferolün üretra epitel hücrelerinde hücre proliferasyon grafiği

(Kırmızı: kontrol grubu, yeşil:10 mg/mL kaempferol, turkuaz 5 mg/mL kaempferol, pembe 2,5 mg/mL kaempferol, lacivert:1,25 mg/mL kaempferol, mavi: 0,625 mg/mL kaempferol)

Üretra epitel hücrelerine uygulanan kaempferolün farklı konsantrasyonlarının hücre proliferasyonuna etkisi yukarıdaki grafikte verilmiştir. Uygulanan konsantrasyonlardan 10 mg/mL ve 5 mg/mL'de hücre proliferasyonunda azalma gösterdiği ancak uygulama sonlandırıldığında (72 saat) kontrol grubu ile arasında anlamlı bir fark olmadığı tespit edilmiştir.



Şekil 4.36. Üretra epitel hücrelerinde mit-c, kaempferol, kaempferol yüklenen ve yüklenmeyen mikrokürelerin hücre proliferasyon grafiği

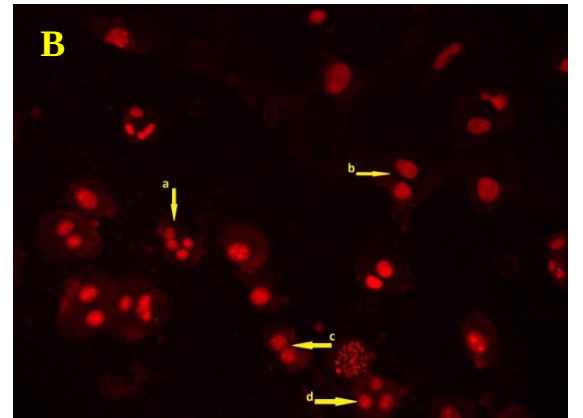
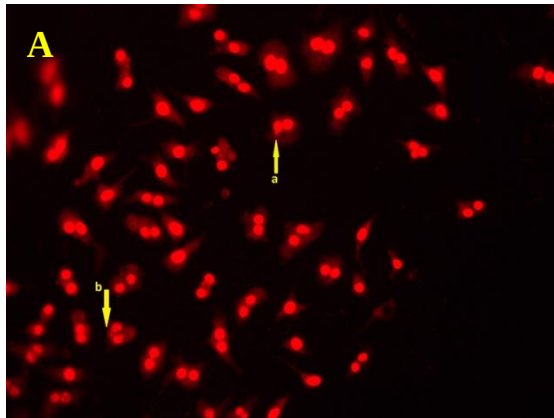
(Kırmızı: kontrol grubu, lacivert: mit-c 5 mg/mL, yeşil: mikroüre, pembe kaempferol yüklü mikroküre, turkuaz: kaempferol)

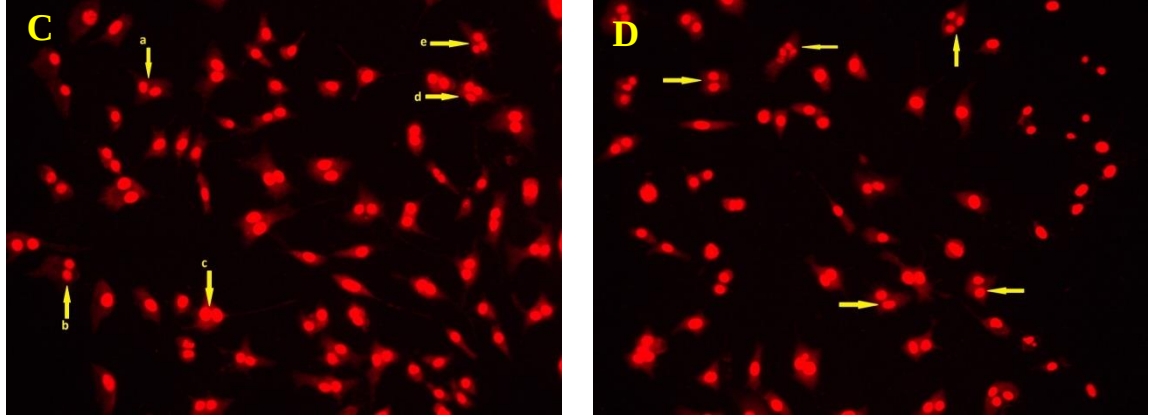
Üretra epitel hücrelerinde mit-c, kaempferol, kaempferol yüklenen ve yüklenmeyen mikrokürelerin proliferasyonları incelendiğinde; mit-c'nin üretra epitel hücrelerinin proliferasyonunu azalttığı tespit edilmiştir. 10 mg/mL kaempferol kontrol grubuna göre proliferasyonu azaltmada bu azalma anlamlı bir azalma değildir. Kaempferol yüklü mikroküreler incelendiğinde kontrol grubu ile arasında anlamlı bir fark olmadığı ve hücre proliferasyonunu azaltıcı bir etkisinin olmadığı tespit edilmiştir.

4.16 İn Vitro Genotoksisite (Mikronükleus Testi) Sonuçları

4.16.1 L929 Hücrelerinde Kaempferol, Mit-c, İlaç Yüklenmiş ve İlaç Yüklenmemiş Mikrokürelerin Genotoksisite Sonuçları

Deney prosedürü 72 saatte gerçekleşmektedir, L929 fibroblast hücreleri canlılığının dokularının tamamında bulunmakta ve üretral darlık sırasında darlığın olduğu bölgede artış göstermektedir. Bu sebeple L929 hücrelerinde sentezlenen mikrokürelerin ve ilaç olarak tercih edilen kaempferolün bu hücre hattı üzerinde genotoksik bir etkisinin olup olmadığı incelenmiştir. 72 saat sonunda uygulanan malzemelerin in vitro değerlendirme sonucunda elde edilen veriler Spss 15 ile Varyans Analizi (ANOVA) ve Duncan istatistik testleri uygulanarak belirlendi. İn vitro mikronükleus testinde kontrol ve deney grupları için 1000 adet binükleus olacak şekilde toplamda 2000 hücre sayılmıştır. Standartta belirtilen CBPI ve RI değerleri hesaplanmıştır. Replikasyon Endeksi (RI) muamele edilmemiş kontrole göre bir muamele edilmiş kültür içinde maruziyet süresi ve iyileşme sırasındaki tamamlanmış hücre bölünmesi döngüsü oranıdır, CBPI indeksi ise sitokinez proliferasyon blok indeksidir. Ayrıca sayılan 2000 hücre arasından mikronükleus oluşturmuş binükleuslu hücreler sayılarak istatistiksel analiz yapılmıştır.



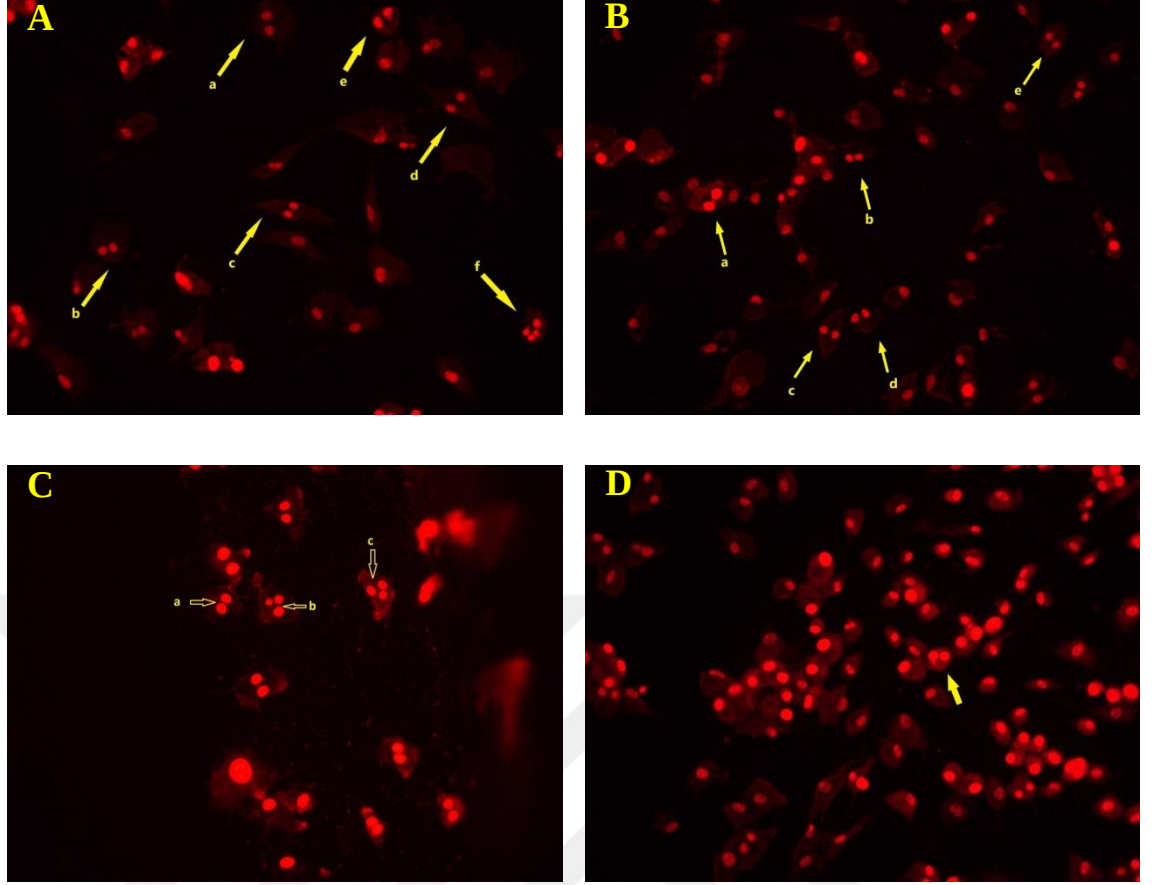


Şekil 4.37. Fibroblast hücrelerine uygulanan kaempferol ve mit-c'nin PI ile boyanmasının genotoksisite fotoğrafları

(A: 5 mg/mL mit-c uygulanmış L929 hücreleri (a,b: binükleer hücrelerde bulunan mikronükleuslu hücreler), (B: 0,625 mg/mL mit-c uygulanmış L929 hücreler)

4.16.2 Üretra Epitel Hücrelerinde Kaempferol, Mit-c, İlaç Yüklenmiş ve İlaç Yüklenmemiş Mikrokürelerin Genotoksisite Sonuçları

Deney prosedürü 72 saatte gerçekleşmektedir, üretra epitel hücreleri sentezlenen mikrokürelerin ve ilaç olarak belirlenmiş olan kaempferolün doğrudan temas kuracağı ve normal histolojisinde bulunması gereken hücrelerdir, bu sebeple malzemelerin bu hücreler üzerinde genotoksik bir durum oluşturması istenmemektedir. 72 saat sonunda uygulanan malzemelerin in vitro değerlendirme sonucunda elde edilen veriler Spss 15 ile Varyans Analizi (ANOVA) ve Duncan istatistik testleri uygulanarak belirlendi. İn vitro mikronükleus testinde kontrol ve deney grupları için 1000 adet binükleus olacak şekilde toplamda 2000 hücre sayılmıştır. Standartta belirtilen CBPI ve RI değerleri hesaplanmıştır. Replikasyon Endeksi (RI) muamele edilmemiş kontrole göre bir muamele edilmiş kültür içinde maruziyet süresi ve iyileşme sırasındaki tamamlanmış hücre bölünmesi döngüsü oranıdır, CBPI indeksi ise sitokinez proliferasyon blok indeksidir.



Şekil 4.38. Üretra epitel hücrelerine uygulanan kaempferol ve mit-c'nin PI ile boyanmasının genotoksisite fotoğrafları

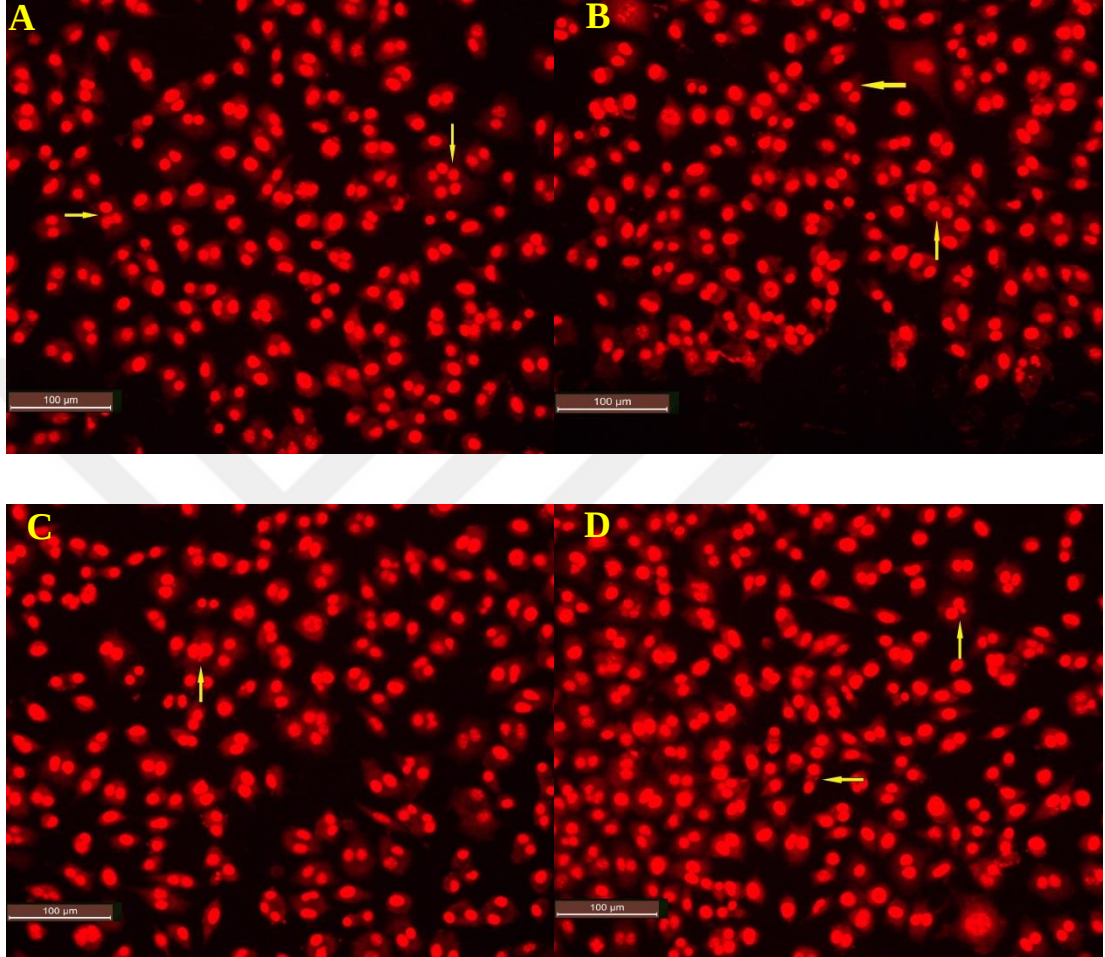
(A: 5 mg/mL Kaempferol uygulanmış üretra hücreleri (a,b,c,d,e: binükleer hücreler, f: çok nükleuslu hücreler), (B: 0,625 mg/mL kaempferol uygulanmış üretra hücreleri) (C,d: Mit-c uygulanmış üretra epitel hücreleri)

4.16.3 CHO Hücrelerinde Kaempferol, Mit-c, İlaç Yüklenmiş ve İlaç

Yüklenmemiş Mikrokürelerin Genotoksisite Sonuçları

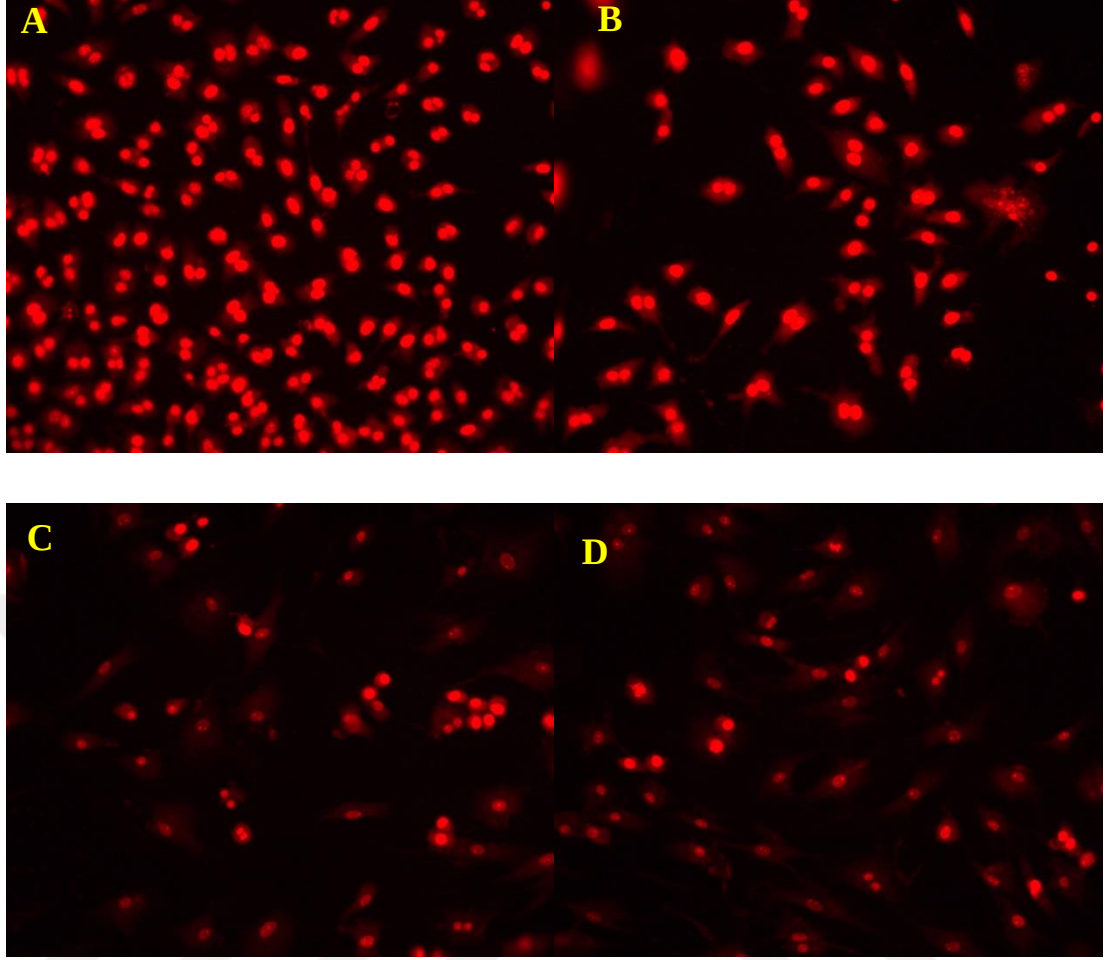
CHO hücreleri biyomalzemelerin ve tıbbi cihazların in vitro genotoksik etkisinin belirlenmesi için standart olarak kullanılan TS EN ISO 10993-3 'ün yönlendirdiği; OECD 487 (In Vitro Memeli Hücresi Mikronükleus Testi) test standartının önerdiği hücre hattıdır. Deney prosedürü 72 saat gerçekleşmektedir, 72 saat sonunda uygulanan malzemelerin in vitro mikronükleus testinde kontrol ve deney grupları için 1000 adet binükleus olacak şekilde toplamda 2000 hücre sayılmıştır. Standartta belirtilen CBPI ve RI değerleri hesaplanmıştır. Replikasyon Endeksi (RI) muamele edilmemiş kontrole göre bir muamele edilmiş kültür içinde maruziyet süresi ve iyileşme

sırasındaki tamamlanmış hücre bölünmesi döngüsü oranıdır, CBPI indeksi ise sitokinez proliferasyon blok indeksidir. Ayrıca sayılan 2000 hücre arasından mikronükleus oluşturmuş binükleuslu hücreler sayılarak istatistiksel analiz yapılmıştır.



Şekil 4.39. CHO hücrelerine uygulanan kaempferol ve mit-c'nin PI ile boyanmasının genotoksisite fotoğrafları

(A: 5 mg/mL Kaempferol uygulanmış CHO hücreleri (ok işaretleri çok nükleuslu hücreleri göstermektedir.), B: 0,625 mg/mL kaempferol uygulanan CHO hücreleri (ok işaretleri binükleer hücreleri göstermektedir). C: 5 mg/mL mit-c uygulanan CHO hücreleri (ok işaretleri mikronükleuslu hücreleri göstermektedir.) D: 0,625 mg/mL mit-c uygulanan CHO hücreleri (ok işaretleri mikronükleuslu hücreleri göstermektedir.)



Şekil 4.40. Uygulama yapılmamış kontrol gruplarına ait hücrelerin PI ile boyanmasının genotoksisite fotoğrafları

(A: CHO hücreleri, B: L929 hücreleri, C: Üretra epitel hücreleri, D: CytB uygulanmamış üretra epitel hücreleri)

TS EN ISO 10993-3'ün yönlendirdiği OECD 487 standartına göre %cytosis değerleri hesaplanmıştır, mikronükleus oranları da % cinsinden verilmiştir. Tüm veriler incelendiğinde standartta genotoksik etkisi bilinen mit-c genotoksik etki gösterirken, kaempferol, kaempferol yüklenen ve yüklenmeyen mikrokürelerin genotoksik bir etkisinin olmadığı tespit edilmiştir.

Genotoksik etkinini standartta CHO hücre hattında yapılması önerilmektedir. Yapılan tez çalışmasında lokal uygulama yapılması planlanan malzemelerin ilgili dokulardaki etkinliklerini de belirlemek amacı ile L929 fibroblast hücrelerinde ve üretra epitel hücrelerinde de inceleme yapılmıştır. Testin yapıldığı tüm hücre hatlarından elde edilen CBPI değeri ve mikronükleus oranları çizelge 4.14'de detaylı olarak verilmiştir.

Çizelge 4.14. Genotoksisite testi yapılan CHO, üretra epitel ve L929 fibroblast hücrelerinin CBPI ve %mikronükleus değerleri

Malzeme Adı	Konsantrasyon mg/mL	S9 - /+	CHO		Üretra Epitel Hücreleri		L929 Fibroblast Hücreleri	
			% Mikronükleus	CBPI	% Mikronükleus	CBPI	% Mikronükleus	CBPI
Kaempferol	5 mg/mL	-	0,494	1,758	0,458	1,731	0,475	1,762
		+	0,411	1,738	0,596	1,707	0,194	1,853
	2.5 mg/mL	-	0,581	1,753	0,454	1,724	0,465	1,769
		+	0,356	1,780	0,508	1,689	0,538	1,764
	1,25 mg/mL	-	0,489	1,770	0,487	1,699	0,457	1,779
		+	0,296	1,764	0,604	1,685	0,534	1,776
	0.625 mg/mL	-	0,507	1,760	0,366	1,709	0,456	1,764
		+	0,389	1,743	0,459	1,702	0,457	1,761
	5 mg/mL	-	6,560	1,762	7,315	1,646	6,411	1,691
		+	7,022	1,796	7,784	1,661	6,307	1,693
Mit-C	2.5 mg/mL	-	6,221	1,754	6,534	1,698	6,586	1,693
		+	6,143	1,794	6,430	1,709	6,371	1,690
	1,25 mg/mL	-	5,945	1,761	6,922	1,699	6,403	1,694
		+	6,381	1,795	7,816	1,699	6,002	1,698
	0.625 mg/mL	-	4,992	1,781	7,048	1,693	6,250	1,698
		+	5,130	1,789	6,612	1,699	6,339	1,706
	5.6 mg/mL	-	0,391	1,791	0,490	1,713	0,484	1,793
		+	0,497	1,788	0,491	1,717	0,591	1,791
	2.8 mg/mL	-	0,487	1,750	0,482	1,736	0,482	1,754
		+	0,462	1,749	0,386	1,732	0,641	1,751
*KYMK	1.4 mg/mL	-	0,466	1,775	0,487	1,717	0,461	1,778
		+	0,363	1,794	0,583	1,717	0,540	1,795
	0.7 mg/mL	-	0,394	1,774	0,484	1,732	0,585	1,775
		+	0,356	1,743	0,383	1,737	0,529	1,745
	0,35 mg/mL	-	0,440	1,757	0,491	1,722	0,436	1,761
		+	0,366	1,769	0,487	1,720	0,635	1,770
	560 mg mk	-	0,434	1,803	0,446	1,728	0,430	1,806
		+	0,344	1,820	0,366	1,731	0,512	1,821
	280 mg mk	-	0,462	1,799	0,434	1,778	0,458	1,802
		+	0,457	1,794	0,427	1,771	0,543	1,797
**MK	140 mgmk	-	0,508	1,785	0,432	1,760	0,336	1,790
		+	0,486	1,800	0,503	1,765	0,577	1,802
	70 mg mk	-	0,335	1,796	0,369	1,763	0,416	1,798
		+	0,444	1,787	0,457	1,777	0,528	1,789
	35 mg mk	-	0,393	1,810	0,490	1,746	0,312	1,813
		+	0,316	1,826	0,401	1,753	0,471	1,826
Kontrol	boş besiyeri	-	0,531	1,755	0,529	1,717	0,527	1,758
		+	0,587	1,750	0,547	1,730	0,582	1,753
Mit-c Kontrol	10 ug/mL	-	5,388	1,763	6,732	1,693	5,158	1,768
		+	5,590	1,724	6,874	1,720	5,101	1,731

*KYMK: Kaempferol yüklenen mikroküre

**MK: Mikroküre

4.16.4 AMES Testi ile Kaempferol, Mit-c, İlaç Yüklenmiş ve İlaç Yüklenmemiş Mikrokürelerin Sonuçları

Ames testinde yöntem uygulamasının ardından inkübasyonu sonlandırılan petrilerin geri dönen kolonileri sayılmıştır. Farklı konsantrasyonlarda 3 tekrarlı olarak çalışılan petrilerin geri dönen sayıları çizelgede verilmiştir.

