

**T.C.
HACETTEPE ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ**

**KORNEA ONARIMINDA KULLANILMAK ÜZERE
ANTIİNFLAMATUVAR ETKİN MADDE İÇEREN
DESTEK MATRİKS (DOKU İSKELESİ)
FORMÜLASYONLARININ TASARIMI VE
DEĞERLENDİRİLMESİ**

Ecz. Seren KAYIRAN

**Farmasötik Teknoloji Programı
YÜKSEK LİSANS TEZİ**

**ANKARA
2010**

**T.C.
HACETTEPE ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ**

**KORNEA ONARIMINDA KULLANILMAK ÜZERE
ANTIİNFLAMATUVAR ETKİN MADDE İÇEREN
DESTEK MATRİKS (DOKU İSKELESİ)
FORMÜLASYONLARININ TASARIMI VE
DEĞERLENDİRİLMESİ**

Ecz. Seren KAYIRAN

**Farmasötik Teknoloji Programı
YÜKSEK LİSANS TEZİ**

**TEZ DANIŞMANI
Prof. Dr. Nurşen ÜNLÜ**

**ORTAK TEZ DANIŞMANI
Yrd. Doç. Dr. Sibel PEHLİVAN**

**ANKARA
2010**

Sağlık Bilimleri Enstitüsü Müdürlüğü'ne;

Bu çalışma jürimiz tarafından Farmasötik Teknoloji Programında Yüksek Lisans Tezi olarak kabul edilmiştir.

Jüri Başkanı:
(Tez Danışmanı)

Prof. Dr. Nurşen Ünlü
Hacettepe Üniversitesi



Üye:

Prof. Dr. Süeda Hekimoğlu
Hacettepe Üniversitesi



Üye:

Prof. Dr. Emir Baki Denkbaş
Hacettepe Üniversitesi



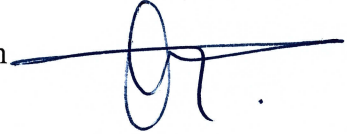
Üye:

Doç. Dr. Sinan Yürüker
Hacettepe Üniversitesi



Üye:

Yrd. Doç. Dr. Sibel Pehlivan
Hacettepe Üniversitesi



ONAY:

Bu tez, Hacettepe Üniversitesi Lisansüstü Eğitim-Öğretim ve Sınav Yönetmeliği' nin ilgili maddeleri uyarınca yukarıdaki jüri üyeleri tarafından uygun görülmüş ve Enstitü Yönetim Kurulu kararıyla kabul edilmiştir.



Prof. Dr. Hakan S. Orer

Enstitü Müdürü

TEŞEKKÜR

Tez çalışmalarım sırasında bilimsel bilgilerini benimle paylaşan ve her zaman her türlü konuda desteğini gördüğüm tez danışmanı değerli hocam Sayın Prof. Dr. Nurşen Ünlü' ye, bilimsel katkılarını ve desteğini benden esirgemeyen, çalışmalarımın tüm aşamalarında bana her konuda destek gösteren ve hep yanımda olan değerli hocam Sayın Yrd. Doç. Dr. Sibel Pehlivan' a,

Tez çalışmalarımın planlanmasında ve yürütülmesinde bilimsel katkılarını ve desteğini esirgemeyen Sayın Prof. Dr. Emir Baki Denkbaş' a, Sayın Dr. Hasan Basri Çakmak' a, hücre kültürü çalışmalarının planlanmasında ve yürütülmesinde bilimsel katkılarını ve desteğini esirgemeyen değerli hocam Sayın Doç. Dr. İmran Vural' a, Sayın Doç. Dr. Sinan Yürüker' e, Sayın Dr. Murat Akıncı' ya ve Sayın Uzm. Biyolog Murat Demirbilek' e,

Araştırmamı gerçekleştirmemde proje desteği için Hacettepe Üniversitesi Bilimsel Araştırmalar Birimi' ne,

Çalışmam sırasında arkadaşlıklarıyla zor günlerimi kolaylaştıran başta Ecz. Süheyla Toprak, Ecz. Merve Günbeyaz, Ecz. (B.U.) Elçin Aktaş, Ecz. (B.U.) Burçin Yavuz, Ecz. (B.U.) Seçil Çaban, Ecz. Harika Öcal, Ecz. Serhat Kozlu, Ecz. Kıvılcım Öztürk, Ecz. Nazlı Erdoğan, Ecz. (B.U.) Tuğba Gülsün, Ecz. (B.U.) Can Sarısözen, Dr. Ecz. Pelin Aksungur Aydın, Dr. Ecz. Sibel Şamdancıoğlu, Dr. Ecz. Yasemin Çırpanlı olmak üzere Farmasötik Teknoloji Anabilim Dalı' nın bütün yüksek lisans ve doktora öğrencilerine, sekreterlerine, teknisyen ve hizmetlilerine, Nanoteknoloji ve Nanotıp Anabilim Dalı yüksek lisans ve doktora öğrencilerine,

Tez çalışmamın her aşamasında bana destek olan, bütün zorlukları benimle karşılayan, her zaman yanımda olan, her an sevgisini ve desteğini hissettiren değerli aileme, göstermiş oldukları sabır, anlayış ve her türlü destek için başta Ecz. Süheyla Toprak ve Ecz. Merve Günbeyaz olmak üzere bütün arkadaşlarıma tüm kalbimle teşekkür eder, şükranlarımı sunarım.

ÖZET

Kayıran, S. Kornea Onarımında Kullanılmak Üzere Antiinflamatuvar Etkin Madde İçeren Destek Matriks (Doku İskelesi) Formülasyonlarının Tasarımı ve Değerlendirilmesi, Hacettepe Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü Farmasötik Teknoloji Programı Yüksek Lisans Tezi, Ankara, 2010.

Korneal lezyonlar, korneada meydana gelen hastalıklar veya termal/kimyasal yanık gibi etmenler sonucunda ortaya çıkan hasarlar olup korneada şiddetli inflamasyona neden olmaktadır. Korneanın yüzeyi sürekli olarak bazal limbal epitelde bulunan kök hücreler tarafından üretilen epitel hücreler ile yenilediğinden, yüzeysel epitelde meydana gelen hafif bir hasar klasik tedavi desteği ile iyileşebilir. Ancak korneada meydana gelen hasar geniş bir alanı etkilemişse korneanın fonksiyonunu tekrar kazanabilmesi için kornea dokusu transplantasyonu gereklidir. Transplantasyon işleminde donör bulma ile ilgili problemler ve işlemin dezavantajları nedeniyle ciddi kısıtlamalar olması, kornea hasarlarının doku mühendisliği yöntemleriyle tedavi edilmesi gerekliliğini ortaya çıkarmaktadır. Bununla birlikte korneada meydana gelen inflamasyonun tedavisi için naproksen sodyum gibi non-steroidal antiinflamatuvar ilaçlar sıklıkla kullanılmaktadır. Bu amaçla bu tez kapsamında PLGA kullanılarak, antiinflamatuvar bir ilaç olan NS yüklü doku iskeleleri hazırlanmış ve bu doku iskeleleri kolajen veya poli-L-lizin ile kaplanmıştır. Formülasyon çalışmaları tamamlandıktan sonra hazırlanan doku iskeleleri üzerinde çeşitli karakterizasyon çalışmaları yapılmış ve formülasyonların salım özellikleri değerlendirilmiştir. Son olarak hazırlanan doku iskelelerinin hücre kültür çalışmaları yapılarak formülasyonların kornea epitel hücreleri üzerindeki sitotoksik etkileri ve hücrelerin proliferasyon özellikleri incelenmiştir. Bu çalışmanın sonucu olarak NS yüklü PLGA doku iskelelerinin ciddi hasar görmüş kornea dokusunun rejenerasyonunda ümit vaat edici sistemler olduğu tespit edilmiştir.