Hazırlanan malzemelerin TA97, TA98, TA100,TA102 ve TA1535 suşlarında yapılan çalışmada geri dönen koloni sayıları incelenmiş ve kontrol grubuyla kaempferol yüklü mikrokürelerin, kaempferolün ve kaempferol yüklenmeyen mikrokürelerin koloni sayıları arasında anlamlı bir fark bulunamamıştır.

Hazırlanan malzemelerin TA97, TA98, TA100, TA102 ve TA1535 suşlarında yapılan çalışmada

Kaempferol		TA-97			TA-98			TA-100			TA-102			TA-1535		
s9(-)	Konsantrasyon	Geri Dönen Koloni Sayısı			Geri Dönen Koloni Sayısı			Geri Dönen Koloni Sayısı			Geri Dönen Koloni Sayısı			Geri Dönen Koloni Sayısı		
	5 mg/mL	98	125	142	42	38	30	145	132	168	210	195	187	14	13	15
	2.5 mg/mL	135	118	89	32	40	35	140	146	157	201	184	169	18	10	14
	1.25 mg/mL	139	128	115	28	38	41	132	140	164	172	180	182	16	14	13
	0.625 mg/mL	110	132	127	28	34	35	140	125	134	168	165	187	16	14	18
	0.3125 mg/mL	128	108	112	39	35	41	125	109	146	180	194	165	17	13	10
s9(+)	5 mg/mL	142	132	128	41	39	42	178	78	148	211	242	272	6	11	5
	2.5 mg/mL	131	129	135	39	41	38	198	113	152	266	148	163	14	6	11
	1.25 mg/mL	142	136	125	49	29	38	142	168	96	132	120	175	19	7	8
	0.625 mg/mL	121	125	123	29	35	42	155	96	120	176	244	265	17	17	11
	0.3125 mg/mL	128	134	127	28	31	45	96	123	176	295	104	160	13	13	18

Şekil 4.41. Kaempferolün Ames testi ile geri dönen koloni sayıları

KYMK		TA-97			TA-98			TA-100			TA-102			TA-1535		
s9(-)	Konsantrasyon	Geri Dönen Koloni Sayısı			Geri Dönen Koloni Sayısı			Geri Dönen Koloni Sayısı			Geri Dönen Koloni Sayısı			Geri Dönen Koloni Sayısı		
	5 mg/mL	158	91	134	44	20	41	196	85	154	262	158	292	15	12	13
	2.5 mg/mL	145	159	107	35	40	26	117	114	161	239	219	149	15	8	5
	1.25 mg/mL	80	88	137	23	31	31	124	164	100	220	204	243	14	7	14
	0.625 mg/mL	91	135	145	27	50	31	192	124	176	274	287	230	19	18	19
	0.3125 mg/mL	166	172	116	41	25	20	148	139	190	269	166	234	8	20	12
s9(+)	5 mg/mL	100	153	127	49	48	33	156	187	79	369	376	392	9	18	13
	2.5 mg/mL	154	146	198	45	20	26	148	157	132	315	207	333	11	9	12
	1.25 mg/mL	179	142	177	25	24	23	110	129	83	339	269	334	6	5	9
	0.625 mg/mL	180	124	177	26	49	34	97	120	173	230	271	297	11	8	20
	0.3125 mg/mL	159	198	101	37	45	41	189	76	195	377	282	219	6	8	16

Şekil 4.42. Kaempferol yüklü mikrokürelerin(KYMK) farklı konsantrasyonlardaki Ames testinde geri dönen koloni sayıları

MK		TA-97			TA-98			TA-100			TA-102			TA-1535		
s9(-)	Konsantrasyon	Geri Döner Koloni Sayısı			Geri Döner Koloni Sayısı			Geri Döner Koloni Sayısı			Geri Döner Koloni Sayısı			Geri Döner Koloni Sayısı		
	5 mg/mL	159	152	142	32	27	48	82	166	79	273	225	186	11	19	17
	2.5 mg/mL	101	199	121	20	34	26	148	132	178	178	140	148	6	17	19
	1.25 mg/mL	176	116	126	33	49	29	101	86	166	282	285	296	5	20	14
	0.625 mg/mL	140	166	150	30	45	40	133	159	196	149	243	136	10	8	11
	0.3125 mg/mL	152	164	137	41	30	44	132	196	134	156	159	268	6	20	12
	1/1	184	126	173	35	22	46	85	157	160	276	384	369	13	10	18
	1/2	200	163	167	38	34	34	162	158	89	284	253	241	17	20	19
	1/4	191	136	140	38	25	42	97	82	111	302	202	341	14	7	6
	1/8	123	105	140	30	48	26	122	137	125	271	386	369	15	18	14
	1/16	169	106	176	21	48	36	198	100	83	238	231	360	13	7	20

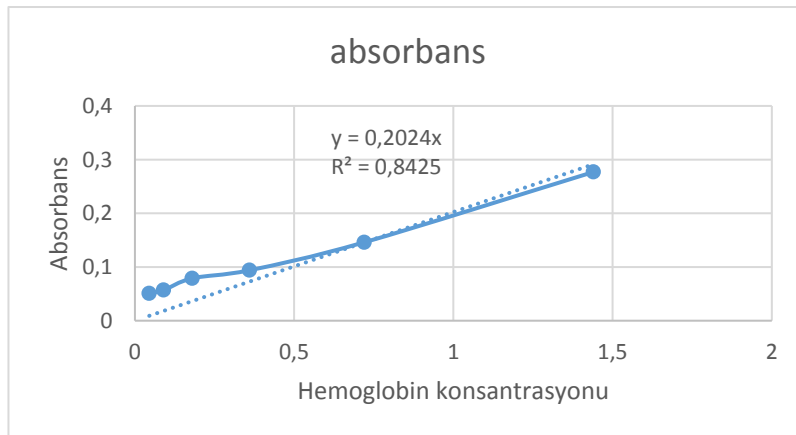
Şekil 4.43. Boş mikrokürelerin Ames testinde geri döner koloni sayıları

Mit-c		TA-97			TA-98			TA-100			TA-102			TA-1535		
s9(-)	Konsantrasyon	Geri Dönen Koloni Sayısı			Geri Dönen Koloni Sayısı			Geri Dönen Koloni Sayısı			Geri Dönen Koloni Sayısı			Geri Dönen Koloni Sayısı		
	5 mg/mL	254	243	227	51	43	77	131	266	126	437	360	298	18	30	27
	2.5 mg/mL	162	318	194	32	54	42	237	211	285	285	224	237	10	27	30
	1.25 mg/mL	282	186	202	53	78	46	162	138	266	451	456	474	8	32	22
	0.625 mg/mL	224	266	240	48	72	64	213	254	314	238	389	218	16	13	18
	0.3125 mg/mL	243	262	219	66	48	70	211	314	214	250	254	429	10	32	19
s9(+)	5 mg/mL	294	202	277	56	35	74	136	251	256	442	614	590	21	16	29
	2.5 mg/mL	320	261	267	61	54	54	259	253	142	454	405	386	27	32	30
	1.25 mg/mL	306	218	224	61	40	67	155	131	178	483	323	546	22	11	10
	0.625 mg/mL	197	168	224	48	77	42	195	219	200	434	618	590	24	29	22
	0.3125 mg/mL	270	170	282	34	77	58	317	160	133	381	370	576	21	11	32

Şekil 4.44. Mit-c uygulaması sonucunda Ames testinde geri döner koloni sayıları

4.17 Hazırlanan Mikrokürelerin Hemolitik Etkilerinin Belirlenmesi

Test için gereken hemoglobin konsantrasyonu standartta 10 ± 1 olarak belirtilmiştir, bu deneyde hemoglobin konsantrasyonu 10,02 olarak hesaplanmıştır. F değeri standart hemoglobinin seyreltilmesi ile belirlenmiştir.



Şekil 4.45. Kalibrasyon katsayısının belirlenmesi grafiği

Hemoglobinin standartından 1,44 mg/mL, 0,72 mg/mL, 0,36 mg/mL, 0,18 mg/mL, 0,09 mg/mL, 0,045 mg/mL oranlarında hazırlandı ve 540 nm de absorban ölçümü yapıldı. Yapılan hesaplama sonucunda F (kalibrasyon değeri) 0,202 olarak belirlenmiştir (şekil 4.45)

Elde edilen kalibrasyon değeri ile hemolitik etkinin son değerleri belirlenebilecektir. Testte F kalibrasyon değeri belirlenmemesi durumunda elde edilen sonuçlar değerlendirilememektedir.

Çizelge 4.15. Okunan absorban değerleri (MK: Kaempferol içermeyen mikroküre, KYMK: Kaempferol yüklenmiş mikroküre)

Sonuçlar (MK, KYMK)	
Absorbans MK	0,062
Absorbans KYMK	0,064
Absorbans blank	0,051
Absorbans (-) kontrol	0,055
Absorbans MK direk kontakt	0,065
Absorbans KYMK direk kontakt	0,067
Absorbans (+) kontrol	3,452

Okunan absorban değerleri 540 nm'deki değerleri göstermektedir. Bu değerler kalibrasyon kat sayısı ve süpernatant hemoglobin konsantrasyonu ile %hemoliz indeksini belirlemede kullanılacaktır. Blank olarak PBS kullanılmıştır.

Çizelge 4.16. Uygulama sonrası MK, KYMK'nın % hemoliz değerleri

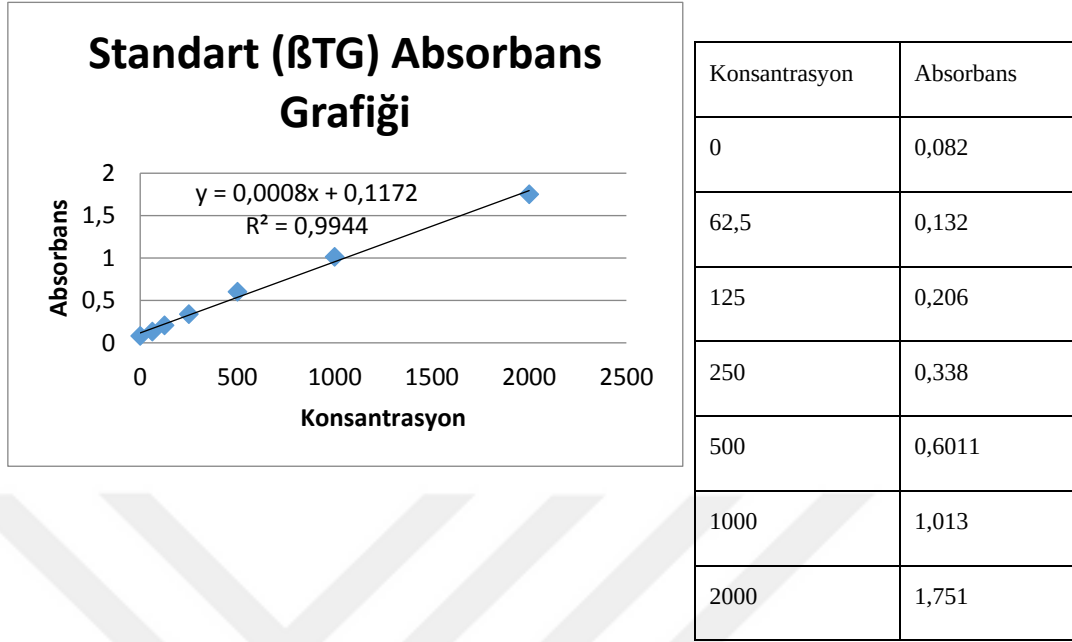
	Abs (540 nm)	SHC	% hemolys
Negatif Kontrol	0,055	0,02	0,201
MK ekstrakt	0,062	0,025	0,249
KYMK ekstrakt	0,064	0,0258	0,259
MK direk kontakt	0,065	0,0262	0,262
KYMK direk kontakt	0,067	0,027	0,270
Pozitif Kontrol	3,452	1,394	13,91

Deney Sonuçları, Çizelge 4.15'de belirtildiği gibi ölçülen hemolitik indeks düzeylerinde %5'den daha büyük değerinin bulunmaması nedeniyle hazırlanan mikrokürelerin kaempferol yüklenen ve yüklenmeyenlerinde hemolitik etkisinin olmadığını göstermiştir. Sentezlenen malzemelerin hem ekstraktları hem de kan ile direk etkileşimleri teste tabii tutulmuştur ve hemolitik bir etki her iki durumda da gözlemlenmemiştir. Bu malzemenin uygulanması hedeflenen bölge üretra iç epitel kısmıdır ve yara olan bölgedir, bu bölgelerdeki olası kanama durumlarında damar ile etkileşeceğinde hemolitik bir etki göstermeyecektir.

4.18 Kanda Pıhtılaşma Faktörleri Testi

Hazırlanan mikrokürelerin in vitro uygunluğunun ardından kaempferol yüklenmeyen ve yüklenen kürelerin kanda bulunan pıhtılaşma faktörlerine etkisi ELİSA kitleri ile tespit edilmiştir. Bu teste göre uygulama yapılmadan önce ölçülen değerlerin uygulama sonrasında artmaması durumunda kullanıma uygundur. βTG, FPA, PF4, TAT ve NE-Ela için yapılan ELİSA testi sonuçları detaylı olarak 4.18.1-4.18.5 maddelerinde verilmiştir.

4.18.1 BTG ELİSA Testi Sonuçları



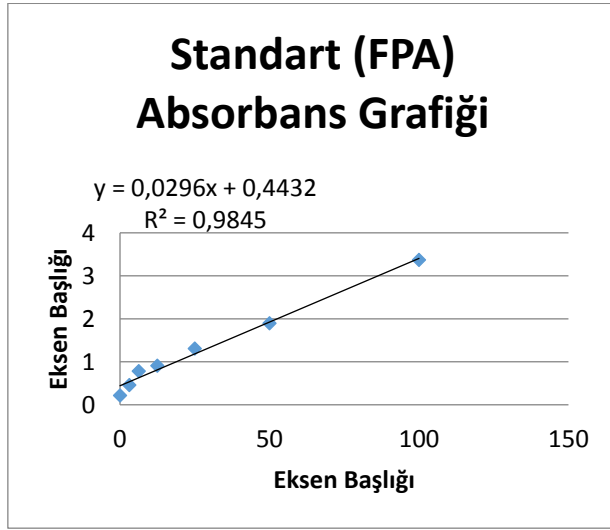
Şekil 4.46. BTG için referans standartın konsantrasyona bağlı absorbans grafiği

Grafikten elde edilen denklem kullanılarak yapılan hesaplama ile negatif kontrol (SF), uygulama öncesi kan serumundaki, kaempferol yüklenen ve yüklenmeyen mikrokürenin uygulama sonrası BTG miktarları belirlenmiştir. Uygulama öncesinde kan serumunda 26,68 olan miktar kaempferol yüklenmeyen kürelerde 2463,78 iken kaempferol yüklenen mikrokürelerde bu oran 2389,1'e düşmüştür. Çizelge 4.16'da değerler verilmiştir.

Çizelge 4.17. Uygulama sonrası BTG miktarları

Materyal	Miktar
Negatif Kontrol	2588,75
Uygulama Öncesi Serum	2618,6875
Kaempferol yüklenmeyen mikroküre	2463,7875
Kaempferol yüklenen mikroküre	2389,1

4.18.2 FPA ELİSA Testi Sonuçları



Konsantrasyon	Absorbans
0	0,215
3,12	0,4584
6,25	0,77986
12,5	0,9085
25	1,307
50	1,894
100	3,37

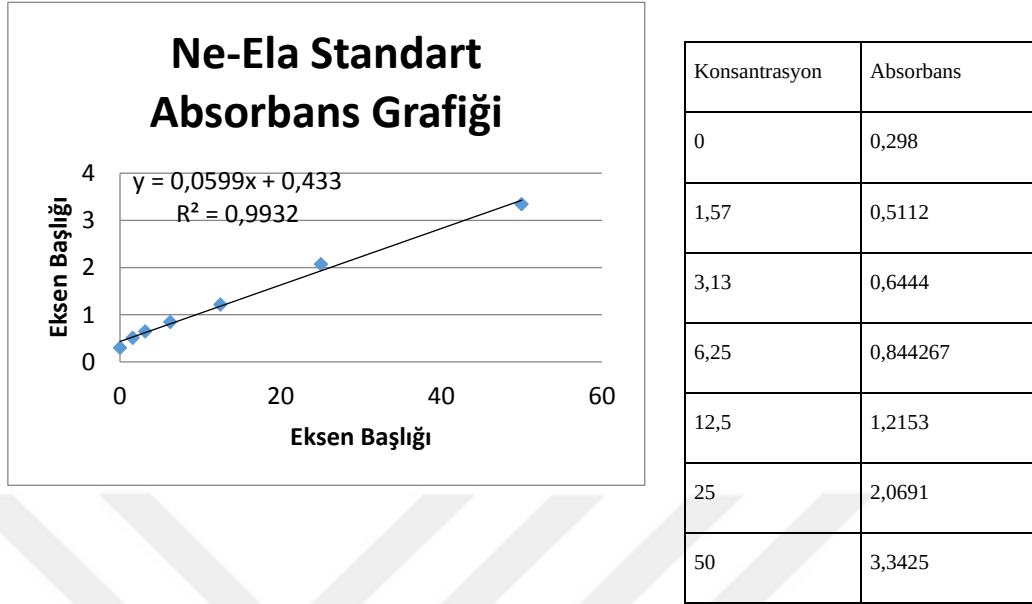
Şekil 4.47. FPA için referans standartın konsantrasyona bağlı absorbans grafiği

Grafikten elde edilen denklem kullanılarak yapılan hesaplama ile negatif kontrol (SF), uygulama öncesi kan serumundaki, kaempferol yüklenen ve yüklenmeyen mikrokürenin uygulama sonrası FPA miktarları belirlenmiştir. Uygulama öncesinde kan serumunda 83,40 olan miktar kaempferol yüklenmeyen kürelerde 62,50 iken kaempferol yüklenen mikrokürelerde bu oran 58,22'e düşmüştür. Çizelge 4.17'de değerler verilmiştir.

Çizelge 4.18. Uygulama sonrası FPA miktarları

Materyal	Miktar
Negatif Kontrol	66,69144144
Uygulama Öncesi Serum	83,40861486
Kaempferol Yüklenen Mikroküre	58,2240991
Kaempferol Yüklenmemiş Mikroküre	62,50247748

4.18.3 Ne-Ela ELİSA Testi Sonuçları



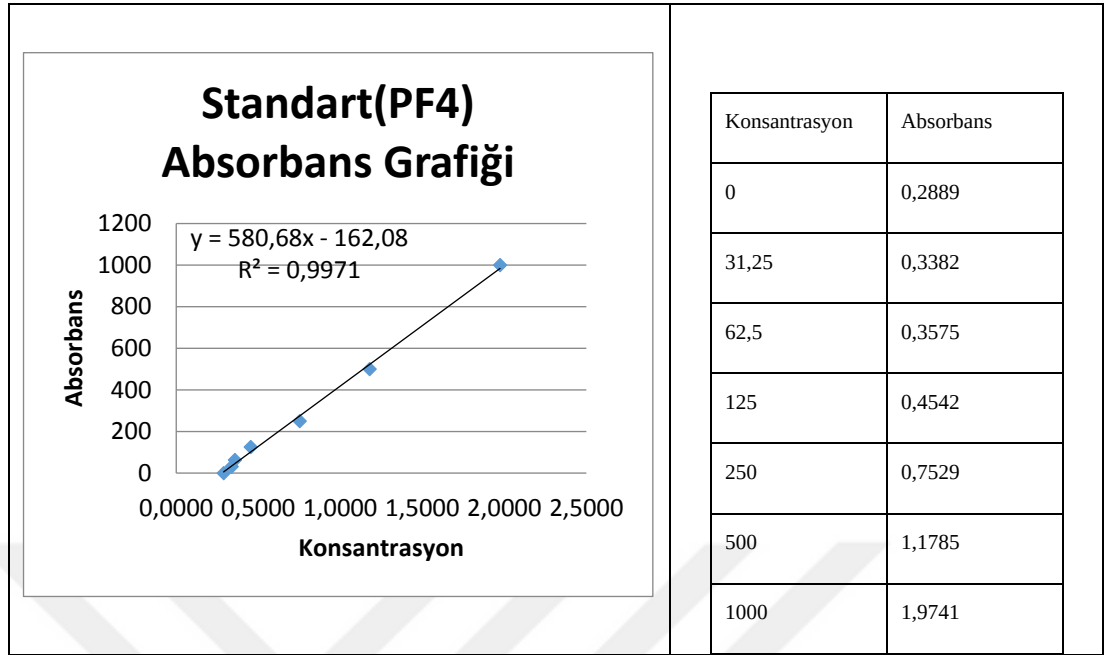
Şekil 4.48. NE-Ela için referans standartın konsantrasyona bağlı absorbans grafiği

Grafikten elde edilen denklem kullanılarak yapılan hesaplama ile negatif kontrol (SF), uygulama öncesi kan serumundaki, kaempferol yüklenen ve yüklenmeyen mikrokürenin uygulama sonrası NE-Ela miktarları belirlenmiştir. Uygulama öncesinde kan serumunda 17,85 olan miktar kaempferol yüklenmeyen kürelerde 14,35 iken kaempferol yüklenen mikrokürelerde bu oran 12,95'e düşmüştür. Çizelge 4.18' de değerler verilmiştir.

Çizelge 4.19. Uygulama sonrası Ne/Ela miktarları

Materyal	Miktar(ng/mL)
Negatif Kontrol	16,0351697
Uygulama Öncesi Serum	17,8464107
Kaempferol yüklenmemiş mikroküre	14,3578742
Kaempferol yüklenmiş mikroküre	12,9476906

4.18.4 Ne-Ela ELİSA Testi Sonuçları



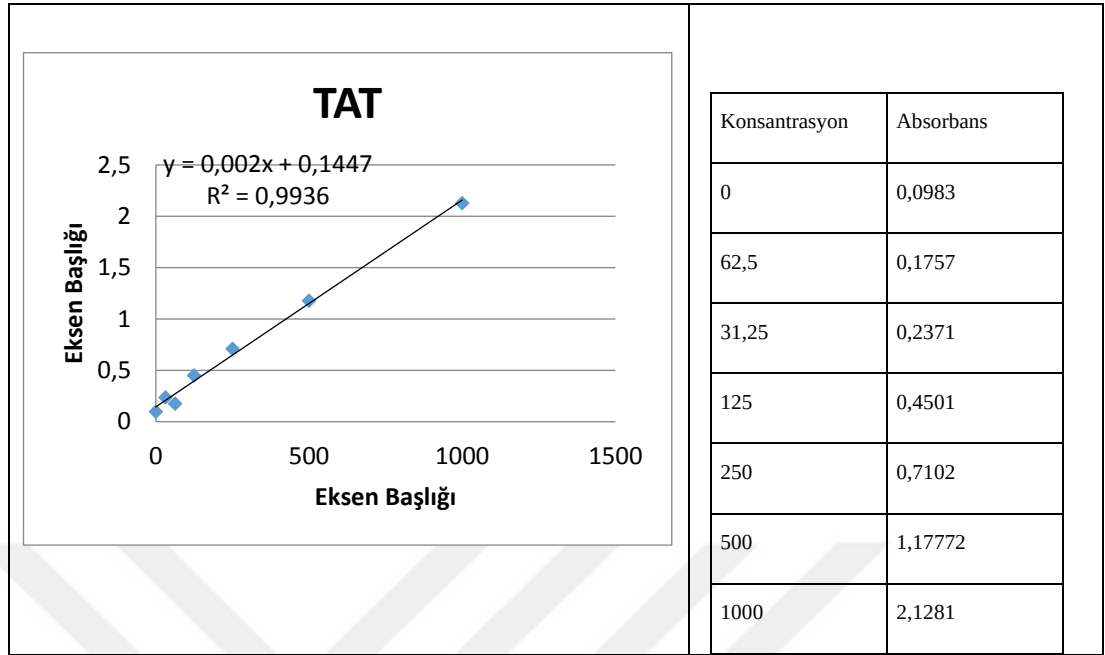
Şekil 4.49. PF-4 için referans standartın konsantrasyona bağlı absorbans grafiği

Grafikten elde edilen denklem kullanılarak yapılan hesaplama ile negatif kontrol (SF), uygulama öncesi kan serumundaki, kaempferol yüklenen ve yüklenmeyen mikrokürenin uygulama sonrası PF-4 miktarları belirlenmiştir. Uygulama öncesinde kan serumunda 0,2797 olan miktar kaempferol yüklenmeyen kürelerde 0,2795 iken kaempferol yüklenen mikrokürelerde bu oran 0,27954'e düşmüştür. Çizelge 4.19'da değerler verilmiştir.

Çizelge 4.20. Uygulama sonrası PF-4 miktarları

Materyal	Miktar
Negatif Kontrol	0,27959869
Uygulama Öncesi Serum	0,2797341
Kaempferol Yüklenmemiş Mikroküre	0,27957699
Kaempferol Yüklenen Mikroküre	0,27954375

4.18.5 TAT ELİSA Testi Sonuçları



Şekil 4.50. TAT için referans standartın konsantrasyona bağlı absorbans grafiği

Grafikten elde edilen denklem kullanılarak yapılan hesaplama ile negatif kontrol (SF), uygulama öncesi kan serumundaki, kaempferol yüklenen ve yüklenmeyen mikrokürenin uygulama sonrası TAT miktarları belirlenmiştir. Uygulama öncesinde kan serumunda 152,05 olan miktar kaempferol yüklenmeyen kürelerde 102,5 iken kaempferol yüklenen mikrokürelerde bu oran 104,48'dir. Çizelge 4.20'de değerler verilmiştir.

Çizelge 4.21. Uygulama sonrası TAT miktarları

Materyal	Miktar(ng/mL)
Negatif Kontrol	128,616667
Uygulama Öncesi Serum	152,05
Kaempferol Yüklenmemiş Mikroküre	102,5
Kaempferol Yüklenen Mikroküre	104,483333

TS EN ISO 10993-4 standartında bulunan pıhtılaşma faktörleri olan PF-4, Ne/Ela, TAT, FPA ve β TG miktarları ELİSA yöntemi ile belirlendi, kaempferol yüklenmemiş ve yüklenmiş kürelerin uygulamaları testlerin sonucunda pıhtılaşma faktörlerinde in vitro olarak bir artış gözlemlenmemiştir. Ayrıca Kaempferol yüklenen mikrokürelerin uygulandığı gruplarda ise negatif kontrole göre miktarda azalmaların olduğu tespit edildi.

4.19 Deney Hayvanları Uygulamaları

İn vitro deney sonuçlarında kaempferol içeren mikroküreler 5mg/mL konsantrasyonundaki kaempferol içeren, doğrudan uygulanacak olan kaempferol 5 mg/mL, ilaç yüklenmeyen küreler (%1 HA&%2 Alg) ve mit-c'nin 5 mg/mL konsantrasyonunda uygulanmıştır. Deney hayvanları çalışmaları KÜBTUAM (Bilimsel ve Teknolojik Araştırmalar Uygulama ve Araştırma Merkezi Müdürlüğü)'a bağlı Hüseyin Aytemiz Deneysel Hayvan Araştırma Laboratuvarı'nda gerçekleştirilmiştir (şekil 4.51).

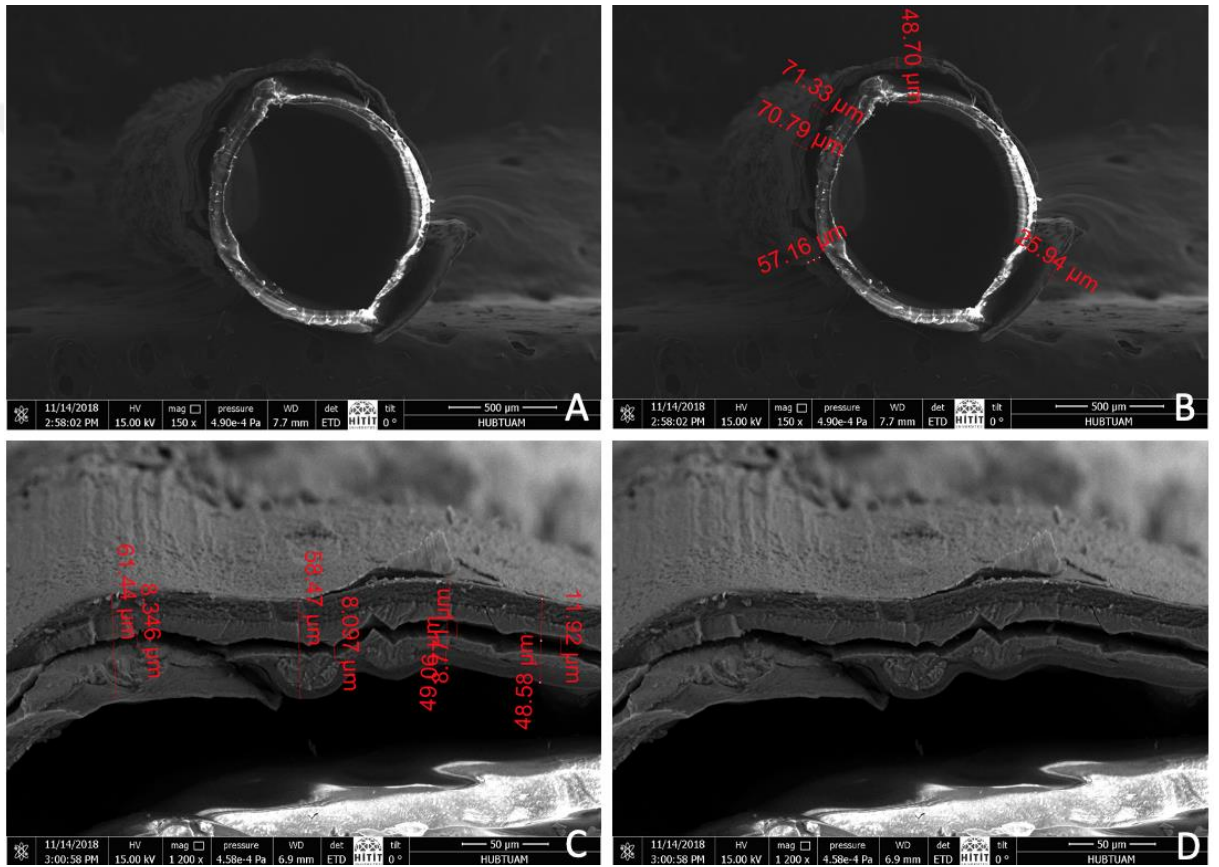


Şekil 4.51. Kullanılan ameliyathane

(A: işlemlerin yapıldığı ameliyathane, B: uygulamaların yapıldığı ameliyat masası temizlendikten ve steril örtü ile kaplanıp steril malzemeler hazırlandıktan sonra)

Çalışmada; ağırlıkları 220 ile 250 gram arasında değişen, her grupta 13 adet olacak

şekilde, toplam 65 adet Sprague Dawley cinsi erkek sıçan kullanıldı. Darlık modeli anestezi altında sıçanların üretrasına darbe uygulanarak skar oluşması sağlanmıştır. Skar oluşum kontrolü hayvanların uyanmalarını takiben ağırlı durumları, kesik idrar yapmaları zaman zaman kanlı idrar yapmalarının gözlemlenmesi ile tespit edilmiştir. 21 gün boyunca darlık modelinin yerleşmesi ve oluşması için bekletilmiştir. Darlık oluşumu tamamlandıktan sonra hayvan gruplarına sentezlenen kaempferol yüklenmiş mikroküreler, ilaç yüklenmemiş mikroküreler, Mitomycin-c ve kaempferol uygulanmıştır. Uygulama ince katater etrafına sentez materyalleri uygulanarak yapılmıştır(şekil 4.52).



Şekil 4.52. Katater etrafına uygulanmış numunelerin SEM görüntüsü

(A: kaempferol ile çevrelenmiş kaempferol, B: kaempferol ile çevrelenmiş kaempferolün katater etrafındaki kalınlığı, C: Kaempferol yüklenmiş mikrokürenin katater etrafındaki kalınlığı, D: Kaempferol yüklenmiş mikrokürenin katater etrafındaki kalınlığı)

Denekler rastgele beş gruba ayrıldılar:

Grup 1: Üretral darlık oluşturulmuş, mit-c uygulaması yapılan grup.

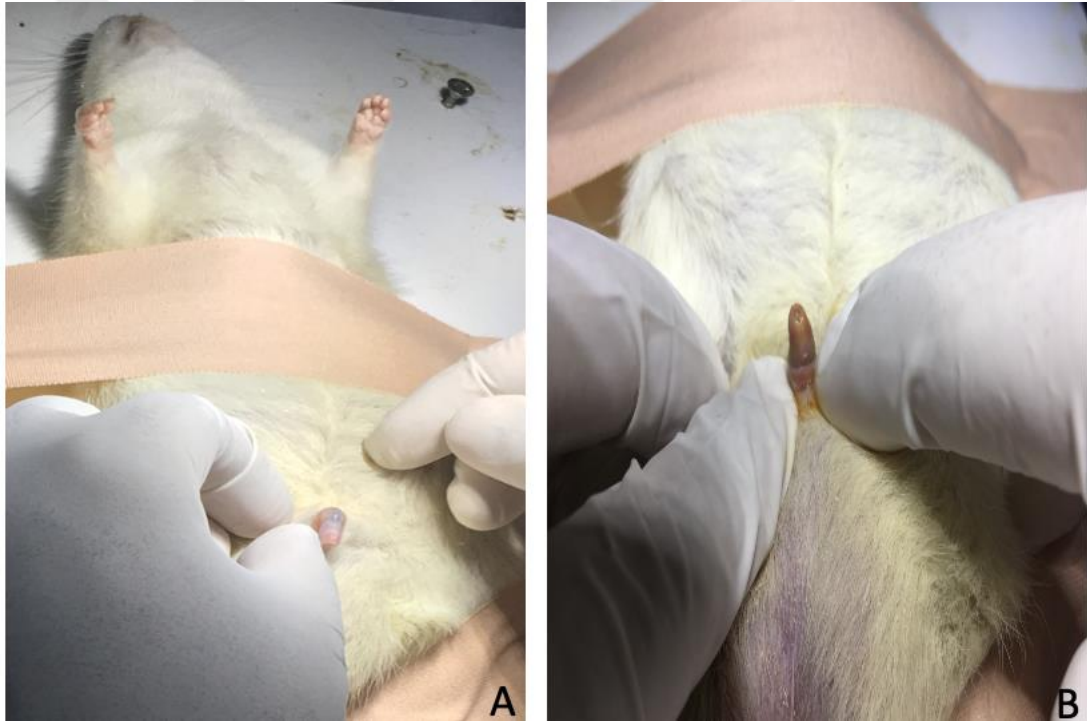
Grup 2: Üretral darlık oluşturulmuş, kaempferol uygulaması yapılan grup.

Grup 3: Üretral darlık oluşturulmuş, kaempferol yüklenmiş mikroküre uygulaması yapılan grup.

Grup 4: Üretral darlık oluşturulmuş, kaempferol yüklenmemiş mikroküre uygulaması yapılan grup.

Grup 5: Darlık oluşturulmayan kontrol grubu

Deneklere işlem uygulanmadan önce anestezi uygulanmıştır, anestezi için %2'lik ksilazin hidroklorür 8 mg/kg olacak şekilde (ROMPUN®; Bayer Healthcare, Leverkusen, Germany) ve ketamin hidroklorür (KETALAR®; Pfizer, USA) 100 mg/kg olacak şekilde intermuskuler olarak uygulandı. Sıçanlar supin pozisyonda uygulama masasına yatırıldı (Şekil 4.53).

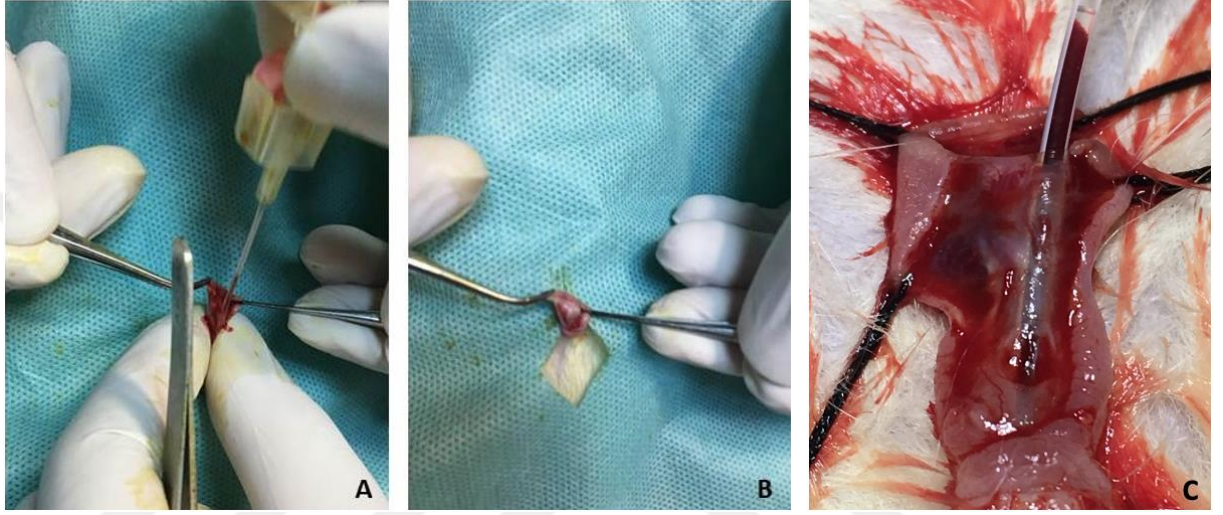


Şekil 4.53. Sıçanların ameliyat masasına yatırılması ve penisin çıkarılması

(A: Sıçanın supin pozisyonunda yatırılması, B: Penisin üretraya ulaşmak için çıkarılması)

Ameliyat sahası batikon kullanılarak uygulama öncesinde ve uygulama sırasında temizlendi, ameliyat masasına steril örtü serildi. Uygulama işlemleri fotoğraflandıktan sonra işlem yapılacak olan penisin etrafı steril örtü ile örtüldü. Kataterlere kaplanan sentezlenen malzemeler üretra kanalı içerisine yerleştirildi ve ardından penis dış derisi

sütür ile dikilerek temizlendi. Penis yerine yerleştirildi ve uygulamanın ardından hayvanların dikiş bölgelerine temas etmemesi ve deforme etmemesi için hayvanlar sürekli gözlemlendi ve ilk üç gün bir sprey yardımıyla (Pyedif Ng, veteriner deri antibakteriyeli, Ceva) temizlik işlemi yapıldı. Hayvan deneylerinde erkek sıçanlar kullanılmıştır. Hazırlanan deneklere darlık oluşumu için hasar işleminden sonra 14 gün süre beklenmiştir.



Şekil 4.54. Katatere kaplanmış malzemelerin sıçanlara uygulanması

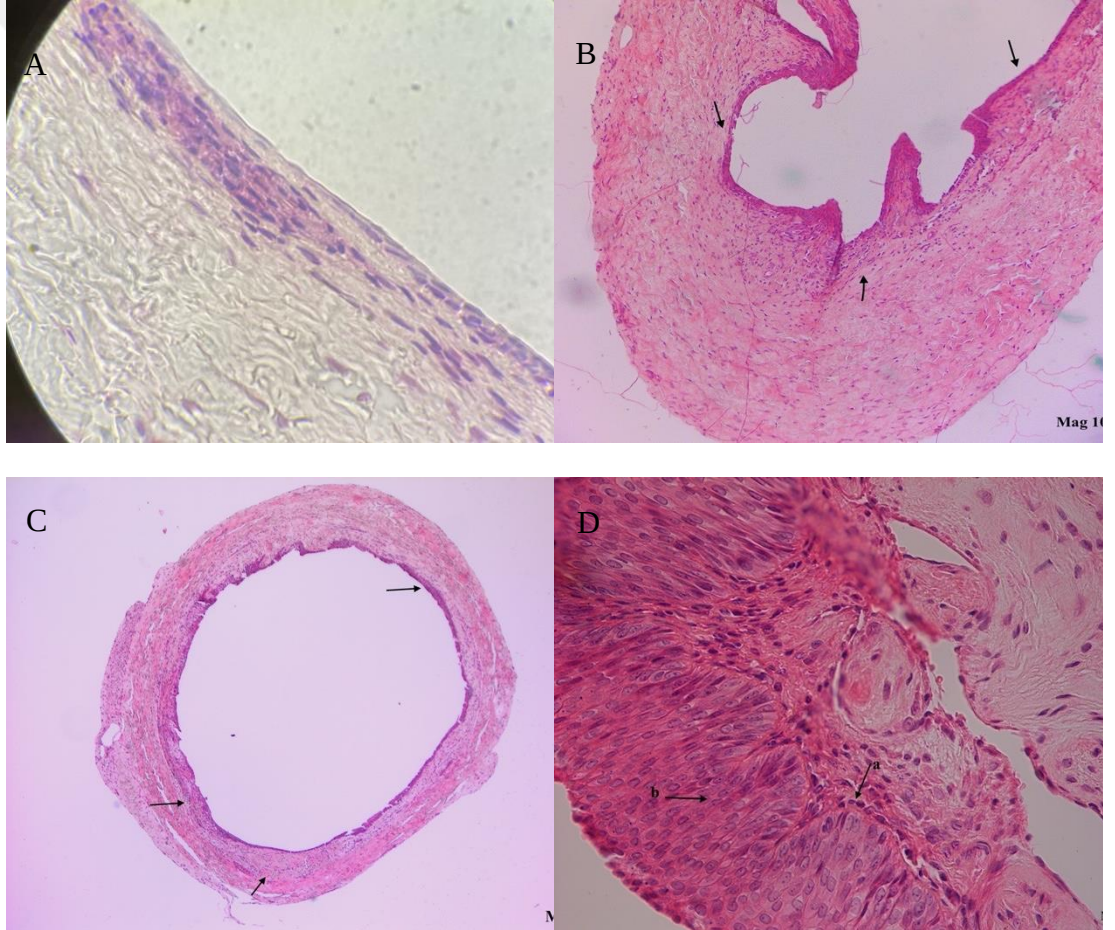
(A: Kataterin üretraya yerleştirilmesi, B: uygulama sonrası sıçan penisinin sturla kapatılması, C: Üretranın katater yerleştirilmiş detaylı fotoğrafı)

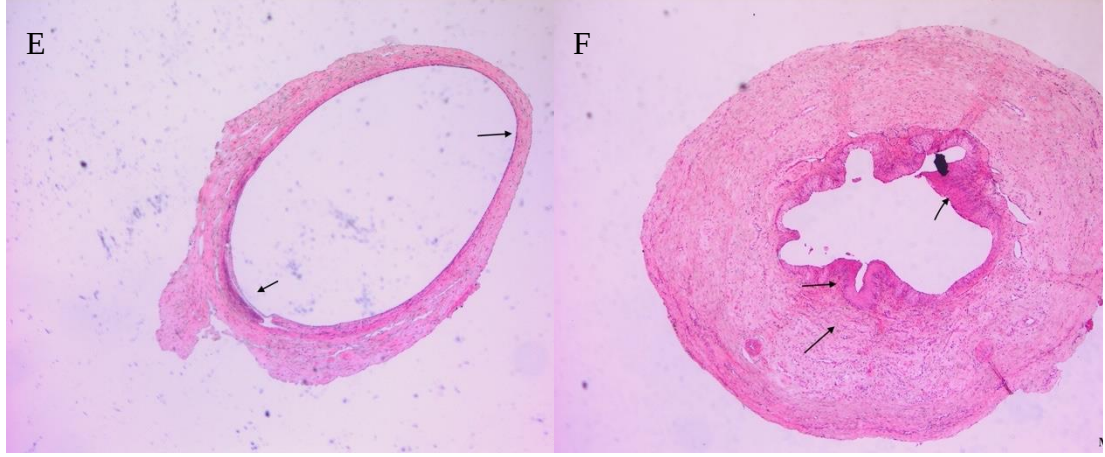
Deneklere hazırlanan kataterler uygulandıktan sonra 14 gün boyunca ilacın salınması ve tedavisi için bekletilmiştir. Operasyon sonrasında hayvanlarda herhangi bir enfeksiyon, ağrı ve anormal durumu olup olmadığı kontrol edilmiştir. 14 günün ardından denekler anestezi altındayken üretraları çıkarılmış ve formol içerisine alınmıştır. İşlem bitiminde denekler uyanmadan anestezi yapılmış ve sakrifiye edilmişlerdir.

Sakrifikasyon işleminin ardından dokular bölüm “Dokuların Tespit ve Takibi” bölümünde anlatılan basamaklardan geçirilmiştir. İlgili dokuların alınmasının ardından atıklar tıbbi atık olarak bertaraf edilmiştir.

4.20 Hematoksilen Eosin Boyama sonuçları

Sakrifiye edilen deneklerden alınan üretra epitel dokuları doku fiksasyonu ve takibinin ardından örnekler H&E ile boyanmıştır. Boyanan preparatlar doku morfolojisinin bozulması, fibrosis oluşumları, dokunun genel yapısı, kusurlu alanların tespiti ve onarım gerçekleşen ya da gerçekleşmeyen alanların tespiti açısından değerlendirilmiştir. Üretra epitel tabakası darlığın iyileşmesi ve tedavisinde ana unsurdur; uygulanan mit-c dokunun belirli noktalarında epitel tabaka göçükse de çok katmanlı bir yapıya sahip değildir. Ancak kaempferolün doğrudan uygulandığı ve mikroküreye yüklenerek uygulandığı üretra dokusunda epitelizasyonun arttığı, darlık bölgesinde iyileşme ve inflamasyon görülmüştür.





Şekil 4.55. Üretra dokularında yapılan HE boyaması görüntüleri

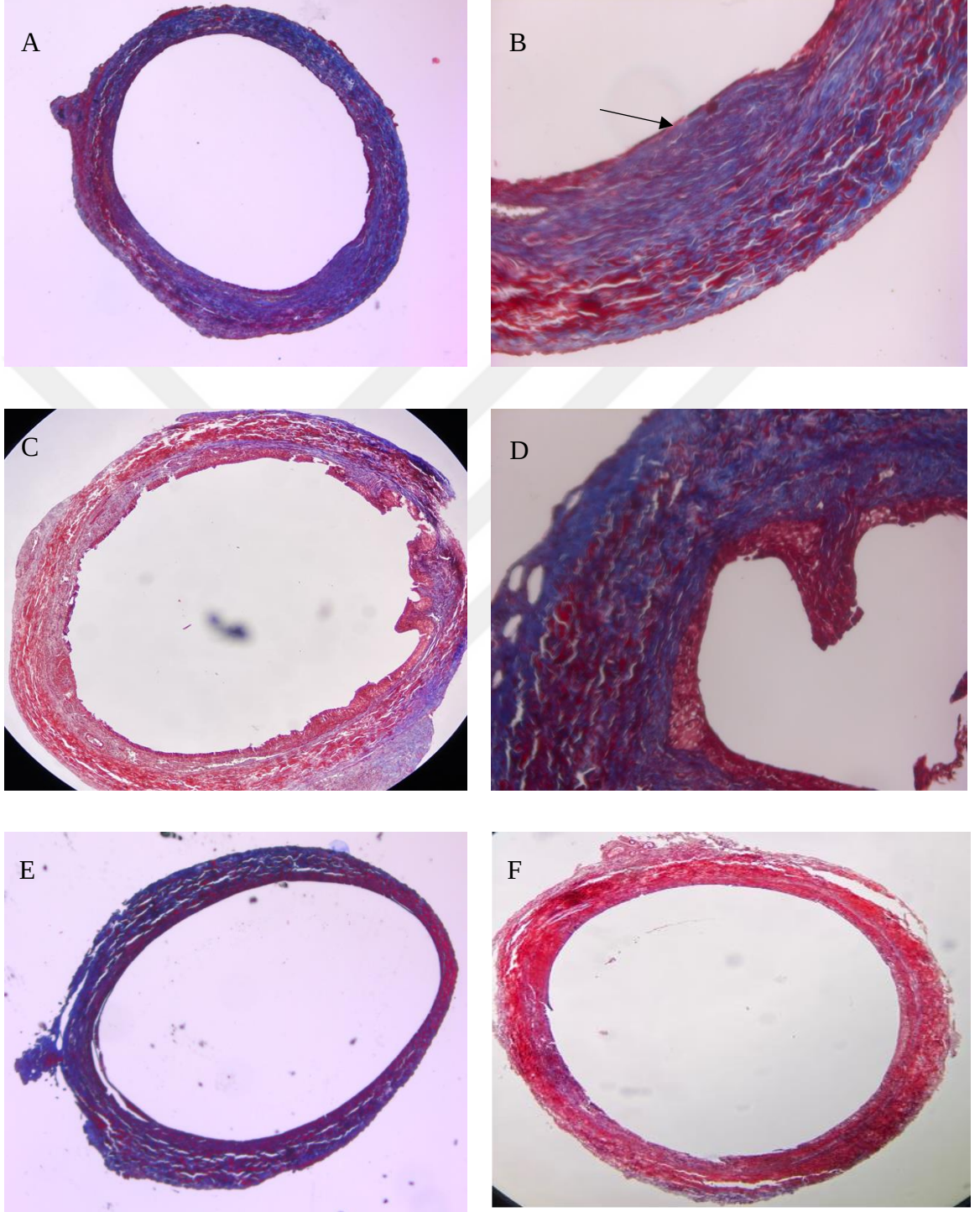
A: uygulama yapılmayan kontrol grubu üretra epitel hücrelerinin normal görüntüsü (20x büyütme), B: Kaempferol yüklenmemiş mikrokürelerin uygulandığı üretra dokusu (10x büyütme), C: Kaempferolün doğrudan uygulandığı üretra dokusu (5x büyütme), D: Kaempferolün doğrudan uygulandığı üretra dokusunda üretra epitelinin ve basal membranın 40x büyütmedeki görüntüsü, E: Mit-c uygulanan üretra epitel dokusunun görüntüsü, F: Kaempferol yüklenen mikrokürelerin uygulandığı üretra epitel dokusu. Görüntüler Leica DMI 3000B araştırma mikroskobunda çekilmiştir.

4.21 Masson Trikrom Boyama Sonuçları

Doku fiksasyonu ve takip işlemi yapılan preparatlar kolajen sentezinin ve seviyesinin tespitinde rutinde kullanılan bir yöntem olan masson trikrom boyama yöntemiyle değerlendirilmiştir.

Massan trikrom (MT) boyama sonuçlarına göre; fibrotik alan ve etrafında oluşan epitel tabaka, bazal membran ve dokunun genel yapısı incelendi. Bu boyama yöntemi ile birlikte kolajen içeren hücreler mavi, kas elyaf yapılar kırmızı ve çekirdekler siyah-mor renkte boyanmaktadır. Sıçanlardan alınan üretra dokularında yapılan MT boyamaları ile kolajen seviyeleri genel olarak tanımlanabilir ve iyileşme/tedavi durumu değerlendirilebilir. Mit-c uygulanan MT boyamalarında epitel tabaka ve bazal membran çevresi başta olmak üzere kolajen boyamalar gözlemlenmiştir. Kaempferol tek başına ve mikrokürelere yüklenerek uygulanan gruplarda ise kısmen kolajen boyamaları gözlemlenmektedir. Darlık oluşturulan kontrol gruplarında kolajen

miktarlarının fazla olduğu, uygulama yapılmayan kontrol grubunda ise kısmen kolajen boyanmaların olduğu tespit edildi.



Şekil 4.56. Masson Trikrom(MT) boyaması yapılan üretra dokuları

A: Darlık olan kontrol grubu 10X büyütmedeki MT boyama görüntüsü, B: Kontrol grubuna ait fibrotik alanının 20X büyütmedeki görüntüsü (ok işareti darlık bölgesini

göstermektedir) C: Kaempferolün doğrudan uygulandığı üretra dokusunda 10X büyütmedeki MT görüntüsü D: Kaempferol yüklenmeyen kürelerin uygulandığı üretra dokusunun MT boyamada 20X büyütme görüntüsü, E: Mit-c uygulanan üretra dokusunun 10X büyütmede MT görüntüsü, F: Kaempferol yüklenen mikrokürelerin uygulandığı üretra dokusunun 10X büyütmede MT boyaması görüntüsü. Görüntüler Leica DMI 3000B araştırma mikroskobunda çekilmiştir.

4.22 İmmünohistokimya Boyama Sonuçları

Hazırlanan preparatlar araştırma mikroskobunda (Leica DMI 3000B) incelenmiştir. Değerlendirme sonuçları preparatların kromojenik boyanma seviyelerine göre; 0 (negatif), 1 (hafif pozitif), 2 (orta pozitif) ve 3 (şiddetli pozitif) değerlendirilmiştir. Kolajen tip I, kolajen tip IV ve fibronektin antikollarının boyanma şiddetleri ve gruplar arasındaki farklar istatistiksel olarak da değerlendirilmiştir. Değerlendirme sonuçları çizelge 4.21’ de verilmiştir.

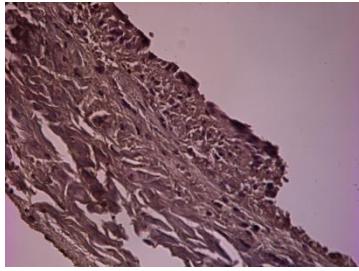
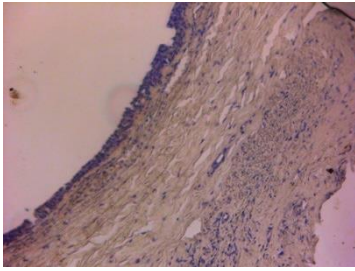
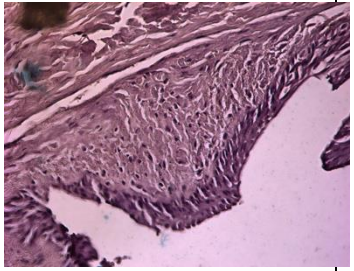
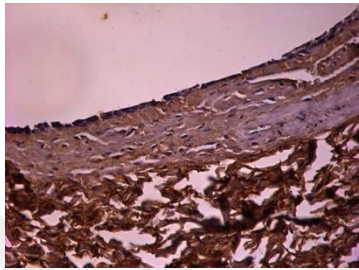
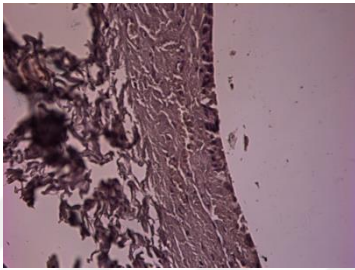
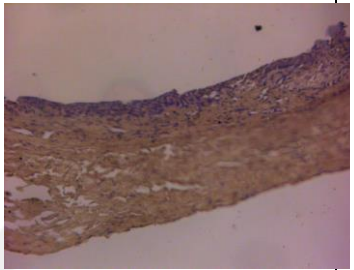
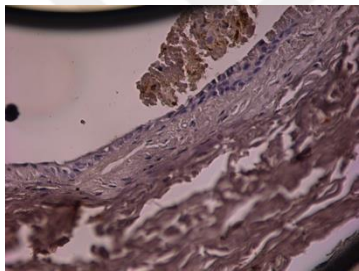
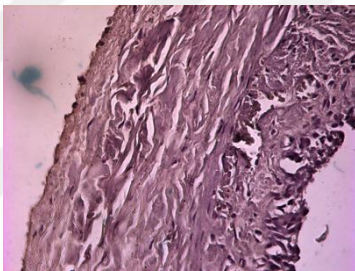
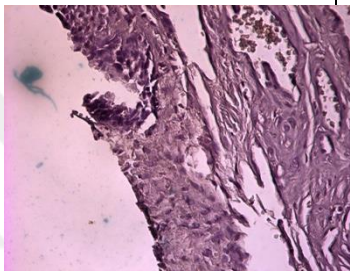
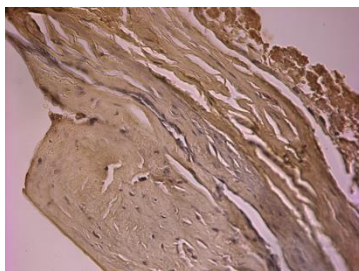
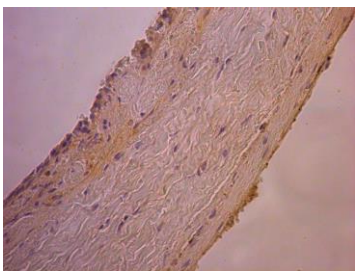
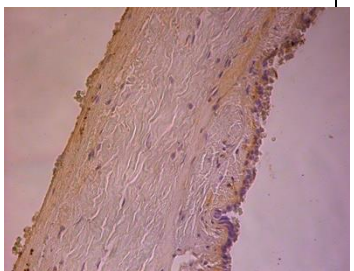
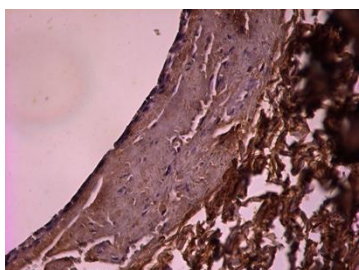
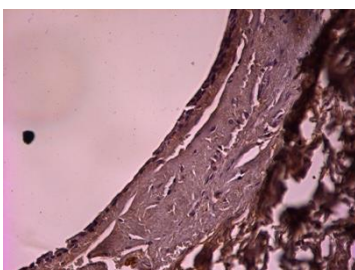
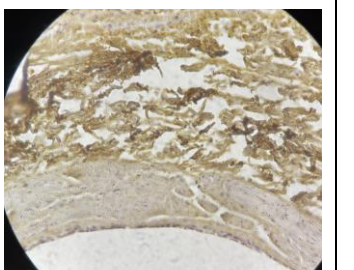
Değerlendirme sonuçları incelendiğinde darlık oluşturulan sıçanlar üzerinde kaempferolün ve kaempferol yüklü mikrokürelerin uygulandığı gruplarda Col-1 protein ekspresyonu darlık oluşturulan gruptan ve darlık oluşturulmayan kontrol grubundan daha düşüktür. Fakat mit-c uygulanan gruplarda col-1 ekspresyonu darlık oluşturulan gruptan düşük olsa da bu oran kaempferol ve kaempferol yüklü mikrokürenin oranı kadar yüksek değildir.

İmmünohistokimya testi ile fenotipik olarak bir proteinin ekspresyonu tespit edilmektedir. Üretral darlık durumunda artan Col-1’in kaempferol ve kaempferol yüklü mikroküre uygulaması sonrası düşmesi darlığın tedavi edildiğinin bir göstergesi olarak kabul edilebilmektedir. Ayrıca histolojik olarak immünohistokimya boyaması yapılan kesitler incelendiğinde darlık olan alanda yeniden yapılandırma çalışmalarının olduğu, epitel tabakanın üretranın normal histolojik görünümünde olduğu ve bazal membranın çizgi halinde düzgün morfolojide olduğu da gözlemlenmiştir. Şekil 4.57 de Col-1, Col-IV ve Fibronektine ait immünohistokimyasal boyama fotoğrafları verilmiştir. Görüntüler Leica DMI 3000B araştırma mikroskobunda, 10X büyütmede çekilmiştir.

Çizelge 4.22. İmmunohistokimya değerlendirme sonuçları

Denek	Antikor	KYMK	MK	Mit-c	Kaempferol	Kontrol	Darlık Kontrol
1	Col-1	0	1	1	0	1	2
	Col-IV	0	1	1	1	1	2
	Fibronectin	0	1	2	0	2	1
2	Col-1	1	1	1	0	1	1
	Col-IV	0	2	1	1	1	1
	Fibronectin	1	1	1	0	1	1
3	Col-1	0	1	0	0	1	2
	Col-IV	1	1	0	0	1	2
	Fibronectin	0	2	1	0	2	1
4	Col-1	0	1	1	0	2	2
	Col-IV	1	1	0	0	1	1
	Fibronectin	1	1	1	0	2	2
5	Col-1	0	1	1	1	2	1
	Col-IV	1	0	0	1	1	1
	Fibronectin	0	0	1	1	2	2
6	Col-1	0	1	1	1	1	1
	Col-IV	1	2	1	0	1	1
	Fibronectin	1	1	1	1	1	1
7	Col-1	0	2	1	0	1	2
	Col-IV	0	1	0	0	1	2
	Fibronectin	0	0	0	0	1	1
8	Col-1	1	1	0	0	1	2
	Col-IV	0	2	0	0	2	2
	Fibronectin	0	2	0	1	1	1
9	Col-1	0	1	0	0	2	2
	Col-IV	1	1	0	1	1	1
	Fibronectin	0	2	0	0	2	2
10	Col-1	0	1	1	1	1	2
	Col-IV	1	2	0	0	2	2
	Fibronectin	0	1	1	1	1	1
11	Col-1	0	1	0	0	2	2
	Col-IV	0	2	1	1	1	1
	Fibronectin	0	2	0	1	1	2
12	Col-1	1	1	1	0	1	1
	Col-IV	0	1	0	0	1	1
	Fibronectin	0	1	1	0	2	1
13	Col-1	0	2	0	0	2	2
	Col-IV	0	1	0	1	2	2
	Fibronectin	0	1	1	1	1	1

KYMK: Kaempferol yüklenen mikrokürelerin uygulandığı grup, MK: Kaempferol yüklenmeyen mikrokürelerin uygulandığı grup, Mit-c: Mitomycin-c

	Col Tip I	Col Tip IV	Fibronektin
Kaempferol			
Mit-c			
KYMK			
MK			
Darlık kontrol			

Şekil 4.57. İmmunohistokimya yöntemi ile boyanan Col-1, Col-IV ve Fibronektinin görüntüleri



5. TARTIŞMA VE SONUÇ

Üretral darlık klinikte tekrarı en sık karşılaşılan ve geniş yelpazede tedavi seçenekleri olduğu halde kesin bir iyileşmenin halen mümkün olmadığı, özellikle erkeklerde çok sık rastlanılan bir sağlık sorunudur. Gerek cerrahi gerek diğer tedavi yöntemleri operasyonun hemen ardından tedaviyi olumlu etkiliyor olarak gözüktse de en geç 5 yılda çoğunlukla 1-2 yıl içerisinde hastalığın tekrarı söz konusudur, tekrarı engellemek için yapılan işlemin ardından bir takım ilaç uygulamaları enjeksiyon yöntemleri geliştirilmeye çalışılsa da halen net bir tedavi mümkün olmamıştır. Uygulamaların ardından yapılan ilaç denemelerinde mitomycin-c başta olmak üzere, tadofil, daxotaksel tercih edilmekte ve bu maddelerin ayda ya da hafta da 1 uygulanması gerekmektedir. Hasta konforunu ve yaşam kalitesini kliniğe sık gitmek etkilediği gibi kesin çözüm de sağlamamaktadır.

Zhou ve ark. parazit enfeksiyonu ile birlikte karaciğerde ortaya çıkan şistozomiyaz (Schistosoma) hastalığı hepatik fibroz olarak da tanımlanan bu hastalık üzerinde kaempferolün iyileştirici etkisini ve mekanizmasını incelemişlerdir. Kolajen I yumurta kaynaklı karaciğer fibrozunun ana ürünlerinden biridir, kolajen I ekspresyonundaki artış fibrozun şiddetlendiğini gösterirken azalması fibrozun hafiflediğini göstermektedir. Zhou ve ark. yaptıkları çalışmada 20 mg/kg kaempferol dozajının kolajen sentezini inhibe ettiğini ve anti-fibroz etkisi olduğunu bildirmişlerdir. Ayrıca yaptıkları masson boyama sonuçlarında da fibrotik alanların kaempferol uygulaması ile azaldığını göstermişlerdir (264,265).

Karaciğer fibrozu da tıpkı üretral darlıkta olduğu gibi kolajen seviyesinde artış göstermektedir, Xu ve ark. yaptıkları çalışmada kaempferolü intraperitoneal enjeksiyon şeklinde karaciğer fibrozu oluşturdıkları farelere uygulamış ve karaciğer dokusunda nekroinflamatuvar skorları ve karaciğer fibrozunun tipik bir histopatolojik özelliği olduğu bilinen kolajen birikimini önemli ölçüde azaltabileceğini göstermişlerdir (266). Karaciğer dokusunun epitel hücrelerin çıkıntıları ile farklılaşarak meydana gelmesi ve üretra kanalının da epitel hücrelerden oluşması;

kaempferolün epitel hücelere zarar vermeden fibrozisi etkilediğini göstermektedir (267). Xu ve ekibi verilerden elde ettikleri sonuçlarla; kaempferolün, karaciğer fibrozu veya diğer fibroproliferatif hastalıkların tedavisi için yeni bir ajan olabileceğini göstermekte olduğunu savunmuşlardır.

İlerleyici interstisyel fibrozis obstrüktif nefropatilerin (üriner sistemin herhangi bir yerindeki idrar akımının engellenmesi nedeniyle oluşan böbrek parankim hasarını tanımlar) en önemli sonuçlarından biridir. Esas merkezi rolü anjiotensin-2 ile indüklenmiş olan TGF- β oynamaktadır. Anjiotensin converting enzim (ACE) inhibitörleri fibrozisi engellemekte, bu görevlerini anjiotensin-2 oluşumunu azaltmakla birlikte bradikinin düzeyini arttırarak yapmaktadır. Bradikinin ile uyarılan artmış iNOS aktivitesi ile fibrozis azaltılmaktadır (268, 269).

Darlık olan böbrekte fibroze neden olan interstisyel fibroblastların fibroblastların alfa düz kas aktin üretmesiyle myofibroblastlara dönüşmesi fibroze katkı sağlamaktadır (270). Böbrek tübül epitelinde ve böbrek interstisyum hücrelerinde bulunan TGF- β 1, myofibroblastlarda bulunan alfa düz kas aktin sentezini indüklemektedir (50, 271). Kronik darlıklar ve tıkanıklıklar TGF- β 1 sentezini arttırmakta, bu şekilde fibroze neden olmaktadır. Üreterdeki darlık nedeniyle böbrekte meydana gelen hidronefroze ve buna bağlı olarak mekanik gerilmeye uğrayan hücrelerde TGF- β 1 üretimi artmakta, buna cevap olarak endojen antioksidan enzim üretimi azalmaktadır. Bu şekilde oksidatif stresi artan böbrekte fibrozis gelişmesine katkı sağlamaktadır (272). Fibrozis ile sonuçlanmış farklı hastalıklarda moleküler düzeyde inceleme yapıldığında TGF- β 'nın rolü olduğu bildirilmiş ve kaempferol ile inhibe edildiği bildirilmiştir. Transforming growth faktör-beta (TGF- β) fibrojenetik bir faktör olarak bilinmesine rağmen aynı zamanda hidronefrotik böbrekte apoptozu uyarmakta önemli bir role sahiptir. Tübül epitelinde basınç artışıyla olan gerilme TGF- β ekspresyonunun artmasına dolayısıyla apoptozun uyarılmasına neden olmaktadır (275, 276). Anjiotensin-2 apoptotik etkisini TGF- β üretimini arttırarak göstermektedir (277). Apoptoz pro-apoptotik bir molekül olan Bax ve p53'ün artışı, anti-apoptotik bir molekül olan Bcl-2'nin azalması ile indüklenmektedir (278).

Shi ve ark. son yıllarda popüler olan ve yeni bir çalışma alanı olan eksozomları kullanarak üretral darlık tedavisi üzerine çalışmışlardır. Kurdukları sistemde kemik iliği mezenkimal kök hücrelerinden üretilen eksozomları darlık oluşturdıkları tavşan gruplarına uygulamışlar ve Col Type II, fibronektin ve elastin dahil olmak üzere üretral

dokularda fibrozis ile ilgili birkaç genin ekspresyonunun azaldığını göstermişlerdir (273). Fibrotik alanlarda Col Type I ve Col Type III'ün artışı söz konusudur, bu çalışma; üretral darlıkta vücudun kıkırdak bölümlerindeki kollajenin %80'inden fazlasını oluşturan Col Type II'nin de rolü olduğunu göstermektedir. Darlığın ilk oluşum aşamalarında fark edilmemesine Col Type II'nin verdiği elastikiyet olduğunu göstermektedir.

Feng ve arkadaşları, kaempferolün, miyokardiyal hücre alanının azalmasına ve interstisyel fibrozun apoptotik sinyal düzenleyici kinaz 1 (ASK1) / JNK1 / JNK2 / p38'in aktivitesini inhibe eden aortik bantlamaya bağlı kardiyak hipertrofiyi önemli ölçüde zayıflattığını belirtmiştir. Kaempferol ile tedavinin kardiyak hipertrofiye karşı koruduğunu ve kardiyoproteksiyonunun kısmen ASK1/MAPK sinyal yolunun inhibisyonu ve oksidatif stresin regülasyonu ile açıklanabileceğini göstermişlerdir (274).

Li ve arkadaşları (161), kaempferolün, fibro-proliferatif hastalıklar için umut verici bir tedavi olabileceğini göstermiştir. Hipertrofik skar (HPS) ve hatta karaciğer fibrozu, pulmoner fibroz ve miyokardiyal fibroz, TGF- β 1 / SMADs sinyal yolu ile yüksek oranda ilişkili olduğunu bildirmişler ve mekanik yüke bağlı bir fare modelinde HPS oluşumunu önemli ölçüde inhibe edebileceğini keşfetmiştir. Sonuçlar ayrıca kaempferolün, in vitro ve in vivo olarak fibroblastların kolajen sentezini, proliferasyonunu ve aktivasyonunu önemli ölçüde zayıflattığını da göstermiştir. Bu bulguların, kaempferolün HPS veya diğer fibroproliferatif bozuklukların tedavisi için umut verici bir ajan olarak geliştirilebileceğini göstermekte olduğunu savunmuşlardır (161).

Aspir (*Carthamus tinctorius* L.), Çin'de uzun bir kullanım geçmişine sahip geleneksel tıbbi ve yenilebilir bir bitkidir. Wang ve ark., yaptıkları çalışmada kaempferolü farklı formlarda kullanarak hepatoprotektif (karaciğer koruyucu etki) etkilerini araştırmak için farelerde karbon tetraklorür (CCl₄) tarafından indüklenen bir hepatotoksisite modeli kullanmışlar ve aspiirden izole edilmiş kaempferolü uyguladıkları sıçanlardan elde ettikleri veriler ışığında; oksidatif karaciğer hasarına karşı koruyucu etkilere sahip olduğunu bildirmişlerdir (279).

Yukarıda bahsedilen çalışmalara konu olan kaempferolün fibrotik alanlarda ve hücreler üzerindeki etkileri incelendiğinde bu bileşiğin üretral darlık hastalığında da kullanılabileceği düşünüldü. Bu amaçla kaempferolü hem doğrudan hem de kontrollü

salım yapan mikrokürelere yükleyerek uygulanması amaçlanmıştır. Kaempferolün etkinliği klinikte üretral darlık tedavisinde kullanılan mit-c'nin etkinliği ile in vitro ve in vivo ortamlarda test edilerek karşılaştırılmıştır.

Çalışmanın temel prensibinde mikroküre sentezi ve karakterizasyonu, primer kültür ile hücre eldesi, in vitro-in vivo testler ve histopatolojik incelemeler yer almaktadır. İlk adım mikroküre sentezi idi, sentez için seçilebilecek birçok yöntem giriş kısmında mikrokürelerin hazırlanması bölümünde detaylı olarak anlatılmıştır. Yapılan çalışmada sentezlenmesi kolay, dışarıdan herhangi organik ya da inorganik çözücü gerektirmeyen, faz ayrımı ve süspansiyon sıvıları kullanımı gerektirmeyen sadece uygun pH ve konsantrasyonun belirlenmesi gereken çapraz bağlayıcı yardımıyla mikroküre sentezini gerçekleştirildi.

Salımları 21 gün boyunca ortam bozunması ve değişikliği olmadan incelendi ve 10. günden sonra absorbansta farklılık gözlemlenmedi. Ayrıca salım işleminin sonlandırılması ile birlikte mikroküreler morfolojik açıdan değerlendirildi ve ilaç salımı yapmasının morfolojisinde herhangi bir değişikliğe sebep olmadığı gözlemlendi. FT-IR ile salımı yapılan mikroküreler test edildiğinde aljinat, hyalurnik asit ve CaCl_2 dışında bir bileşen saptanmadı. Kaempferolün göstermiş olduğu fenolik dayanıklılık absorbanları gözlemlenmedi.

Mikrokürelerde doğal polimer olarak biyouyumlulukları, biyobozunur özellikleri ve ilaç etken maddelerinin bağlanması kolaylığıyla; aljinat ve hyalurnik asit doğal polimerler arasında en çok tercih edilen polisakkaritlerdir. Hedefe yönelik tedavi, ilaç salım çalışmaları, hücre kültüründe taşıyıcı ve işaretleyici olarak geniş bir kullanım alanı olan mikroküreler yapılan tez çalışmasının da ana unsurlarından biri olmuştur.

Literatürde; aljinat bazlı mikrokürelerin kurutma işlemi sonucunda küçülen çaplarının 1mm olduğu bildiren çalışmalar yer almaktadır. Yapılan tez çalışmasında aljinat bazlı hyalurnik asit ilaveli çapraz bağlanmış mikrokürelerin çapını kurutma işlemi sonucunda $525 \pm 15 \mu\text{m}$ olarak tespit edildi. Bu da tedavisi düşünülen alan için uygulama kolaylığı, hedeflenebilecek bölge tercihlerinin arttırılabileceğini göstermekle birlikte uygulanan küre sentezinin uygun olduğunu göstermektedir. Hedeflenen mikroküre boyutlarına ulaşmak amacıyla boyutları farklı pipet uçları kullanılsa da ilk sentezlenen materyallerin boyutları hedeflenen aralıkta değildi, hedeflenen aralık $500 \mu\text{m}$ -1 mm aralığından yüksek olarak tespit edildi. Değiştirilen

yöntemle, mikroküre sentezi için ince uçlu enjektör (insülin iğnesi) tercih edildi ve mikroküreler istenilen boyutlarda elde edildi ($525 \pm 15 \mu\text{m}$). Ayrıca sentez sonrasında önemli adımlardan bir tanesi de hazırlanan mukoadeziv yapıdaki mikrokürelerin kurutulması işlemidir. Geriye dönük çalışmalar incelendiğinde aljinat bazlı mikrokürelerde kurutma işlemi için birçok metot denemiş; fırında kurutma, dondurarak kurutma ya da vakumda kurutma gibi her biri için dayanıklılık, gözenek çapı ve malzeme bütünlüğünün korunması incelendiğinde çalışmada optimize edilen en ideal kurutmanın oda sıcaklığında 72 saat sürmesi sonucuna varılmıştır. Bu şekilde sentezlenen kürenin uygulanacağı bölgeye yapışması ve gözenekten uygulanan ilacı diffüze etmesi kolaylaşacaktır (281,282).

Hazırlanan mikrokürelerin morfolojik ve kimyasal karakterizasyonu için kullanılan FT-IR, SEM ve TGA analizleri literatürle karşılaştırıldığı zaman benzerlik göstermektedir. SEM cihazı ile hazırlanan ve kurutulan mikrokürelerin boyutları, homojenite gösterip göstermediği ve por yapıları değerlendirildi. Bu değerlendirmelere göre; kaempferol yüklenen ve yüklenmeyen mikrokürelerin yapısının homojen olduğu, yapının farklı alanlarından alınan SEM görüntüleri ile doğrulandı. İlaç yüklenmeyen sadece aljinat ve hyalurnik asit içeren mikrokürelerin (MK) gözenek yapıları kaempferol içeren mikrokürelerin (KYMK) yapıları ile karşılaştırıldığında belirgin bir fark olmadığı, yapılarda dokuya tutunmasının kolaylaşacağı alanların bulunduğu gözlemlendi.

FT-IR ile, yapıdaki bağların durumu ve bağlanma yerlerini tespit edebilmek ve kütüphanesinde bulunan verilerle karşılaştırılarak kullanılan materyallerin karşılaştırılması yapılabilmektedir. Bu yöntem kısa sürede sonuç veren, ön hazırlık gerektirmeyen ve malzeme karakterizasyonun da sık kullanılan TS EN ISO 10993 tarafından da onaylanmış bir yöntemdir. Hazırlanan mikrokürelerin içeriğinde bulunan aljinat, hyalurnik asit ve kaempferol ticari olarak satın alındığından bu malzemelerin doğruluğu tespit edildi. Ayrıca kaempferol yüklemesi yapılan mikrokürelerde kaempferolün olup olmadığı yine bu yöntem ile gösterildi. Yapılan FT-IR analizi ile MK içerisinde kullanılan aljinat ve HA'nın dışında çapraz bağlayıcı olan CaCl_2 tespit edildi. Literatür verileri incelendiğinde saf kaempferol spektrumu; ~ 3427 - $\sim 3317 \text{ cm}^{-1}$ (fenolik OH stretching), ~ 2954 - $\sim 2850 \text{ cm}^{-1}$ (CH stretching) ve $\sim 1613 \text{ cm}^{-1}$ 'de (C=O stretching)'de karakteristik absorpsiyon zirveleri sergiler. Hazırlanan KYMK'ların spektrumu $\sim 3427 \text{ cm}^{-1}$, 3368 cm^{-1} ve 3317 cm^{-1} (fenolik OH stretching), ~ 2954 - ~ 2850

cm⁻¹ ve 2947 cm⁻¹ (CH stretching) zirveleri göstererek kaempferolün karakteristik absorbans zirveleri ile örtüştüğü tespit edildi. Bu sonuçlar mikrokürelerde kaempferolün bulunduğunu ve kullanılan kaempferolün fenolik bileşik özelliğini kaybetmediğini göstermektedir (283,284).

Kimyasal karakterizasyon testleri TGA (Termogravimetrik Analiz) ile kütle kayıplarına bakılarak; kaempferol içermeyen hyalurnik asit-aljinattan hazırlanan boş mikroküreler, kaempferol içeren mikroküreler ve yalnızca kaempferol kullanılarak incelenmiştir. Her bileşiğin farklı yarılanma ömrü, farklı dalga boyu, farklı elektron alma kapasitesi, farklı camsı geçişi ve farklı kütle kayıpları bulunmaktadır. Bileşiklerin ve elementlerin göstermiş olduğu bu farklılıklar ile malzemelerin aralarındaki fark ve benzerlikler kolayca tespit edilebilmektedir.

Hazırlanan polimerik mikrokürelerin arasındaki çapraz bağlanma ve etkileşim, polimer kompozitin termal stabilitesinde TGA ile gösterilebilen değişikliklere neden olabilir. Literatürde HA'nın 210°C'den sonra bozunmaya başladığı bildirilmiştir (281,282). 270°C-500°C arasında gerçekleşen kütle kaybı aljinat olarak değerlendirildi, literatürde aljinatın bozunma sıcaklığına tekabül etmektedir. Ancak polimerlerin bağlanması ve dayanıklılığı ile malzemenin tam kaybı tıpkı HA gibi söz konusu olmadı (285,286).

Mikrokürelerin dayanıklı olması uygulanan hyalurnik asitin bozunmasını zorlaştıracak ve neden olduğu kolajen sentezini indükleyemeyecektir. Bozunmasının 200 derece ve üzerinde gerçekleştiği göz önünde bulundığında vücut sıcaklığında çapraz bağlanan HA'nın bozunması engellenmiş olacaktır. Kaempferolün camsı geçiş noktası değerlendirildiğinde literatür ile benzerlik gözlemlendi. HA ve aljinat bozunma ıslısından önce kaempferolün bozunması ortamdan uzaklaşabildiğini göstermektedir. Böylece kullanıldığı bölgede mikroküreden kaempferolün salımı gerçekleşebilecektir. Üretral darlık tedavisinde doğrudan kullanımı için hazırlanan mikrokürelerin termal analiz sonuçlarına göre uygun olduğu gösterildi.

Çalışmada kullanılan mit-c ve kaempferolün HPLC ile saflıkları değerlendirildiğinde; her iki malzemenin de saflığı seçilen kolon değerinde doğrulandı ve kullanımlarına engel bir durumun olmadığı gösterildi.

İn vitro da ilk basamak olan primer hücre kültürü sentezini takip eden aşama in vitro sitotoksitesite testleri ile kaempferol konsantrasyonunun belirlenmesi ile devam etti. Bu

sebeple literatürde kullanılan kaempferol konsantrasyonları araştırıldı. Yapılan çalışmalarda kaempferol için net olarak belirlenen bir konsantrasyonun olmadığı, çalışmalar ve kullanım miktarları arasında birçok farklılık olduğu tespit edildi. Bu sebeple çok düşük konsantrasyonlardan başlayarak (0.2-0.0125 mg/mL kaempferol) yüksek dozlara kadar (10 mg/mL kaempferol) sitotoksikite testleri yapıldı. Düşük konsantrasyonlarda üretra epitel hücreleri ve L929 hücreleri üzerinde belirgin bir değişikliğe sebep olmadığı gözlemlendi. Bu sebeple yüksek konsantrasyonlarda çalışmalar yapılarak sıçanlara yapılacak uygulama da ilaç konsantrasyonunun 5 mg/mL olmasına karar verildi. Sitotoksikite test yöntemi olarak MTT, WST-1 ve x-CeLLigence çalışmaları yapıldı.

Klinikte üretral darlık tedavisinde sıkça tercih edilen mit-c'nin gösterdiği toksik etki üretral darlığı geçici olarak tedavi etse de hastanın doku yapısında bozulmaya ya da farklı rahatsızlıkların ortaya çıkmasına sebebiyet verebilir. Literatür verileri incelendiğinde tez çalışmasına konu olan kaempferolün uygulanan konsantrasyonlarda hücreler üzerinde toksik bir etkisinin olmazken kanser ilaçlarıyla birlikte toksik etki gösterdiği görülmektedir (287). Ayrıca, kaempferolün, terapötik etkinliklerinden ödün vermeden geleneksel ilaçların kullanımıyla ilişkili toksisiteyi azaltabileceği yönünde görüşler de mevcuttur (288). Mit-c'nin üretra epitelinde toksik etki göstermesi üretra tedavisi açısından istenmeyen bir durumdur çünkü tedavinin amacında darlık olan bölgedeki fibroblast tabakasının ve hücrelerinin ortamdan uzaklaştırılması istenirken üretra epitelinin yapısının düzelmesi ve darlık alanında üretra epitel hücrelerinin yerini yeniden alması vardır. Mit-c uygulanması sonucunda üretra hücreleri darlık alanı dışında da üretra epitellerine zarar verecek ve yapının onarılmasına engel olabilecektir. Bu da tekrarlayan üretra darlıklarına sebep olacak ve hastanın sık sık kliniğe gitmesi ve hayat kalitesinin azalmasına sebep olacaktır.

Literatür verileri incelendiğinde kaempferolün üretra epitel hücrelerinde etkisini araştıran herhangi bir çalışmaya rastlanamamıştır. Elde edilen üretra epitel hücrelerindeki MTT sonuçlarının karşılaştırılabileceği bir çalışma bulunmaması, yapılan bu tez çalışmasının literatürde bir ilk olduğunu göstermektedir. Üretra epitelinde elde edilen MTT sonuçlarının doğruluğunun karşılaştırılması için farklı epitel hücrelerinde çalışılmış kaempferol verileri incelenmiş ve yapılan bir çalışmada epitel hücre tipindeki insan bağırsak hücresi olan Caco-2 hücrelerinde kaempferolün toksik etki göstermediği, hücre iskeletinin bütünlüğünü sağlayan proteinlerin

ekspresyonlarını arttırdığı ve bağırsak bütünlüğünün korunmasına yardımcı olduğu bildirilmiştir (289). Yapılan bu tez çalışmasında da üretra epitel hücrelerinde kaempferolün yüksek konsantrasyonları da dahil olmak üzere toksik bir etkisinin olmadığı MTT testi ile gösterildi.

L929 fibroblast hücreleri üretral darlıkta artmakta ve darlık bölgesinin oluşmasında rol oynayan hücrelerdir. Bu sebeple uygulanan malzemelerin fibroblast hücrelerinin üzerinde canlılığı negatif yönde etkilemesi beklenmektedir. Elde edilen veriler incelendiğinde; mit-c 5 mg/mL konsantrasyonunda dahi L929 hücreleri üzerinde canlılığı negatif yönde etkilemezken aynı konsantrasyonda uygulanan kaempferol %62 oranında canlılığı negatif yönde etkilemiştir. Üretra epitel hücrelerinde ise bu konsantrasyonda %89 canlılık göstererek üretral darlık tedavisi için doku yapısına mit-c den daha uygun sonuçlar göstermektedir. Kaempferolün doğrudan uygulanması ve mikroküre içerisinde uygulanması arasında MTT testi ile %10'luk bir fark gözlemlendi, in vitro veriler ışığında kaempferolün doğrudan uygulanması mikroküreye yüklenerek uygulanmasından daha etkin gözükse de mikrokürelerin kontrollü salım yapacak olması, hastada sürekli klinik ziyareti gerektirmemesi açısından uygulama kolaylığı sağlayacaktır.

L929 hücrelerinde yapılan WST-1 sitotoksosite sonuçlarına göre hücre canlılıkları mit-c için uygulanan her konsantrasyonda MTT'ye göre yaklaşık %10'luk bir artış gösterirken kaempferol, KYMK ve MK için anlamlı bir fark görülmemiştir.

L929 fibroblast hücrelerine uygulanan her iki yöntemde de (MTT, WST-1) uygulama yapılan konsantrasyonlarda kaempferol ve kaempferol yüklü mikrokürelerin hücrelere toksik etki gösterdiği, mit-c'nin ise toksik sayılabilecek etkisinin olmadığı gözlemlendi. Bu sonuçlar mit-c'nin klinikte üretral darlığın tedavisinde daha yüksek konsantrasyonlarda uygulandığı verileriyle paralel olduğunu göstermektedir. Fibroblast hücrelerinin proliferasyonlarını engellemek ve/veya düşürmek için arttırılacak olan mit-c konsantrasyonunun üretra epitel hücrelerinde de toksik etki göstereceği ve doğal yapının bozulmasına fırsat verebileceği öngörülmektedir.

Yapılan Xcelligence testi ile mit-c'nin konsantrasyonun azalmasına bağlı olarak hücre proliferasyonun arttığı, kaempferolün ise yüksek konsantrasyonlarda dahi (5 mg/mL) hücre proliferasyonun fazla olduğu tespit edilmiştir. Kaempferol konsantrasyonuna bağlı olarak hücre proliferasyonu azalsa da kontrol grubu hücre proliferasyonu ile arasında anlamlı bir fark tespit edilmemiştir. Yapılan sitotoksosite testleri ile paralel

sonuç gösteren hücre proliferasyon testleri ile in vivo da kullanılacak olan ilaç konsantrasyonları belirlenmiştir.

Yapılan hücre proliferasyon ve canlılık testleri sonucunda ölen hücrelerin hangi yolla öldüğünü saptamak için yapılan ikili boyama yöntemi ile apoptotik ya da nekrotik ölümü hakkında bilgi sahibi olunmuştur. Bu sonuçlara göre üretra epitel hücrelerinde yapılan ikili boyamada; mit-c uygulanan hücrelerde nekrotik ölüm apoptotik ölümden daha fazla gözlemlenirken, uygulanan konsantrasyona (5 mg/mL, 2.5 mg/mL, 1.25 mg/mL ve 0.625 mg/mL) bağlı olarak artmaktadır. Uygulanan en yüksek konsantrasyonda (5 mg/mL) %apoptoz oranı (hoescht boyanan) %18 iken %nekroz (pi boyanan) oranı %34 olarak gözlemlendi, uygulanan en düşük konsantrasyon olan 0.625 mg/mL'de ise apoptoz oranı %3'e düşerken nekrotik ölüm oranı da %5'e düşmüştür. Sitotoksikite verileri ile ilişkilendirildiğinde; üretra epitel hücreleri üzerinde toksik etki gösteren mit-c'nin nekrotik ölüm oranının daha fazla olması sebebiyle üretrada kullanımının uygun olmadığı düşünülmektedir. Kaempferol uygulanan hücrelere yapılan ikili boyama sonuçlarına göre; 5 mg/mL kaempferolde nekroz oranı %0,1 iken 0.625 mg/mL'de 0 olarak gözlemlenmiş, apoptoz oranları ise 5 mg/mL konsantrasyon için %4.2 iken 0.625 mg/mL konsantrasyonunda 0 olarak belirlendi. Kaempferol yüklenen mikrokürelerin uygulandığı üretra epitel hücrelerinde uygulanan konsantrasyonlarda nekrotik ölüm gözlemlenmezken apoptotik ölüm 5.6 mg/mL kaempferol içeren mikroküreler için %2 olarak gözlemlendi. Kaempferol yüklenmeyen mikrokürelerin tüm konsantrasyonlarında ise apoptotik ya da nekrotik herhangi bir ölüme rastlanmadı. Üretra epitel hücrelerinde yapılan ikili boyama sonuçları MTT ve WST-1 sitotoksikite sonuçları ile benzerlik göstermekte olup kaempferolün apoptotik hücre ölümünü indüklediği düşünülmektedir. Literatürde kaempferolün apoptozu farklı yollardan indüklediğine dair birçok çalışma yer almaktadır. Elde edilen veriler literatür ile benzerlik göstermekte olup genel apoptoz hakkında bilgi vermektedir.

L929 fibroblast hücrelerine uygulanan kaempferol, mit-c ve kaempferol yüklenen ve yüklenmemiş mikroküreler için yapılan ikili boyama sonuçlarına göre; 5 mg/mL uygulanan mit-c'de %8.2 nekroz ve %3 apoptoz gözlemlendi, aynı konsantrasyonda uygulanan kaempferolde ise %35,7 apoptoz, %2.1 nekroz gözlemlendi. Azalan konsantrasyona bağlı olarak kaempferol uygulanan hücrelerin apoptotik indeksinde azalma gözlemlendi. 5.6 mg kaempferol içeren mikrokürelerde ise %34.5 apoptoz

gözlemlenirken %1.2 nekroz gözlemlendi. L929 hücrelerinde uygulanan ikili boyama sonuçlarına ve sitotoksikite sonuçlarına göre; kaempferolün hücrede yol açtığı toksik etkinin apoptotik yollar ile olduğu, hücrenin programlı bir şekilde öldüğünü göstermektedir. Üretral darlık bölgesinde inhibe edilmek istenilen fibroblast hücrelerinin kaempferol ile hücre yapısına uygun olarak gerçekleşebileceği öngörülmektedir.

Klinikte uygulanan mit-c'nin kalıcı bir çözüm sunamaması ve in vitro toksik etkilerinin yüksek olması nedeniyle üretra tedavisinde kullanılmamasının hasta sağlığı açısından uygun olmadığı düşünülmektedir.

Hazırlanan KYMK ve kaempferolün genotoksik etkisini belirlemek amacıyla in vitro mikronükleus ve AMES testleri gerçekleştirildi. Mikronükleus (MN) testi ile sayısı artan ya da oluşan mikronükleuslar; hücre döngüsünü kontrol eden genlerdeki hasar ya da eksikliklerden, mitotik hücre bölünmesi sırasında kardeş kromatidlerin sentromerlerinden tutunarak karşı kutuplara çekilmesini sağlayan mitotik iğdeki hatalardan, mitotik aygıtın diğer parçalarından ve kromozomal hasarlardan kaynaklanan ve hücrenin mitoz bölünmesi sırasında ortaya çıkan ana çekirdeğe dâhil olmayan kromozom fragmanlarından köken alan oluşumdur. Bu test ile tespit edilen mikronükleus sayılarının kontrol gruplarıyla karşılaştırılmalarıyla uygulama maddesinin genotoksik etkisinin olup olmadığından bahsedilebilmektedir. Ames testinde ise ile kromozom üzerindeki genotoksik etkiden değil gen üzerindeki genotoksik etkiden bahsedilebilmektedir. Bu test yöntemi kontrol grubuna oranla istatistiksel olarak artan koloni sayıları ile somatik hücrelerin tümör baskılayıcı genlerinde meydana gelen nokta mutasyonları, çerçeve kayması mutasyonları ve baz çifti değişimi gibi mutasyonların in vitro olarak tespit edilmesini sağlamaktadır. Salmonella typhimurium'un yapay mutasyonla oluşturulmuş suşlarına uygulanan maddeyle suşlardaki koloni sayılarının kontrol gruplarıyla karşılaştırılması ile genotoksik etkiden bahsedilmektedir. Bu sebeple hazırlanan tez çalışmasında kullanılan kaempferolün hücrelerin hem kromozomal yapısındaki hem de gen yapısındaki etkileri iki farklı genotoksikite testi ile çalışıldı ve belirlendi.

MN testinde TS EN ISO 10993-3'ün rehberliğinde CHO hücreleri üzerindeki etkileri, kullanım alanında bulunan fibroblast hücreleri ve üretra epitel hücreleri kullanıldı. KYMK, MK ve mit-c farklı konsantrasyonlarda hücrelere uygulandı. Mikronükleus oluşumları, % üzerinden değerlendirildiğinde; kaempferol ve kaempferol yüklü

mikrokürelerin in vitro mikronükleus oluşumunda etkisi olmadığı, genotoksik etki göstermediği görülürken, mit-c uygulaması sonucunda %mikronükleus oranında artış gözlemlenmektedir. Ayrıca yüksek konsantrasyonlarda (5 mg/mL) hücrelerin morfolojik yapısında da değişimler ve bozunmalar olduğu mikroskopik olarak tespit edilmiştir.

Literatür verileri incelendiğinde bazı bitkilerden ekstraksiyon yoluyla elde edilen kaempferolün Ames testi sonucunda TA98 suşunda geri dönen koloni sayısını arttırdığı ve genotoksik etki gösterdiği belirtilmiştir. Ticari olarak satın alınan kaempferol ile yaptığımız çalışmada; TA97, TA98, TA100, TA102 ve TA1535 suşlarında kaempferol, kaempferol yüklenen ve yüklenmeyen mikrokürelerin uygulanması sonucunda geri dönen koloni sayısında kontrol grubu ile anlamlı bir fark tespit edilememiştir. Kaempferolün klinikte kullanılacağı durumlarda bitkilerden izole edilmesi halinde bu testin mutlaka uygulanması gerekmektedir. Ticari olarak elde edilen kaempferolün de kontrol amaçlı testlerden geçmesi tavsiye edilmektedir. Mit-c'nin uygulandığı TA97, TA98, TA100, TA102 ve TA1535 suşlarında geri dönen koloni sayısında artış gözlemlenirken, genotoksik etki gösterdiği tespit edilmiştir.

Hazırlanan kaempferol yüklü mikrokürelerin ve mikrokürelerin hemolitik etkileri in vitro olarak test edildiğinde her iki materyalin de hemolitik etkiye sebep olmadığı gözlemlendi. Uygulamanın doğrudan yapılması ve yapıda bir yara oluşumunun bulunması sebebiyle malzemenin hemolitik bir etki göstermemesi en önemli noktalardan bir tanesidir. Üretral darlık tedavisi için sentezlenen mikroküreler farklı hastalıklarda kullanım potansiyeli oluşturduğundan kan ile temas edebilecek alanlara uygulandığında herhangi bir hemolitik etki göstermeyeceği bu çalışma ile gösterildi. Sadece kan ile değil mukoza ile temas da hemolitik etkinin değerlendirilmesi gerekliliklerindendir. Üretra kanalının yapısı ve cerrahi bir işlemle malzemenin yerleştirileceği öngörüldüğünden bu test gerçekleştirilmiş ve herhangi bir hemolitik etki tespit edilmemiştir. Yapılan bir çalışmada ROS yokluğunda kaempferolün hemolitik etki gösterebileceği bildirilirken bir başka çalışmada kaempferolün hemolize karşı inhibisyonundan bahsedilmektedir (290,291). Ayrıca aljinat ve hyaluronik asit için literatürde hemolitik etkisinin olduğunu gösteren bir veri bulunmamaktadır. Elde edilen veriler ışığında kaempferol yüklü mikrokürelerin hemolitik bir etkisi tespit edilememiştir.

İn vitro kan pıhtılaşma testleri uygulanan malzemenin kanda herhangi bir pıhtılaşma,

agregasyon ya da birikiminde etkisinin araştırıldığı testlerdir. TS EN ISO 10993:4'e göre bu testlerin kan ile temas edecek malzemeler ile yapılması zorunlu iken, diğer malzemeler için de tavsiye niteliği taşımaktadır. Bu sebeple gerçekleştirilen PF4, NE/Ela2, β TG, TAT ve FPA testleri tedavi için hazırlanan kaempferol yüklenen mikroküreler ile çalışılmıştır. Ayrıca literatürde farklı fibrozis kökenli hastalıklarda hemostatik sistemin işleyişinde düzensizlikler olduğu bildirilmekte ve artan pıhtılaşma faktörlerinin hücre parçacıklarının damarlara yapışma potansiyelinin arttığı bildirilmektedir. Üretral darlık hastalığının tespiti için kan testleri yerine idrar akım ölçümleri, üriner ultrasonografi, idrar kültürü ve rezidüel idrar tayini tercih edilmektedir. Bu yöntemlerle belirlenen üretra darlıkları genelde hastada şikayet boyutuna gelmiş ve ilerlemiş seviyedeki darlıklar olmaktadır. Kan testleri ile üretra darlığı tespiti klinikte uygulanmamaktadır. Üretral darlıkta pıhtılaşma faktörleri ile ilgili bir çalışmaya rastlanmasa da darlıkta rolü olabilecek olan pıhtılaşma faktörlerinin hazırlanan kaempferol yüklenen mikrokürelerin uygulama sonrasında artması istenmemektedir. Kan ile etkileştirilen kaempferol yüklenen ve yüklenmeyen mikrokürelerin ELİSA yöntemi ile PF4, NE/Ela2, β TG, TAT ve FPA miktarları belirlendiğinde uygulama sonrası bu seviyelerde artış gözlemlenmezken bu oranlarda uygulama sonrasında düşüş olduğu gözlemlendi. Klinikte PF4, NE/Ela2, β TG, TAT ve FPA artışına sebep olan ilaçlar ve hastalıklar için kaempferolün etkin bir tedavi yöntemi olabileceği düşünülmektedir. Ayrıca üretral darlık hastalarında bu parametrelerin incelenmesi hastalığın klinik açıdan seyrini değiştirebileceği öngörülmektedir.

Kaempferol yüklenen ve yüklenmeyen mikrokürelere yapılan hücre yapışma testi sonuçlarına göre L929 hücreleri kaempferol yüklenmemiş boş kürelere uygulandığında malzemenin etrafını sararak çoğalma gösterirken, kaempferol yüklenen mikrokürelere uygulandığında L929 hücrelerinin sayısında ve yayılımında azalma görülmüştür. Bunun kaempferolün fibrotik hücreler üzerindeki etkisinden dolayı olduğu düşünülmektedir.

İn vivo testler için kataterin koruyucusu etrafına yerleştirilen mikroküreler oda sıcaklığında laminar kabin içerisinde kurutulmuştur. Kataterin plastik koruyucusu üzerine yerleştirilen mikrokürelerin uygulama esnasında zorluğa sebep olmaması açısından kalınlığı önemlidir, SEM cihazı ile mikrokülerle kaplanan malzemenin kalınlığı ölçülmüş ve ortalama 54,5 μ m olarak cihaz ile ölçülmüştür.

Literatür verileri incelendiğinde; 2010 yılında Nuininga ve ark. Yaptıkları çalışmada hayvan modeli olarak yeni zellenda tavşanı kullanmışlar ve üretral defekt oluşturmuşlardır. Çalışma sonucunda kolajen tip I miktarında artış olduğunu ve büyüme faktörü yüklü olduğunu, darlık bölgesi elimine edildikten sonra bile büyüme faktörü içeren kolajen tip I in varlığını sürdürdüğünü rapor etmişlerdir. Devam eden kolajen I sentezi hastalığının tedavi edilmediğinin sadece geçici bir iyileşme olduğunun göstergesidir. Klinikte de üroloji cerrahisine başvuran hastaların tekrar ettiğini vurguladıkları tam bir iyileşme gerçekleşmediği bilinmektedir. Yapılan İHC değerlendirmesinde kolajen I sentezi tespit edilmemiş bu da tam bir tedavi gerçekleştiğinin göstergesi olarak kabul edilmiştir (285). Mazdak ve ark mitomycin-c'yi submukozal enjeksiyon ile yaptıkları çalışmada internal üretrotomi işlemi sonrasında uygulamışlardır. Mit-c antifibrotik ve antikollajenik olarak değerlendirildiği için kullandıklarını belirtmişler ve düşük sayıdaki hasta grubunda yaptıkları çalışmanın başarılı olduğunu belirtmişlerdir, ancak hastalığın rekürrensine dair moleküler ya da klinik düzeyde bir çalışma belirtmemişlerdir. Yaptıkları çalışma incelendiğinde internal üretrotomi sonrası mit-c uygulanmayan hasta grubuyla arasında bir fark yoktur ve yapılan yöntemde cerrahi uygulama yapılmış, hasta için uygulama zorluğu ve anestezi gibi işlemler söz konusudur. Farrell ve ark. yaptıkları bir diğer çalışma da internal üretrotomi sonrası mit-c uygulanmış ve tekrarın gerçekleştiği ancak cerrahi işlem gerektirmediği belirtilmiştir. Ayrıca mit-c uygulaması için hastalar ayda bir defa kliniğe gitmiş ve enjeksiyon işlemi yaptırmışlardır. Uygulama yapılan hastaların bazılarında cerrahi işlem gerektiren darlık da söz konusudur.

Mit-c uygulanan hayvan gruplarının Hematoksilen Eosin boyama (H&E) sonuçları değerlendirildiğinde; bazal membran yer yer düzgün sıra halinde olsa da bütünlüğü bulunmamaktadır. Ayrıca epitel tabaka oluşumu dokunun tamamında düzgün ve çoğalmış halde değildi. Darlık çevresinde azalma görülmesine rağmen epitel tabakanın yeniden oluşumunu tamamlamış olması geçici bir tedavi olduğunu göstermektedir.

Kaempferolün doğrudan uygulandığı üretra dokusunda yapılan HE boyamalarında; fibrozis bölgesinde epitel hücrelerinin proliferasyonunda bir artış söz konusudur. Darlığın olduğu bölgelerde gözlemlenen yaygın inflamasyon dokuda bir yenilenme ve düzenleme çalışmalarının olduğunu göstermektedir. İnflamasyonun bu bölgelerde fazla olması sitokin yanıtının çok olduğunu göstermekte, bu yanıtların hangileri

olduğu moleküler markırlar ile çalışılmalıdır. Tıpkı kaempferol uygulanan dokularda gözlemlendiği gibi kaempferol yüklenen mikrokürelerin uygulandığı dokularda da epitel tabakanın yenilendiği ve artış gösterdiği gözlemlendi. Kaempferol uygulanan gruplara göre bazal membran ve epitel yapısındaki düzen daha fazla gözlemlendi. Ayrıca kaempferol uygulanan ve kaempferol yüklü mikroküre uygulanan gruplarda bağ destek dokusunda azalma görülürken, mit-c uygulanan gruplarda bağ destek dokusunun artışı söz konusudur.

Uygulama yapılan preperatlar darlık oluşturulan ve müdahale edilmeyen kontrol grupları ile karşılaştırıldığında; uygulama yapılmayan kontrol grubunun histolojik yapısına en yakın grup kaempferol yüklenen mikrokürelerin uygulandığı grup olarak tespit edildi.

Massan trikrom (MT) boyama sonuçlarına göre; fibrotik alan ve etrafında oluşan epitel tabaka, bazal membran ve dokunun genel yapısı incelendi. Bu boyama yöntemi ile birlikte kolajen içeren hücreler mavi, kas elyaf yapılar kırmızı ve çekirdekler siyah-mor renkte boyanmaktadır. Sıçanlardan alınan üretra dokularında yapılan MT boyamaları ile kolajen seviyeleri genel olarak tanımlanabilir ve iyileşme/televi durumu değerlendirilebilir. Mit-c uygulanan MT boyamalarında epitel tabaka ve bazal membran çevresi başta olmak üzere kolajen boyamalar gözlemlenmiştir. Kaempferol tek başına ve mikrokürelere yüklenerek uygulanan gruplarda ise kısmen kolajen boyamaları gözlemlenmektedir. Darlık oluşturulan kontrol gruplarında kolajen miktarlarının fazla olduğu, uygulama yapılmayan kontrol grubunda ise kısmen kolajen boyanmaların olduğu tespit edildi.

Yapılan histolojik boyamalar neticesinde; kaempferol uygulanan ve kaempferol yüklü mikrokürelerin uygulandığı grupların darlık bölgelerinde iyileşme, epitelizasyonda artış, bazal membran bütünlüğü ve darlık alanlarında inflamasyonlar gözlemlenirken, klinikte kullanılan mit-c'nin darlık bölgelerinde bu parametrelerin görülmemesi mit-c'nin geçici bir tedavi yöntemi olduğu, kaempferolün mit-c'den daha başarılı sonuçlar verdiği düşünülmektedir.

Bu tez çalışmasında klinikte kullanılan mit-c nin in vitro ve in vivo çalışmalarda antifibrotik bir etkisi tespit edilemedi. Mit-c uygulanan deneklerde kolajen sentezinin devam ettiği masson trikrom ve İHC kolajen I boyamaları sonucunda gösterildi (54,286).

Tez çalışması için yapılan in vitro ve in vivo test sonuçları birbirini desteklemektedir.

Bu çalışma ile birlikte kaempferol ilk defa üretral darlık tedavisi için kullanılmış ve başarılı sonuç elde edilmiştir. Yapılan kanda pıhtılaşma faktörlerinin değişimi ile ilgili testlerin kaempferol için kullanılması literatürde ilk özelliği taşımaktadır. Ayrıca üretral darlık hastalığı olan bireylerde bu faktörlerin incelenmesi tavsiye edilmektedir.

Kaempferol ve kaempferol yüklü mikroküreler yapılan testlerde darlığı tedavi edici etki göstermiştir ve fenotipik olarak da ilgili proteinlerin ekspresyonlarının olmadığı tespit edilmiştir.

Literatürde kaempferolün genotoksik etkilerinin olduğu çalışmalar tespit edilmiş olsa da bu çalışmalarda kullanılan kaempferolün sentezlendiği bitki türüne göre değişiklik gösterdiği gözlemlenmiştir. Çalışmada kullanılan %98 saflıktaki kaempferolün genotoksik etkisine kromozom ve gen mutasyonu düzeyinde rastlanılamamıştır.

Çalışmada sentezlenen kaempferol yüklü mikrokürelerin üretral darlıkta oluşan fibrozisi inhibe ettiği tespit edilmiştir. Bu sonuçlar ile birlikte sentezlenen materyalin diğer aşırı kolajen üreten ve fibrozisle sonuçlanan hastalıkların tedavisi için de kullanılabileceği öngörülmektedir.

Çalışma da kullanılan kaempferolün de kaempferol yüklü mikrokürlerinde üretral darlık tedavisinde kullanılabileceği öngörülmektedir. Ancak kaempferolün doğrudan uygulandığı in vitro ve in vivo testlerde; dokuların ve hücrelerin morfolojisi incelendiğinde kaempferol yüklü mikrokürelerin doğal faunaya daha uygun yanıt verdiği gözlemlendiğinden kontrollü ilaç salımı yapan mikrokürelerin uygulanmasının daha uygun olduğu öngörülmektedir.

Üretral darlık üzerinde kaempferol literatürde ilk defa bu tez çalışmasında çalışılmıştır, elde edilen veriler literatür verileri ile karşılaştırıldığında bugüne kadar üretral darlık tedavisi için yapılmış pre-klinik ve klinik ilaç ve/veya cerrahi tedavilerde kaempferol yüklü mikroküreler ve kaempferol kadar etkin sonuç verisine rastlanamamıştır.

Kaempferolün epitel hücrelerde hücre duvarını onarıcı özelliği göz önünde bulundurulduğunda; epitel doku tabanlı meydana gelebilecek yaralanmalar için kullanılabileceği bunlar ile ilgili çalışmaların olmadığı tespit edilmiştir.



KAYNAKLAR

1. Moore, K. L., & Persaud, T. V. (1998). The pharyngeal (branchial) apparatus. *Moore KL, Persaud TV. The Developing Human Clinically Oriented Embryology. 6th ed. Philadelphia, Pa: WB Saunders, 215-56.*
2. Duckett JW. Hypospadias. Campbell's Urology (Walsh PC, Retik AB, Vaughan ED, Wein AJ, ed) Seventh edition. Philadelphia, USA. W. B. Saunders Company. 1998: Vol.3; 2093–2119.
3. 20. Tanagho EA. Anatomy of the genitourinary tract. Smith General Urology Editado por Tanagho EA, McAninch JW. 2008;13:1-16.
4. Rosenstein, D. I., & Alsikafi, N. F. (2006). Diagnosis and classification of urethral injuries. *Urologic Clinics, 33*(1), 73-85.
5. Duel BP, Barthol JS, Gonzalez R. Management of urethral strictures after hypospadias repair. *J Urol* 1998;160(1):170-1.
6. Scherz HC, Kaplan GW, Packer MG, Brock WA. Post-hypospadias repair urethral strictures: a review of 30 cases. *J Urol* 1988;140(5 Pt 2):1253-5.
7. Baskin LS, Constantinescu SC, Howard PS, McAninch JW, Ewalt DH, Duckett JW, et al. Biochemical characterization and quantitation of the collagenous components of urethral stricture tissue. *The Journal of urology.* 1993;150(2 Pt 2):642-7.
8. Santucci RA, Joyce GF, Wise M. Male urethral stricture disease. *The Journal of urology.* 2007;177(5):1667-74.
9. Batur, A. F., Kutman, K. G., Akdeniz, E., & Bolat, M. S. (2015). Erkek Üretra Darlıkları ve Tedavi Stratejileri.
10. Latini, J. M., McAninch, J. W., Brandes, S. B., Chung, J. Y., & Rosenstein, D. (2014). SIU/ICUD consultation on urethral strictures: epidemiology, etiology, anatomy, and nomenclature of urethral stenoses, strictures, and pelvic fracture urethral disruption injuries. *Urology, 83*(3), S1-S7.
11. Fenton AS, Morey AF, Aviles R, Garcia CR. Anterior urethral strictures:

etiology and characteristics. *Urology*. 2005 Jun;65(6):1055-8.

12. Mundy, A. R., & Andrich, D. E. (2011). Urethral strictures. *BJU international*, 107(1), 6-26.
13. Morey AF, McAninch JW. Ultrasound evaluation of the male urethra for assessment of urethral stricture. *J Clin Ultrasound*. 1996;24(8):473-9
14. Buckley JC, Wu AK, McAninch JW. Impact of urethral ultrasonography on decision-making in anterior urethroplasty. *BJU international*. 2012;109(3):438-42.
15. McAninch JW, Laing FC, Jeffrey RB, Jr. Sonourethrography in the evaluation of urethral strictures: a preliminary report. *The Journal of urology*. 1988;139(2):294-7.
16. Steenkamp JW, Heyns CF, de Kock ML. Internal urethrotomy versus dilation as treatment for male urethral strictures: A prospective, randomized comparison. *J Urol*. 1997; 157:98-101.
17. Spilotros M, Venn S, Anderson P, Greenwell T. Penile urethral stricture disease. *Journal of Clinical Urology*. 2019;12(2):145-57.
18. Cai T. Trattamento antibiotico empirico, mirato o ragionato? Dalla pratica clinica alle Linee Guida EAU 2017. *Urologia Journal*. 2018;85(1_suppl):S14-S9.
19. Atan A, Tuncel A, Balcı M, Aslan Y, Köseoğlu E, Erkan A. Penile fasciocutaneous flap urethroplasty in long segment urethral stricture. *Ulus Travma Acil Cerrahi Derg*. 2014;20(6):427-31.
20. Walsh PC, Retik A, Kavoussi L, Vaughan E, Novick A, Wein A. Penis ve üretra cerrahisi, in *Campbell Üroloji*, 8. Baskı. Anafarta MK, Yaman MÖ (çeviren) 2005;64:3915-30.
21. Naudé AM, Heyns CF. What is the place of internal urethrotomy in the treatment of urethral stricture disease? *Nature Reviews Urology*. 2005;2(11):538.
22. Heyns CF. Urethrotomy and other minimally invasive interventions for urethral stricture. *Urethral Reconstructive Surgery*: Springer; 2008. p. 63-83.
23. Pansadoro V, Emiliozzi P. Internal urethrotomy in the management of anterior urethral strictures: long-term followup. *The Journal of urology*. 1996;156(1):73-5.

24. Dubey D. The current role of direct vision internal urethrotomy and self-catheterization for anterior urethral strictures. *Indian Journal of Urology: IJU: Journal of the Urological Society of India*. 2011;27(3):392.
25. Carlton FE, Scardino PL, Quattlebaum RB. Treatment of urethral strictures with internal urethrotomy and 6 weeks of silastic catheter drainage. *The Journal of urology*. 1974;111(2):191-3.
26. Pain J, St. J. Collier St. J. Collier D. Factors influencing recurrence of urethral strictures after endoscopic urethrotomy: the role of infection and peri- operative antibiotics. *British journal of urology*. 1984;56(2):217-9.
27. Albers P, Fichtner J, Bruhl P, Muller SC. Long-term results of internal urethrotomy. *The Journal of urology*. 1996;156(5):1611-4.
28. McDermott DW, Bates RJ, Heney NM, Althausen A. Erectile impotence as complication of direct vision cold knife urethrotomy. *Urology*. 1981;18(5):467-9.
29. Heyns CF, Steenkamp JW, De Kock ML, Whitaker P. Treatment of male urethral strictures: is repeated dilation or internal urethrotomy useful? *The Journal of urology*. 1998;160(2):356-8.
30. Jin T, Li H, Jiang LH, Wang L, Wang KJ. Safety and efficacy of laser and cold knife urethrotomy for urethral stricture. *Chinese medical journal*. 2010;123(12):1589-95.
31. Dutkiewicz SA, Wroblewski M. Comparison of treatment results between holmium laser endourethrotomy and optical internal urethrotomy for urethral stricture. *International urology and nephrology*. 2012;44(3):717-24.
32. Sikafi Z. A self- expanding, self- retaining temporary urethral stent (Urocoil™) in the treatment of recurrent urethral strictures: preliminary results. *British journal of urology*. 1996;77(5):701-4.
33. GD W, NV W. *Strictures of the male urethra in Adult and Pediatric Surgery*. 4th ed. Glinwater TY SS, Howards JT et.al., editor. Baltimore: Lipincott Williams and Wilkins; 2002.
34. Wong SS, Aboumarzouk OM, Narahari R, O'Riordan A, Pickard R. Simple urethral dilatation, endoscopic urethrotomy, and urethroplasty for urethral stricture disease in adult men. *Cochrane Database of Systematic Reviews*. 2012(12).
35. Iversen Hansen R, Guldberg O, Møller I. Internal urethrotomy with the Sachse

- urethrotome. Scandinavian journal of urology and nephrology. 1981;15(3):189-91.
36. Andrich DE, Mundy AR. What's new in urethroplasty? Curr Opin Urol. 2011;21(6):455- 60
 37. Andrich DE, Mundy AR. What's new in urethroplasty? Current opinion in urology. 2011;21(6):455-60.
 38. Eltahawy EA, Virasoro R, Schlossberg SM, McCammon KA, Jordan GH. Long-term followup for excision and primary anastomosis for anterior urethral strictures. The Journal of urology. 2007;177(5):1803-6.
 39. Cooperberg MR, McAninch JW, Alsikafi NF, Elliott SP. Urethral reconstruction for traumatic posterior urethral disruption: outcomes of a 25-year experience. The Journal of urology. 2007;178(5):2006-10.
 40. GD W, NV W. Strictures of the male urethra in Adult and Pediatric Surgery. 4th ed. Glinwater TY SS, Howards JT et.al., editor. Baltimore: Lipincott Williams and Wilkins; 2002.
 41. Salam, M. A. (2013). Principles and practice of Urology (Vol. 1). JP Medical Ltd.
 42. Barbagli G, Sansalone S, Djinovic R, Romano G, Lazzeri M. Current controversies in reconstructive surgery of the anterior urethra: a clinical overview. International braz j urol. 2012;38(3):307-16.
 43. McNeal JE, Redwine EA, Freiha FS, Stamey TA. Zonal distribution of prostatic adenocarcinoma. Correlation with histologic pattern and direction of spread. Am J Surg Pathol 1988;12:897-906.
 44. Burcu, E. S. E. R.; Dınçel, Aylin Sepıcı. Kromatografiye Giriş, Yüksek Performanslı Sıvı Kromatografi Kullanımında Basit İpuçları. *Journal Of Health Services And Education*, 2018, 2.2: 51-57.
 45. Oesterling JE, Martin SK, Bergstralh EJ, Lowe FC. The use of prostate-specific antigen in staging patients with newly diagnosed prostate cancer. JAMA 1993;269:57- 60.
 46. Eskicorapci SY, Guliyev F, Islamoglu E, Ergen A, Ozen H. The effect of prior biopsy scheme on prostate cancer detection for repeat biopsy population: results of the 14- core prostate biopsy technique. Int Urol Nephrol 2007;39:189-95.

47. Scattoni V, Zlotta A, Montironi R, et al. Extended and saturation prostatic biopsy in the diagnosis and characterisation of prostate cancer: a critical analysis of the literature. *Eur Urol* 2007;52:1309-22.
48. Philip J, Hanchanale V, Foster CS, Javle P. Importance of peripheral biopsies in maximising the detection of early prostate cancer in repeat 12-core biopsy protocols. *BJU Int* 2006;98:559-62.
49. Patterson JM, Chapple CR. Surgical techniques in substitution urethroplasty using buccal mukosa for the treatment of anterior urethral strictures. *Eur Urol* 2008;53:1162-71.
50. Roberts AB, McCune BK, Sporn MB. TGF-beta: regulation of extracellular matrix. *Kidney Int.* 1992 Mar; 41(3): 557-9.
51. Vanni, A. J., Zinman, L. N., & Buckley, J. C. (2011). Radial urethrotomy and intralesional mitomycin C for the management of recurrent bladder neck contractures. *The Journal of urology*, 186(1), 156-160.
52. Soo, C., Shaw, W. W., Zhang, X., Longaker, M. T., Howard, E. W., & Ting, K. (2000). Differential expression of matrix metalloproteinases and their tissue-derived inhibitors in cutaneous wound repair. *Plastic and reconstructive surgery*, 105(2), 638-647.
53. Tabassi, K. T., Yarmohamadi, A., & Mohammadi, S. (2011). Triamcinolone injection following internal urethrotomy for treatment of urethral stricture. *Urology journal*, 8(2), 132.
54. Mazdak, H., Izadpanahi, M. H., Ghalamkari, A., Kabiri, M., Khorrami, M. H., Nouri-Mahdavi, K., & Yazdani, M. (2010). Internal urethrotomy and intraurethral submucosal injection of triamcinolone in short bulbar urethral strictures. *International urology and nephrology*, 42(3), 565-568.
55. Sayharman, A., Metin, O., Tarkan, F., Özgül, A., & Kuyumcuoğlu, U. Üretral defekt oluşturulmuş köpeklerde evert edilmiş ven grefti kullanımı.
56. Moradi, M., Derakhshandeh, K., Karimian, B., & Fasihi, M. (2016). Safety and efficacy of Intraurethral Mitomycin C Hydrogel for prevention of post-traumatic anterior urethral stricture recurrence after internal urethrotomy. *Journal of Injury and Violence Research*, 8(2), 75
57. Tabassi, K. T., Yarmohamadi, A., & Mohammadi, S. (2011). Triamcinolone

- injection following internal urethrotomy for treatment of urethral stricture. *Urology Journal*, 8(2), 132-136.
58. Ali, L., Shahzad, M., Orakzai, N., Khan, I., & Ahmad, M. (2015). Efficacy of mitomycin C in reducing recurrence of anterior urethral stricture after internal optical urethrotomy. *Korean journal of urology*, 56(9), 650-655.
 59. Kumar, S., Kishore, L., Sharma, A. P., Garg, N., & Singh, S. K. (2015). Efficacy of holmium laser urethrotomy and intralesional injection of Santosh PGI tetra-inject (Triamcinolone, Mitomycin C, Hyaluronidase and N-acetyl cysteine) on the outcome of urethral strictures. *Central European journal of urology*, 68(4), 462-465.
 60. Fu, D., Chong, T., Li, H., Zhang, H., & Wang, Z. (2014). Docetaxel inhibits urethral stricture formation, an initial study in rabbit model. *PloS one*, 9(11), e112097.
 61. Castiglione, F., Dewulf, K., Hakim, L., Weyne, E., Montorsi, F., Russo, A., Albersen, M. (2016). Adipose-derived stem cells counteract urethral stricture formation in rats. *European urology*.
 62. Sangkum, P., Yafi, F. A., Kim, H., Bouljihad, M., Ranjan, M., Datta, A., & Hellstrom, W. J. (2016). Effect of adipose tissue-derived stem cell injection in a rat model of urethral fibrosis. *Canadian Urological Association Journal*, 10(5-6), 175-80.
 63. Kurt, O., Yesildag, E., Yazici, C. M., Aktas, C., Ozcaglayan, O., & Bozdemir, Y. (2016). Effect of tadalafil on prevention of urethral stricture after urethral injury: an experimental study. *Urology*, 91, 243-e1.
 64. Mantripragada, S. (2001). Depofoam technology for sustained release injectable drug delivery, *Drug Delivery and System Science*, 1, 13-16.
 65. Gürsoy, A., Pişkin, E., Dortunç, B., ve Peppas, N.A. (1989). Kontrollü ilaç serbestleşiren sistemler (Birinci Baskı). İstanbul: Marmara Üniversitesi Eczacılık Fakültesi Yayınları. 20-21.
 66. Bruck, S. D. (1983). In *Controlled Drug Delivery* (First edition). Florida: CRC Press, 1-15.
 67. Nedal, Y. A. T., Salam A., and Makhoulouf, H. (2018). Historical development of drug delivery systems: From conventional macroscale to controlled, targeted, and responsive nanoscale systems. *Stimuli Responsive Polymeric Nanocarriers*

- for Drug Delivery Applications, 1, 3-41.
68. Uhrich, K. E., Cannizzaro, S. M., Langer, R. S., and Shakesheff, K. M. (1999). Polymeric systems for controlled drug release. *Chemical Reviews*, 99(11), 3181–3198.
 69. Kao, C.C., Chen, S.C. and Sheu, S.T. (1997). Lagtime method to delay drug release to various sites in the gastrointestinal tract. *Journal of Controlled Release*, 4, 263-270.
 70. Miyazaki, S., Nakayama, A., Oda, M., Takada, M. and Attwood, D. (1995). Drug release from oral musocal adhesive tablets of chitosan and sodium alginate. *International journal of pharmaceutics*, 118, 257-263.
 71. G. Singh, S. Kaur, and S. T. Singh, “Local drug delivery in periodontics: A review,” *Journal of Periodontal Medicine Clinical Practice*, vol. 1, no. 3, pp. 272–284, 2014.
 72. N. Erdöl Aydın, “Hidroksiapatit - jelatin ve hidroksiapatit - kitosan biyokompozitlerin yapay vücut sıvısı ortamında üretimi sırasında 5-FU ilacının yüklenmesi ve ilaç salım çalışmaları,” *Journal of Science and Technology*, vol. 11, no. 3, pp. 587–605, 2018.
 73. A. G. Akkan, “Farmakokinetik/Farmakodinamik Temel Tanımlar,” *ANKEM Dergisi*, vol. 28, pp. 82–85, 2014.
 74. Vyas, S. P., and Khar, R. K. (2002). *Controlled Drug delivery: Concepts and Advances*. Vallabh Prakashan, 1, 156-189.
 75. Shargel, L., and Yu, A. B. C. *Applied Biopharmaceutics and Pharmacokinetics* (Seventh edition). New York: Mc Graw-Hill, 169-171.
 76. Kumar, M. N. V. R. (2000). Nano and microparticles as controlled drug delivery devices. *Journal of Pharmacy and Pharmaceutical Sciences*, 3, 234-258.
 77. Kim, S. Y., Lee and Y. M. (1999). Drug release behavior of electrical responsive poly(vinyl alcohol)/poly (acrylic acid) IPN hydrogels under an electric stimulus, *Journal of Applied Polymer Science*, 74, 1752-1761.
 78. Kweon, D. K. and Kang, D. W. (1999). Drug release behavior of chitosan-g-poly(vinyl alcohol) copolymer matrix, *Journal of Applied Polymer Science*, 74,

458-464.

79. Bruck S.D.(1983).Pharmacological basis of controlled drug delivery, Controlled Drug Delivery, Basic Concepts, Florida, CRC Press, 1, 1-15.
80. Rishchel, W. A. (1989). Biopharmaceutic and pharmacokinetic aspects in the desing of controlled release peroral drug delivery system, Drug Development and Industrial Pharmacy, 15 (687), 1073- 1103.
81. Yüksel, N., & Baykara, T. (1995). *Nikapdipin hidroklorürün kontrollü salım yapan mikrokürelerinin hazırlanması* (Doctoral dissertation, Doktora Tezi, Ankara Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü, Ankara, 225-245 1995)
82. Robinson, J. R., Lee, V. H. L. (1987). Controlled drug delivery–fundamentals and applications, 2nd ed., Marcel Dekker Inc, New York.
83. Welling, P. G. (1983). Oral controlled drug administration, pharmacokinetic consideration, Drug Development and Industrial Pharmacy, 9 (7), 1185- 1225.
84. Hansch, C., Dunn, W. J. (1972). 3rd linear relationships between lipophilic character and biological activity of drugs, Journal of Pharmaceutical Sciences 61 (1), 1– 19.
85. Hansch, C., Dunn, W. J. (1972). 3rd linear relationships between lipophilic character and biological activity of drugs, Journal of Pharmaceutical Sciences 61 (1), 1– 19.
86. Fincher, J. H. (1968). Particle size of drugs and its relationship to absorption and activity, Journal of Pharmaceutical Sciences, 57, 1825- 1835.
87. Niebergall, P.J., Sugita, E.T., and Schnaare, R.L. (1974) Potential dangers of common drug dosing regimens. Am. J. Hosp. Pharm., 31, 53- 58, 107.
88. Fujita, T., Iwasa, J., and Hansch, C. (1964). A new substituent constant, derived from partition coefficients. J. Amer. Chem. Soc. 86, 5175- 5180.
89. Danckwets, M. and Fassihi, A. (1991). Implantable controlled release drug delivery system: A review, Drug Development and Industrial Pharmacy, 17, 1465-1502.
90. Gürsoy, A. Z. (2002). Kontrollü Salımın Farmakokinetik Özellikleri, Kontrollü Salım Sistemleri, İstanbul, Kontrollü Salım Derneği Yayınları, 7-20.

91. Langer, R., Peppas, N., "Chemical and physical structure of polymers as carriers for controlled release of bioactive agents: A Review", *JMS-Rev. Macromol. Chem. Phys.*, 23(1): 61-126 (1983).
92. Bajpai, A.K., Shukla, S.K., Bhanu, S., Kankane, S., "Responsive polymers in controlled drug delivery", *Progg. Polym. Sci.*, 33: 1088-1118 (2008).
93. Kim, K. K., and Pack, D. W. (2007). *Microspheres for Drug Delivery. BioMEMS and Biomedical Nanotechnology*, 1, 19-50.
94. Kreitz, M., Brannon-Peppas, L., and Mathiowitz, E. (1999). *Microencapsulation; Encyclopaedia of controlled drug delivery*. John Wiley Sons, 493-553.
95. Bertling, J., Blömer, J., and Kümmel, R. (2004). *Hollow Microspheres Review, Chemical Engineering Technology*, 27, 829-837.
96. Sahil, K., Akanksha M., Premjeet, S., Bilandi, A., and Kapoor, B. (2011). *Microsphere: A Review. International Journal Of Research In Pharmacy and Chemistry*, 1(4), 1184- 1198.
97. Edlund, U. and Albertson, A. C. (2002). *Degradable polymer microspheres for controlled drug delivery, Advances in Polymeric Science*, 157, 67-112.
98. Pereswetoff-Morath, L. (1998). *Microspheres as nasal drug delivery systems. Advanced drug delivery reviews*, 29(1-2), 185-194.
99. Danckwets, M. and Fassihi, A. (1991). *Implantable controlled release drug delivery system: A review, Drug Development and Industrial Pharmacy*, 17, 1465-1502.
100. Anselmo, A. C. and Mitragotri, S. (2014). *An overview of clinical and commercial impact of drug delivery systems, Journal of Controlled Release*, 190, 15-28,
101. Kaş, S. H. (2014). *Kontrollü Salım sistemleri (İkinci Baskı). İstanbul: Kontrollü Salım Sistemleri Derneği Yayını*, 74-76.
102. Sree, G. P. B., Gupta V. R. M., Devanna N., and Jayasurya K. (2014). *Microspheres as drug delivery system – A review. Journal of Global Trends in Pharmaceutical Science*, 5(3), 1961-1972.

103. Mohan, M., Sujitha, H., Rao, V. U. M., Ashok, M., and Arun, K. B. (2014). A brief review on mucoadhesive microspheres, *International Journal of Recent Research and Applied Studies*, 4(1), 975-986.
104. Danckwets, M. and Fassihi, A. (1991). Implantable controlled release drug delivery system: A review, *Drug Development and Industrial Pharmacy*, 17, 1465-1502.
105. Sheehy, E. J., Cunniffe, G. M., & O'Brien, F. J. (2018). Collagen-based biomaterials for tissue regeneration and repair. In *Peptides and proteins as biomaterials for tissue regeneration and repair* (pp. 127-150). Woodhead Publishing.
106. Tan, H., Wan, L., Wu, J., & Gao, C. (2008). Microscale control over collagen gradient on poly (L-lactide) membrane surface for manipulating chondrocyte distribution. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*, 67(2), 210-215.
107. Tunçay, M., ve Çalış, S. (1999). İlaç Taşıyıcı Sistemlerde Kullanılan Biyoparçalanabilir Sentetik ve Doğal Polimerler. *FABAD Journal of Pharmaceutical Science*, 24, 109-123
108. Sree, G. P. B., Gupta V. R. M., Devanna N., and Jayasurya K. (2014). Microspheres as drug delivery system – A review. *Journal of Global Trends in Pharmaceutical Science*, 5(3), 1961-1972.
109. Mohan, M., Sujitha, H., Rao, V. U. M., Ashok, M., and Arun, K. B. (2014). A brief review on mucoadhesive microspheres, *International Journal of Recent Research and Applied Studies*, 4(1), 975-986.
110. Crotts, G. and Park, T. G. (1998). Protein delivery from poly(lactid-co-glycolic acid) biodegradable microspheres: release kinetics and stability issues. *Journal of Microencapsulation*, 15, 699-713.
111. Bansal, H., Kaur, S. P., and Gupta, A. K. (2011). Microsphere: Methods of preparation and applications; a comparative study. *International Journal of Pharmaceutical Sciences Review and Research*, 10(1), 69-78.
112. Johansen, P., Men, Y., Mekle, H. P. and Gander B. (2000). Revisiting PLA/PLGA microspheres: an analysis of their potential in paranteral vaccination. *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics*, 50, 129-

146.

113. Shahj, S. S., Cha, Y. and Pitt, C. G. (1992). Poly(lactid-co-glycolic acid): diffusion or degradation controlled drug delivery?, *Journal of Controlled Release*, 18, 261-270.
114. Vert, M., Schwach, G., Engel, R. and Coudane, J. (1998). Something new in field of PLA/PLGA bioresorbable polymers?, *Journal of Controlled Release*, 53, 85-92.
115. Witschi, C. and Doelker, E. (1998). Influence of the microencapsulation method and peptid loading on poly(lactic acid) and poly(lactic-co-glycolic acid) degradation during in vitro testing. *Journal of Controlled Release*, 51, 327-341.
116. Danckwerts, M.; Fasshi, A. Implantable controlled release drug delivery systems: a review. *Drug development and industrial pharmacy*, 1991, 17.11: 1465-1502.
117. Erbil, Yildirim H. Vinyl acetate emulsion polymerization and copolymerization with acrylic monomers. CRC press, 2000.
118. Lovell, Peter A.; El-Aasser, Mohamed S. (ed.). *Emulsion polymerization and emulsion polymers*. Wiley, 1997.
119. Gupta, Mradul R., et al. an applauded novel drug delivery system for arthritis using NSAIDs by microencapsulation technique-a review. *Scholar's research library*, 2010, 2: 335-345.
120. Zhang, Jian, et al. Preparation of Single, Heteromorphic Microspheres, and Their Progress for Medical Applications. *Macromolecular Materials and Engineering*, 2021, 306.2: 2000593.
121. Alnaief, M., et al. A novel process for coating of silica aerogel microspheres for controlled drug release applications. *Microporous and mesoporous materials*, 2012, 160: 167-173
122. Arshady, Reza. Microspheres for biomedical applications: preparation of reactive and labelled microspheres. *Biomaterials*, 1993, 14.1: 5-15.
123. Sinha, V. R., et al. Chitosan microspheres as a potential carrier for drugs. *International journal of pharmaceutics*, 2004, 274.1-2: 1-33.
124. John, Phillip M.; Becker, Charles H. Surfactant effects on spray- congealed formulations of sulfaethylthiadiazole—wax. *Journal of pharmaceutical sciences*, 1968, 57.4: 584-589.

125. Sahu, S.C. and Gray, G.C. Pro-oxidant activity of flavonoids: effects on glutathione and glutathione S-transferase in isolated rat liver nuclei. *Cancer Lett.*, 1996, 104, 193-6.
126. Galati, G.; Sabzevari, O.; Wilson, J.X.; O'Brien, P.J. Prooxidant activity and cellular effects of the phenoxyl radicals of dietary flavonoids and other polyphenolics. *Toxicology*, 2002, 177, 91-104.
127. Chen A.Y. ve Chen Y.C., (2013), A review of the dietary flavonoid, kaempferol on human health and cancer chemoprevention, *Food Chemistry*, 138 (4), 2099–2107.
128. Willital GH, Heine H. Efficacy of contractubex[®] gel in the treatment of fresh scars after thoracic surgery in children and adolescents. *Int J Clin Pharmacol Res* 1994;14:193-202.
129. Saulis AS, Mogford JH, Mustoe TA. Effect of Mederma on hypertrophic scarring in the rabbit ear model. *Plast Reconst Surg* 2002;110:177-83.
130. Ho WS, Ying SY, Chan PC, et al. Use of onion extract, heparin, allantoin gel in prevention of scarring in chinese patients having laser removal of tattoos: a prospective randomized controlled trial. *Dermatol Surg* 2006;32:891-6.
131. J. M. Calderon-Montano, E. Burgos-Moron, C. Perez-Guerrero, and M. Lopez-Lazaro, “A Review on the Dietary Flavonoid Kaempferol,” *Mini-Reviews Med. Chem.*, vol. 11, no. 4, pp. 298–344, Apr. 2011, doi: 10.2174/138955711795305335.
132. Garde-Cerdan, T., Gonzalo-Diago, C, (2016), Kaempferol, -biosynthesis, food sources and therapeutic uses-, Instituto de Ciencias de la Vid y del Vino (ICVV), Logroño, Spain, ISBN: 978-1-63485-828-1, NOVA.
133. Chen A.Y. ve Chen Y.C., (2013), A review of the dietary flavonoid, kaempferol on human health and cancer chemoprevention, *Food Chemistry*, 138 (4), 2099–2107.
134. Amoros, M.; Simões, C.M.O.; Girre, L.; Sauvager, F.; Cormier, M. Synergistic effect of flavones and flavonols against herpes simplex virus type 1 in cell culture. Comparison with the antiviral activity of propolis. *J. Nat. Prod.* **1992**, 55, 1732–1740.
135. Hämäläinen, M., Nieminen, R., Vuorela, P., Heinonen, M., & Moilanen, E. (2007). Anti-inflammatory effects of flavonoids: genistein, kaempferol, quercetin, and daidzein inhibit STAT-1 and NF-κB activations, whereas flavone,

- isorhamnetin, naringenin, and pelargonidin inhibit only NF- κ B activation along with their inhibitory effect on iNOS expression and NO production in activated macrophages. *Mediators of inflammation*, 2007.
136. Narayana, K.R.; Reddy, M.S.; Chaluvadi, M.R.; Krishna, D.R. Bioflavonoids classification, pharmacological, biochemical effects and therapeutic potential. *Indian J. Pharmacol.* **2001**, 33, 2–16.
 137. Saric, S.; Sivamani, R.K. Polyphenols and sunburn. *Int. J. Mol. Sci.* 2016, 17, 1521.
 138. Gong JH, Shin D, Han SY et al. Kaempferol suppresses eosinophil infiltration and airway inflammation in airway epithelial cells and in mice with allergic asthma. *J Nutr* 2012;142:47–56.
 139. Gong JH, Shin D, Han SY et al. Blockade of airway inflammation by kaempferol via disturbing tyk-stat signaling in airway epithelial cells and in asthmatic mice. *Evid Based Complement Alternat Med* 2013;2013:250725.
 140. Willital GH, Heine H. Efficacy of contractubex gel in the treatment of fresh scars after thoracic surgery in children and adolescents. *Int J Clin Pharmacol Res* 1994;14:193-202.
 141. Saulis AS, Mogford JH, Mustoe TA. Effect of Mederma on hypertrophic scarring in the rabbit ear model. *Plast Reconst Surg* 2002;110:177-83.
 142. Ho WS, Ying SY, Chan PC, et al. Use of onion extract, heparin, allantoin gel in prevention of scarring in chinese patients having laser removal of tattoos: a prospective randomized controlled trial. *Dermatol Surg* 2006;32:891-6.
 143. Komosińska-Vassev, K.; Olczyk, P.; Kaźmierczak, J.; Mencner, L.; Olczyk, K. Bee pollen: Chemical composition and therapeutic application. *Evid. Based Compl. Altern. Med.* 2015, 2015.
 144. Francis, A.R.; Shetty, T.K.; Bhattacharya, R.K. Modulating effect of plant flavonoids on the mutagenicity of N-methyl-N'-nitro-N-nitrosoguanidine. *Carcinogenesis*, 1989, 10, 1953-5.
 145. Francis, A.R.; Shetty, T.K.; Bhattacharya, R.K. Modifying role of dietary factors on the mutagenicity of aflatoxin B1: in vitro effect of plant flavonoids. *Mutat. Res.*, 1989, 222, 393-401.
 146. Phromnoi, K.; Yodkeeree, S.; Anuchapreeda, S.; Limtrakul, P. Inhibition of MMP-3 activity and invasion of the MDA-MB-231 human invasive breast carcinoma cell line by bioflavonoids. *Acta Pharmacol. Sin.*, 2009, 30, 1169-76.

147. Shen, S.C.; Lin, C.W.; Lee, H.M.; Chien, L.L.; Chen, Y.C. Lipopolysaccharide plus 12-o-tetradecanoylphorbol 13-acetate induction of migration and invasion of glioma cells in vitro and in vivo: Differential inhibitory effects of flavonoids. *Neuroscience*, 2006, 140, 477-89.
148. PELEK, Şafak. Deneysel karaciğer fibrozisinde capparıs ovata, rutin, kaempferol ve n-asetilsisteinin koruyucu etkileri ile inflamatuvar gen ekspresyonlarının ilişkisinin incelenmesi. 2019.
149. Lee, C. F., Yang, J. S., Tsai, F. J., Chiang, N. N., Lu, C. C., Huang, Y. S., ... & Chen, F. A. (2016). Kaempferol induces ATM/p53-mediated death receptor and mitochondrial apoptosis in human umbilical vein endothelial cells. *International journal of oncology*, 48(5), 2007-2014.
150. Mira, L.; Fernandez, M.T.; Santos, M.; Rocha, R.; Florencio, M.H.; Jennings, K.R. Interactions of flavonoids with iron and copper ions: a mechanism for their antioxidant activity. *Free Radic. Res.*, 2002, 36, 1199-208.
151. Pietta, P. G. (2000). Flavonoids as antioxidants. *Journal of natural products*, 63(7), 1035-1042.
152. Sugihara, N.; Arakawa, T.; Ohnishi, M.; Furuno, K. Anti- and pro- oxidative effects of flavonoids on metal-induced lipid hydroperoxide-dependent lipid peroxidation in cultured hepatocytes loaded with alpha-linolenic acid. *Free Radic. Biol. Med.*, 1999, 27, 1313-23.
153. Sahu, S.C. and Gray, G.C. Kaempferol-induced nuclear DNA damage and lipid peroxidation. *Cancer Lett.*, 1994, 85, 159-64.
154. Canada, A.T.; Giannella, E.; Nguyen, T.D.; Mason, R.P. The production of reactive oxygen species by dietary flavonols. *Free Radic. Biol. Med.*, 1990, 9, 441-9.
155. Da Silva, P.M.; Gauche, C.; Gonzaga, L.V.; Costa, A.C.O.; Fett, R. Honey: Chemical composition, stability and authenticity. *Food Chem.* 2016, 196, 309–323.
156. Sak-Bosnar, M.; Sakač, N. Direct potentiometric determination of diastase activity in honey. *Food Chem.* 2012, 135, 827–831.
157. Truchado, P.; Ferreres, F.; Bortolotti, L.; Sabatini, A.G.; Tomás-Barberán, F.A. Nectar flavonol rhamnosides are floral markers of acacia (*Robinia pseudacacia*) honey. *J. Agric. Food Chem.* 2008, 56, 8815–8824.

158. Stecka, H.; Gręda, K.; Pohl, P. Total content and the bioavailable fraction of calcium, copper, iron, magnesium, manganese and zinc in polish commercial bee honeys. *Bromatol. Chem. Toksykol.* 2012, 45, 111–116.
159. De Castro, S.L. Propolis: Biological and pharmacological activities. Therapeutic uses of this bee-product. *ARBS Ann. Rev. Biomed. Sci.* 2001, 3, 49–83.
160. Schnitzler, P.; Neuner, A.; Nolkemper, S.; Zundel, C.; Nowack, H.; Sensch, K.H.; Reichling, J. Antiviral activity and mode of action of propolis extracts and selected compounds. *Phytother. Res.* 2010, 24, 20–28.
161. Li, H., Yang, L., Zhang, Y., & Gao, Z. (2016). Kaempferol inhibits fibroblast collagen synthesis, proliferation and activation in hypertrophic scar via targeting TGF- β receptor type I. *Biomedicine & Pharmacotherapy*, 83, 967-974.
162. Son, D.J.; Lee, J.W.; Lee, Y.H.; Song, H.S.; Lee, C.K.; Hong, J.T. Therapeutic application of anti-arthritis, pain-releasing, and anti-cancer effects of bee venom and its constituent compounds. *Pharmacol. Ther.* 2007, 115, 246–270.
163. Basista, K.; Sodzawiczny, K. Bee pollen—A new natural material, possibilities of use in medicine and cosmetology. *Gazeta Farmaceutyczna* 2011, 12, 30–32.
164. Han, S.M.; Hong, I.P.; Woo, S.O.; Kim, S.G.; Jang, H.R.; Park, K.K. Evaluation of the skin phototoxicity and photosensitivity of honeybee venom. *J. Cosmet. Dermatol.* 2017, 16, 68–75.
165. Bogdanov, S. Nature and origin of the antibacterial substances in honey. *LWT-Food Sci. Technol.* 1997, 30, 748–753.
166. Li, H., Yang, L., Zhang, Y., & Gao, Z. (2016). Kaempferol inhibits fibroblast collagen synthesis, proliferation and activation in hypertrophic scar via targeting TGF- β receptor type I. *Biomedicine & Pharmacotherapy*, 83, 967-974.
167. Kim, H.; Park, S.-Y.; Lee, G. Potential therapeutic applications of bee venom on skin disease and its mechanisms: A literature review. *Toxins* 2019, 11, 374.
168. Burlando, B.; Cornara, L. Honey in dermatology and skin care: A review. *J. Cosm. Dermatol.* 2013, 12, 306–313.
169. Kurek-Górecka, A.M.; Sobczak, A.; Rzepecka-Stojko, A.; Górecki, M.T.; Wardas, M.; Pawłowska-Góral, K. Antioxidant activity of ethanolic fractions of Polish propolis. *Z. Naturforsch. C* 2012, 67, 545–550.

170. M Calderon-Montano, J., Burgos-Morón, E., Pérez-Guerrero, C., & López-Lázaro, M. (2011). A review on the dietary flavonoid kaempferol. *Mini reviews in medicinal chemistry*, 11(4), 298-344.
171. Necas J, Bartosikova L, Brauner P, Kolar J. Hyaluronic acid (hyaluronan): a review. *Veterinarni Medicina* 53, 2008; (8): 397-411.
172. Tuncay I, Ozbek H, Atik B, Ozen S, Akpinar F. Effects of hyaluronic acid on postoperative adhesion of tendo calcaneus surgery: an experimental study in rats. *J Foot Ankle Surg* 2002; 41(2): 104-108.
173. Kaux, J. F., Samson, A., & Crielaard, J. M. (2015). Hyaluronic acid and tendon lesions. *Muscles, ligaments and tendons journal*, 5(4), 264.
174. Tosun, H. B., Gümüştas, S. A., Kom, M., Uludağ, A., Serbest, S., & Eröksüz, Y. (2016). The effect of sodium hyaluronate plus sodium chondroitin sulfate solution on peritendinous adhesion and tendon healing: an experimental study. *Balkan medical journal*, 33(3), 258.
175. Maytin EV. Hyaluronan: More than just a wrinkle filler. *Glycobiology*. 2016;26(6):553-9.
176. Dyer, J. M., & Miller, R. A. (2018). Chronic skin fragility of aging: current concepts in the pathogenesis, recognition, and management of dermatoporosis. *The Journal of clinical and aesthetic dermatology*, 11(1), 13.
177. Recognition, and Management of Dermatoporosis. *J Clin Aesthet Dermatol*. 2018;11(1):13-8. 35. Kaya G, Saurat JH. Dermatoporosis: a chronic cutaneous insufficiency/fragility syndrome. *Clinicopathological features, mechanisms, prevention and potential treatments. Dermatology*. 2007;215(4):284-94.
178. P. Dahiya, and R. Kamal, "Hyaluronic acid: A boon in periodontal therapy," *North American Journal of Medical Sciences*, vol. 5, no. 5, pp. 309–315, 2013.
179. Y.H. Liao Hyaluronan: pharmaceutical characterization and drug delivery *Drug Deliv.*, 12 (2005), pp. 327-342
180. Gabler C, Saß JO, Gierschner S, et al. In vivo evaluation of different collagen scaffolds in an achilles tendon defect model. *Biomed Res Int* 2018;8: 1-11.
181. Bernetti A, Agostini F, Federica A, et al. Hyaluronic Acid Injections in the Management of Tendinopathies. A Descriptive Review. *EC Orthopaedics* 2018; 9.4: 225-232.
182. Syaiful AH, Jefri S. Effect of lyophilized amniotic membrane, hyaluronic acid, and their combination in preventing adhesion after tendon repair in New Zealand

- white rabbits. *Med J Indones* 2014; Vol. 23, No. 2,65-73
183. Lilly SI, Messer TM. Complications after treatment of flexor tendon injuries. *J Am Acad Orthop Surg* 2006; 14(7): 387-96
 184. Jack G. Graham A, Mark L, et al. Biologic and mechanical aspects of tendon fibrosis after injury and repair. *Conn Tiss Res* 2019; 60(1): 10–20.
 185. Derelioğlu N, Noyan S, Sarısözen B, Gedikoğlu Ö. Tendon iyileşmesi ve yapışıklık gelişimi üzerine hyaluronik asit, A ve E vitaminlerinin etkileri. *Acta Ortop Traumatol Turc* 1999; 33: 221-224.
 186. Andarawis-Puri N, Flatow EL. Promoting effective tendon healing and remodeling. *J Orthop Res J Orthop Res*. 2018;36(12):3115-3124.
 187. Huh, Y., Cho, H. J., Yoon, I. S., Choi, M. K., Kim, J. S., Oh, E., ... & Kim, D. D. (2010). Preparation and evaluation of spray-dried hyaluronic acid microspheres for intranasal delivery of fexofenadine hydrochloride. *European Journal of Pharmaceutical Sciences*, 40(1), 9-15.
 188. Lim, S. T., Martin, G. P., Berry, D. J., & Brown, M. B. (2000). Preparation and evaluation of the in vitro drug release properties and mucoadhesion of novel microspheres of hyaluronic acid and chitosan. *Journal of Controlled Release*, 66(2-3), 281-292
 189. Wen, H., Park, K. 2011-b.Preformulation consideration for drugs in oral controlled release formulation. *Oral Controlled Release Formulation Design and Drug Delivery: Theory to Practice*. John Wiley & Sons, Inc., pp. 47-71, New Jersey.
 190. Mazzitelli et al., Preparation of cell-encapsulation devices in confined microenvironment, *Advanced Drug Delivery Reviews* 65 1533–1555, 2013
 191. Lee, K.Y. and D.J. Mooney, Alginate: properties and biomedical applications. *Prog Polym Sci*. 37(1): p. 106-126, 2012.
 192. George, M. ve Abraham, T.E., (2006). "Polyionic hydrocolloids for the intestinal delivery of protein drugs: alginate and chitosan—a review", *Journal of controlled release*, 114: 1-14.
 193. Wen, H., Park, K. 2011-a.Preformulation consideration for drugs in oral controlled release formulation. *Oral Controlled Release Formulation Design and Drug Delivery: Theory to Practice*. John Wiley & Sons, Inc., pp. 47-71, New Jersey.
 194. Rehm, B. H. 2009. Alginate-based blends and nano/microbeads. *Alginates*: 79

- Biology and Applications. Springer Science & Business Media, pp. 175- 211, New York.
195. Bhardwaj, T. R., Kanwar, M., Lal, R., Gupta, A. 2000. Natural gums and modified natural gums as sustained-release carriers. *Drug Development and Industrial Pharmacy*, 26 (10): 1025-1038.
 196. Orive, G., S. Ponce, R.M. Hernandez, A.R. Gascon, M. Igartua, and J.L. Pedraz, Biocompatibility of microcapsules for cell immobilization elaborated with different type of alginates. *Biomaterials*. 23(18): p. 3825-3831, 2002.
 197. Cohen, D.L., E. Malone, H. Lipson, and L.J. Bonassar, Direct freeform fabrication of seeded hydrogels in arbitrary geometries. *Tissue Engineering*. 12(5): p. 1325-1335, 2006.
 198. Hwang, C.M., B. Ay, D.L. Kaplan, J.P. Rubin, K.G. Marra, A. Atala, J.J. Yoo, and S.J. Lee, Assessments of injectable alginate particle-embedded fibrin hydrogels for soft tissue reconstruction. *Biomedical Materials*. 8(1), 2013.
 199. Anderson, J. M., & Shive, M. S. (1997). Biodegradation and biocompatibility of PLA and PLGA microspheres. *Advanced drug delivery reviews*, 28(1), 5-24.
 200. Shim, M., Shi Kam, N. W., Chen, R. J., Li, Y., & Dai, H. (2002). Functionalization of carbon nanotubes for biocompatibility and biomolecular recognition. *Nano letters*, 2(4), 285-288.
 201. Shukla, R., Bansal, V., Chaudhary, M., Basu, A., Bhonde, R. R., & Sastry, M. (2005). Biocompatibility of gold nanoparticles and their endocytotic fate inside the cellular compartment: a microscopic overview. *Langmuir*, 21(23), 10644-10654.
 202. Black, J. (2005). *Biological performance of materials: fundamentals of biocompatibility*. Crc Press.
 203. Gundarov, V. P., & Kavalero, G. I. (2001). Development of standardization and certification of the quality of medical devices. *Meditinskaya tekhnika*, (3), 4-8.
 204. He, Q., & Shi, J. (2011). Mesoporous silica nanoparticle based nano drug delivery systems: synthesis, controlled drug release and delivery, pharmacokinetics and biocompatibility. *Journal of Materials Chemistry*, 21(16), 5845-5855.
 205. Naha, P. C., Mukherjee, S. P., & Byrne, H. J. (2018). Toxicology of engineered nanoparticles: focus on poly (amidoamine) dendrimers. *International journal of*

- environmental research and public health, 15(2), 338.
206. Uboldi, C., Giudetti, G., Broggi, F., Gilliland, D., Ponti, J., & Rossi, F. (2012). Amorphous silica nanoparticles do not induce cytotoxicity, cell transformation or genotoxicity in Balb/3T3 mouse fibroblasts. *Mutation Research/Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis*, 745(1-2), 11-20.
 207. Kasper, J., Hermanns, M. I., Bantz, C., Maskos, M., Stauber, R., Pohl, C., ... & Kirkpatrick, J. C. (2011). Inflammatory and cytotoxic responses of an alveolar-capillary coculture model to silica nanoparticles: comparison with conventional monocultures. *Particle and fibre toxicology*, 8(1), 1-16.
 208. Kasper, J., Hermanns, M. I., Bantz, C., Maskos, M., Stauber, R., Pohl, C., ... & Kirkpatrick, J. C. (2011). Inflammatory and cytotoxic responses of an alveolar-capillary coculture model to silica nanoparticles: comparison with conventional monocultures. *Particle and fibre toxicology*, 8(1), 1-16.
 209. Sjögren, G., Sletten, G., & Dahl, J. E. (2000). Cytotoxicity of dental alloys, metals, and ceramics assessed by millipore filter, agar overlay, and MTT tests. *The Journal of prosthetic dentistry*, 84(2), 229-236.
 210. Jin, C. Y., Zhu, B. S., Wang, X. F., & Lu, Q. H. (2008). Cytotoxicity of titanium dioxide nanoparticles in mouse fibroblast cells. *Chemical research in toxicology*, 21(9), 1871-1877.
 211. Gao, J., Wang, S., Jin, M., & Yan, X. (2013). In vitro cytotoxicity test of medical ultrasonic couplant. *Zhongguo yi Liao qi xie za zhi= Chinese Journal of Medical Instrumentation*, 37(3), 210-212
 212. ŞEKEROĞLU, Z. A., & Şekeroğlu, V. (2011). Genetik toksisite testleri. *TÜBAV Bilim Dergisi*, 4(3), 221-229.
 213. Maron, D. M., & Ames, B. N. (1983). Revised methods for the Salmonella mutagenicity test. *Mutation Research/Environmental Mutagenesis and Related Subjects*, 113(3-4), 173-215.
 214. McCann, J., Choi, E., Yamasaki, E., & Ames, B. N. (1975). Detection of carcinogens as mutagens in the Salmonella/microsome test: assay of 300 chemicals. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 72(12), 5135-5139.
 215. Mortelmans, K., Zeiger, E. 2000. The Ames Salmonella/microsome mutagenicity assay. *Mutat Res* 455: 29-60

216. Ames, B.N., Lee, F.D., Durston, W.E. 1973. An improved bacterial test system for the detection and classification of mutagens and carcinogens Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America 70, 782- 786.
217. Claxton, L.D., Allen, J., Auletta, A., Mortelmans, K., Nestmann, E., Zeiger, E. 1987. Guide for Salmonella typhimurium / mammalian microsome test for bacterial mutagenicity. Mutation Research 189, 83-91.
218. Levin, D. E., Yamasaki, E., Ames, B. N. 1982. Salmonella tester strain, TA 97 for the detection of frameshift mutagens. A run of cytosines as a mutational hotspot. Mutat. Res 94, 315-330.
219. Fenech M. (1993) "The Cytokinesis-Block Micronucleus Technique and its Application To Genotoxicity Studies in Human Populations", Environmental Health Perspectives Supplements; 101(3): 101-7.
220. Almasy Z., Krepinski A.B. Et Al; (1987), "The Present State And Perspectives Of Micronucleus Assay In Radiation Protection. A Review" Applied Radiation and Isotopes, 38: 241-249
221. Fenech M., Holland N., Chang W.P. Et Al; (1999), "The Human Micronucleus Project-An International Collaborative Study on the Use Of The Micronucleus Technique For Measuring DNA Damage in Humans", Mutation Research, 428: 271-283.
222. Carraro, P., Servidio, G., & Plebani, M. (2000). Hemolyzed specimens: a reason for rejection or a clinical challenge?. Clinical chemistry, 46(2), 306-308.
223. Heireman L, Van Geel P, Musger L, Heylen E, Uyttenbroeck W, Mahieu B. Causes, consequences and management of sample hemolysis in the clinical laboratory. Clin Biochem [Internet]. 2017;50(18):1317–22.
224. Lippi, G., Blanckaert, N., Bonini, P., Green, S., Kitchen, S., Palicka, V., ... & Plebani, M. (2008). Haemolysis: an overview of the leading cause of unsuitable specimens in clinical laboratories. Clinical chemistry and laboratory medicine, 46(6), 764-772.
225. Muller-Eberhard U, Javid J, Liem HH, et al. Plasma concentrations of hemopexin, haptoglobin and heme in patients with various hemolytic diseases. Blood 1968;32:811-815.

226. Lippi, G., Cervellin, G., Favaloro, E. J., & Plebani, M. (2012). In vitro and in vivo hemolysis: an unresolved dispute in laboratory medicine (Vol. 4). Walter De Gruyter.
227. Nakaoka, D., Sugimoto, T., Kobayashi, T., Yamaguchi, T., Kobayashi, A., & Chihara, K. (2000). Evaluation of changes in bone density and biochemical parameters after parathyroidectomy in primary hyperparathyroidism. *Endocrine journal*, 47(3), 231-237.
228. Bain, B. J., Bates, I., & Laffan, M. A. (2016). *Dacie and Lewis Practical Haematology E-Book: Expert Consult: Online and Print*. Elsevier Health Sciences.
229. Gosain, A., & DiPietro, L. A. (2004). Aging and wound healing. *World journal of surgery*, 28(3), 321-326.
230. Ayyıldız, A. (2020). Erkek Yaşlılarda Üretra Darlığı ve Üretroplastiler. *Journal of Academic Research in Medicine*, 10(3).
231. Metz M, Ohanyan T, Church MK, Maurer M. Retreatment with omalizumab results in rapid remission in chronic spontaneous and inducible urticaria. *JAMA Dermatol*. 2014;150(3):288-290.
232. Metz M, Ohanyan T, Church MK, Maurer M. Retreatment with omalizumab results in rapid remission in chronic spontaneous and inducible urticaria. *JAMA Dermatol*. 2014;150(3):288-290.
233. Wershil BK, Furuta GT, Lavigne JA, Choudhury AR, Wang ZS, Galli SJ. Dexamethasone and cyclosporin A suppress mast cell-leukocyte cytokine cascades by multiple mechanisms. *Int Arch Allergy Immunol*. 1995;107:323-324.
234. Harrison CA, Bastan R, Peirce MJ, Munday MR, Peachell PT. Role of calcineurin in the regulation of human lung mast cell and basophil function by cyclosporine and FK506. *Br J Pharmacol*. 2007;150(4):509-518.
235. http://www.tokra.com.tr/hemostaz_-821_tr_lc.html Erişim Tarihi:04.06.2021
236. Turan, G. Koagülasyon Mekanizmaları Ve Antikoagülan İlaçlar. *Boğaziçi Tıp Dergisi*; 2016; 3(2): 71-75
237. Wesche DE, Lomas-Neira JL, Perl M, Chung CS, Ayala A. Leukocyte apoptosis and its significance in sepsis and shock. *J Leukoc Biol*. 2005;78(2):325-337.

238. Deuel, T. F., Keim, P. S., Farmer, M., & Henrikson, R. L. (1977). Amino acid sequence of human platelet factor 4. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 74(6), 2256-2258.
239. Handin, R. I., & Cohen, H. J. (1976). Purification and binding properties of human platelet factor four. *Journal of Biological Chemistry*, 251(14), 4273-4282.
240. Niewiarowski, S., Poplawski, A., Lipinski, B., & Farbiszewski, R. (1968). The release of platelet clotting factors during aggregation and viscous metamorphosis. *Exp. Biol. Med*, 3, 121.
241. Levine, S. P., & Wohl, H. (1976). Human platelet factor 4: Purification and characterization by affinity chromatography. Purification of human platelet factor 4. *Journal of Biological Chemistry*, 251(2), 324-328.
242. Johnson, S. A. (1961). *International Symposium: Blood Platelets* (Vol. 10). Little, Brown.
243. Deuel, T. F., Keim, P. S., Farmer, M., & Henrikson, R. L. (1977). Amino acid sequence of human platelet factor 4. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 74(6), 2256-2258.
244. Gear, A. R., & Camerini, D. (2003). Platelet chemokines and chemokine receptors: linking hemostasis, inflammation, and host defense. *Microcirculation*, 10(3-4), 335-350.
245. Herd, C. M., & Page, C. P. (1994). Pulmonary immune cells in health and disease: platelets. *European Respiratory Journal*, 7(6), 1145-1160.
246. O'Sullivan, B. P., & Michelson, A. D. (2006). The inflammatory role of platelets in cystic fibrosis. *American journal of respiratory and critical care medicine*, 173(5), 483-490.
247. Luzzatto, G., Cella, G., Boschetto, P., & Fabbri, L. (1993). Lack of increase or reduction in circulating platelet factor 4 and heparin-releasable platelet factor 4 in symptomatic patients with asthma. *Journal of lipid mediators*, 7(2), 151-154.
248. Schwarz, K. B., Rosensweig, J., Sharma, S., Jones, L., Durant, M., Potter, C., & Narkewicz, M. R. (2003). Plasma markers of platelet activation in cystic fibrosis liver and lung disease. *Journal of pediatric gastroenterology and nutrition*, 37(2), 187-191.

249. Zhan, T., Wei, T., Dong, L., Wang, Q., Wu, Z., Yan, Q., ... & Wu, M. (2020). Cangrelor alleviates bleomycin-induced pulmonary fibrosis by inhibiting platelet activation in mice. *Molecular immunology*, 120, 83-92.
250. Jaillon S, Galdiero MR, Del Prete D, Cassatella MA, Garlanda C, Mantovani A. Neutrophils in innate and adaptive immunity. *Semin Immunopathol.* 2013;35(4):377-394.
251. Coşkun BN, Öksüz MF, Ermurat S, Tufan AN, Oruçoğlu N, Doğan A, et al. Neutrophil lymphocyte ratio can be a valuable marker in defining disease activity in patients who have started anti-tumor necrosis factor (TNF) drugs for ankylosing spondylitis. *Eur J Rheumatol.* 2014;1(3):101-105.
252. Doring, G. (1994). The role of neutrophil elastase in chronic inflammation. *American journal of respiratory and critical care medicine*, 150(6), S114.
253. Moore, S., Pepper, D. S., & Cash, J. D. (1975). The isolation and characterisation of a platelet-specific β -globulin (β -thromboglobulin) and the detection of antiurokinase and antiplasmin released from thrombin-aggregated washed human platelets. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Protein Structure*, 379(2), 360-369.
254. Fareed, J., Bick, R. L., Squillaci, G., Walenga, J. M., & Bermes Jr, E. W. (1983). Molecular markers of hemostatic disorders: implications in the diagnosis and therapeutic management of thrombotic and bleeding disorders. *Clinical chemistry*, 29(9), 1641-1658.
255. Kirkwood, B. R., & Sterne, J. A. (2010). *Essential medical statistics*. John Wiley & Sons. page 121-1233
256. El-Kassaby, A. W., Retik, A. B., Yoo, J. J., & Atala, A. (2003). Urethral stricture repair with an off-the-shelf collagen matrix. *The Journal of urology*, 169(1), 170-173.
257. Ayyildiz, A., Nuhoglu, B., GüLERKAYA, B., Caydere, M., ÜSTÜN, H., Germiyanoglu, C., & Erol, D. (2004). Effect of intraurethral Mitomycin- C on healing and fibrosis in rats with experimentally induced urethral stricture. *International Journal of Urology*, 11(12), 1122-1126.
258. Chong, T., Fu, D. L., Li, H. C., Zhang, H. B., Zhang, P., Gan, W. M., & Wang, Z. M. (2011). Rapamycin inhibits formation of urethral stricture in

- rabbits. *Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics*, 338(1), 47-52.
259. Wang, Z., Li, Q., Wang, P., & Yang, M. (2020). Biodegradable drug-eluting urethral stent in limiting urethral stricture formation after urethral injury: An experimental study in rabbit. *Journal of Bioactive and Compatible Polymers*, 35(4-5), 378-388.
 260. Aoki, A., & Gutierrez, L. S. (1967). A simple toluidine blue—basic fuchsin stain for spermatozoa in epoxy sections. *Stain technology*, 42(6), 307-310.
 261. Betriu, N., & Semino, C. E. (2018). Development of a 3D co-culture system as a cancer model using a self-assembling peptide scaffold. *Gels*, 4(3), 65.
 262. Hutmacher, D. W. (2001). Scaffold design and fabrication technologies for engineering tissues—state of the art and future perspectives. *Journal of Biomaterials Science, Polymer Edition*, 12(1), 107-124.
 263. Carrow, J. K., Kerativitayanan, P., Jaiswal, M. K., Lokhande, G., & Gaharwar, A. K. (2015). Polymers for bioprinting. In *Essentials of 3D biofabrication and translation* (pp. 229-248). Academic Press.
 264. Zhou, Y. P., Zhang, S. L., Cheng, D., Li, H. R., Tang, Z. M., Xue, J., ... & Zhao, L. (2013). Preliminary exploration on anti-fibrosis effect of kaempferol in mice with *Schistosoma japonicum* infection. *European Journal of Inflammation*, 11(1), 161-168.
 265. Ren, J., Lu, Y., Qian, Y., Chen, B., Wu, T., & Ji, G. (2019). Recent progress regarding kaempferol for the treatment of various diseases. *Experimental and Therapeutic Medicine*, 18(4), 2759-2776.
 266. Xu, T., Huang, S., Huang, Q., Ming, Z., Wang, M., Li, R., & Zhao, Y. (2019). Kaempferol attenuates liver fibrosis by inhibiting activin receptor–like kinase 5. *Journal of cellular and molecular medicine*, 23(9), 6403-6410.
 267. Kumar, V., Abbas, A. K., & Aster, J. C. (2014). Robbins temel patoloji. Nobel Tıp Kitabevleri.
 268. Hochberg D, Johnson CW, Chen J, Cohen D, Stern J, Vaughan ED Jr, Poppas D, Felsen D. Interstitial fibrosis of unilateral ureteral obstruction is exacerbated in kidneys of mice lacking the gene for inducible nitric oxide synthase. *Lab Invest*. 2000 Nov; 80(11): 1721-8.

269. Morrissey JJ, Ishidoya S, McCracken R, Klahr S. Nitric oxide generation ameliorates the tubulointerstitial fibrosis of obstructive nephropathy. *J Am Soc Nephrol.* 1996 Oct; 7(10): 2202-12.
270. Diamond JR, van Goor H, Ding G, Engelmyer E. Myofibroblasts in experimental hydronephrosis. *Am J Pathol.* 1995 Jan; 146(1): 121-9.
271. Desmoulière A, Geinoz A, Gabbiani F, Gabbiani G. Transforming growth factor-beta 1 induces alpha-smooth muscle actin expression in granulation tissue myofibroblasts and in quiescent and growing cultured fibroblasts. *J Cell Biol.* 1993 Jul; 122(1): 103-11.
272. Kawada N, Moriyama T, Ando A, Fukunaga M, Miyata T, Kurokawa K, Imai E, Hori M. Increased oxidative stress in mouse kidneys with unilateral ureteral obstruction. *Kidney Int.* 1999 Sep; 56(3): 1004-13.
273. Shi, Z., Wang, Q., & Jiang, D. (2020). The preventative effect of bone marrow-derived mesenchymal stem cell exosomes on urethral stricture in rats. *Translational andrology and urology*, 9(5), 2071.
274. Feng, H., Cao, J., Zhang, G., & Wang, Y. (2017). Kaempferol attenuates cardiac hypertrophy via regulation of ASK1/MAPK signaling pathway and oxidative stress. *Planta medica*, 83(10), 837-845.
275. Miyajima A, Chen J, Lawrence C, Ledbetter S, Soslow RA, Stern J, Jha S, Pigato J, Lemer ML, Poppas DP, Vaughan ED, Felsen D. Antibody to transforming growth factor-beta ameliorates tubular apoptosis in unilateral ureteral obstruction. *Kidney Int.* 2000 Dec; 58(6): 2301-13.
276. Ma LJ, Nakamura S, Whitsitt JS, Marcantoni C, Davidson JM, Fogo AB. Regression of sclerosis in aging by an angiotensin inhibition- induced decrease in PAI-1. *Kidney Int.* 2000 Dec; 58(6): 2425-36.
277. Bhaskaran M, Reddy K, Radhakrishanan N, Franki N, Ding G, Singhal PC. Angiotensin II induces apoptosis in renal proximal tubular cells. *Am J Physiol Renal Physiol.* 2003 May; 284(5): F955-65.
278. Liapis H, Yu H, Steinhardt GF. Cell proliferation, apoptosis, Bcl-2 and Bax expression in obstructed opossum early metanephroi. *J Urol* 2000 Aug; 164(2): 511-7.
279. Wang, Y., Tang, C., & Zhang, H. (2015). Hepatoprotective effects of kaempferol 3-O-rutinoside and kaempferol 3-O-glucoside from *Carthamus tinctorius* L. on

- CCl₄-induced oxidative liver injury in mice. *Journal of food and drug analysis*, 23(2), 310-317.
280. Rassis, D. K., Saguy, I. S., & Nussinovitch, A. (2002). Collapse, shrinkage and structural changes in dried alginate gels containing fillers. *Food hydrocolloids*, 16(2), 139-151.
 281. Rowe, R. C., Sheskey, P., & Quinn, M. (2009). *Handbook of pharmaceutical excipients*. Libros Digitales-Pharmaceutical Press.
 282. Ely, A., Baudu, M., Basly, J. P., & Kankou, M. O. S. A. O. (2009). Copper and nitrophenol pollutants removal by Na-montmorillonite/alginate microcapsules. *Journal of hazardous materials*, 171(1-3), 405-409.
 283. Rowe, R. C., Sheskey, P., & Quinn, M. (2009). *Handbook of pharmaceutical excipients*. Libros Digitales-Pharmaceutical Press.
 284. Réeff, J., Gaignaux, A., Goole, J., De Vriese, C., & Amighi, K. (2013). New sustained-release intraarticular gel formulations based on monolein for local treatment of arthritic diseases. *Drug development and industrial pharmacy*, 39(11), 1731-1741.
 285. Nuininga, J. E., Koens, M. J., Tiemessen, D. M., Oosterwijk, E., Daamen, W. F., Geutjes, P. J., ... & Feitz, W. F. (2010). Urethral reconstruction of critical defects in rabbits using molecularly defined tubular type I collagen biomatrices: key issues in growth factor addition. *Tissue Engineering Part A*, 16(11), 3319-3328.
 286. Farrell, M. R., Sherer, B. A., & Levine, L. A. (2015). Visual internal urethrotomy with intralesional mitomycin C and short-term clean intermittent catheterization for the management of recurrent urethral strictures and bladder neck contractures. *Urology*, 85(6), 1494-1500.
 287. DEVI, Kasi Pandima, et al. Kaempferol and inflammation: From chemistry to medicine. *Pharmacological research*, 2015, 99: 1-10.
 288. RAJENDRAN, Peramaiyan, et al. Kaempferol, a potential cytostatic and cure for inflammatory disorders. *European journal of medicinal chemistry*, 2014, 86: 103-112.
 289. SUZUKI, Takuya; TANABE, Soichi; HARA, Hiroshi. Kaempferol enhances intestinal barrier function through the cytoskeletal association and expression of tight junction proteins in Caco-2 cells. *The Journal of nutrition*, 2011, 141.1: 87-94.

290. Velloso, José Carlos Rebuglio, Et Al. Antioxidant And Cytotoxic Studies For Kaempferol, Quercetin And Isoquercitrin. *Eclética Química*, 2011, 36: 07-20.
291. B Asgary, S.; Naderi, G. H.; Askari, N. Protective Effect Of Flavonoids Against Red Blood Cell Hemolysis By Free Radicals. *Experimental & Clinical Cardiology*, 2005, 10.2: 88.





ÖZGEÇMİŞ

- Adı-Soyadı** : Büşra MORAN BOZER
- Doğum Tarihi ve yeri** :
- Yabancı Dil** : İngilizce
- Eğitim Durumu** : (Kurum ve yıl)
- Lisans** : Kırıkkale Üniversitesi/ Fen Edebiyat Fakültesi / Biyoloji
A.B.D. (2008-2012)
- Yüksek Lisans** : Kırıkkale Üniversitesi/ Fen Bilimleri Enstitüsü / Biyoloji
A.B.D. (2012-2014)
- Doktora** : Kırıkkale Üniversitesi/ Fen Bilimleri Enstitüsü / Biyoloji
A.B.D. (2014-2021)
- Çalıştığı Kurum** : Kırıkkale Üniversitesi Bilimsel ve Teknolojik
Araştırmalar Uygulama ve Araştırma merkezi (2013-
2015)
Hitit Üniversitesi Bilimsel Teknik Uygulama ve
Araştırma Merkezi (2015- Halen)
- Yayınlar (SCI)** : Karadag, A. S., Uzunçakmak, T. K., Ozkanli, S.,
Oguztuzun, S., Moran, B., Akbulak, O., ... & Akdeniz, N.
(2017). An investigation of cytochrome p450 (CYP) and
glutathione S- transferase (GST) isoenzyme protein
expression and related interactions with phototherapy in
patients with psoriasis vulgaris. *International journal of
dermatology*, 56(2), 225-231.
Simsek, E., Kilic, M., Simsek, G., Oguztuzun, S., Moran,
B., Saritas, A., & Ulus, A. T. (2015). The effect of
CYP1A1 and GSTP1 isozymes on the occurrence of
aortic aneurysms. *The Thoracic and cardiovascular
surgeon*, 63(02), 152-157.

Yildiz, A., Demir, C., Baykal, A., Atav, R., Bayramol, D. V., Ağirgan, Ö., ... & Bozer, B. M. (2018).

WITHDRAWN: Fe₃O₄@ HA@ Ag magnetic nanofiber: synthesis, characterization and investigation of its antimicrobial activity and biocompatibility.

Bulus, H., Oguztuzun, S., Güler Simsek, G., Kilic, M., Ada, A. O., Göl, S., ... & Iscan, M. (2019). Expression of CYP and GST in human normal and colon tumor tissues. *Biotechnic & Histochemistry*, 94(1), 1-9.

Takci, Z., Gunes Bilgili, S., Kilic, M., Oguztuzun, S., Bozer, B., Guler Simsek, G., ... & Karadag, A. S. (2020). Expressions of glutathione S- transferase alpha, mu, pi, and theta in the skin samples of patients with acne rosacea. *Journal of Cosmetic Dermatology*, 19(8), 2070-2075.

Karadag, R., Bayram, N., Oguztuzun, S., Bayramlar, H., Bozer, B., Simsek, G., & Rapuano, C. J. (2017). An investigation of human beta-defensins and cathelicidin expression in patients with pterygium. *Arquivos brasileiros de oftalmologia*, 80, 277-280.

Araştırma Alanları : Hücre kültürü, in vitro biyouyumluluk testleri, deney hayvanları, detoksifikasyon enzimleri, biyomalzeme, doku mühendisliği, antikanser aktivite, mikrobiyoloji