Anahtar Kelimeler: Poli(laktik-ko-glikolik asit), naproksen sodyum, doku iskelesi, doku mühendisliği.

Destekleyen Kurumlar: H.Ü.B.A.B. kapsamlı araştırma projesi (0801301004)

H.Ü.B.A.B. destek projesi (09D06301002)

ABSTRACT

Kayiran, S. Formulation and Evaluation of Antiinflammatory Drug Loaded Scaffolds for the Regeneration of Cornea, Hacettepe University Health Sciences Institute, Master Thesis in Pharmaceutical Technology Program, Ankara, 2010. Corneal lesions are the damages that occur as a result of corneal diseases or thermal/chemical burns and cause to severe inflammation. The surface of the cornea is constantly replaced with epithelial cells produced by the stem cells located in basal limbal epithelium, so the mild superficial epithelial damage can be cured with conventional treatment. However, if the damage occurred in the cornea affects larger area, corneal tissue transplant is needed to regain normal function and structure of the cornea. Difficulties in finding the donor and the complications of transplant in procedures limit the treatment, therefore the need for treatment of corneal damages with corneal tissue engineering techniques revealed. In addition, non-steroidal antiinflammatory drugs such as naproxen sodium are commonly used for the treatment of inflammation in cornea. For this reason, in this thesis, NS loaded scaffolds have been prepared with PLGA and these scaffolds have been coated with collagen and poly-l-lysine. After completion of the formulation studies, various characterization studies were performed on scaffolds and the drug release properties of the scaffolds were evaluated. Finally, the cell culture studies were performed and cytotoxic effects of the formulations on corneal epithelial cells and proliferation properties of the cells were investigated. As a result of this study, NS loaded PLGA scaffolds have been promising for the regeneration of severely damaged corneal tissue.

Keywords: Poly(lactide-co-glycolide), naproxen sodium, scaffold, tissue engineering.

Supported by: H.Ü.B.A.B. research project (0801301004)

H.Ü.B.A.B. support project (09D06301002)

İÇİNDEKİLER

	Sayfa
ONAY SAYFASI	iii
TEŞEKKÜR	iv
ÖZET	v
ABSTRACT	vi
İÇİNDEKİLER	vii
SİMGELER ve KISALTMALAR DİZİNİ	xiii
ŞEKİLLER DİZİNİ	xv
TABLolar DİZİNİ	xix
1. GİRİŞ	1
2. GENEL BİLGİLER	3
2.1. Gözün Anatomisi ve Fizyolojisi	3
2.1.1 Kornea	4
2.1.2. Konjunktiva	6
2.2. Oküler Yüzey Hastalıkları	7
2.2.1. Limbal Kök Hücre Eksikliği	9
2.2.2. Otoimmün Hastalıklar	10
2.3. Oküler Yüzey Hastalıklarında Tedavi Yaklaşımları	11
2.3.1. Konjunktival Limbal Otogreft Transplantasyonu (CLAU)	11
2.3.2. Canlı Donör Kaynaklı Konjunktival Limbal Homogreft Transplantasyonu (LR-CLAL)	12
2.3.3. Kadavra Kaynaklı Keratolimbal Homogreft Transplantasyonu (KLAL)	12
2.3.4. Kombine Konjunktival ve Keratolimbal Homogreft Transplantasyonu (C-KLAL)	12
2.3.5. Amniyotik Membran Transplantasyonu	12
2.3.6. Doku Mühendisliği	13
2.4. Doku İskeleleri	15
2.4.1. Tanımı ve Özellikleri	15

2.4.2.	Doku İskelesi Hazırlamada Kullanılan Matriks Maddeleri	16
2.4.2.1.	Poli(laktik-ko-glikolik asit) (PLGA)	17
2.4.2.2.	Kolajen	21
2.4.2.3.	Poli-l-lizin (PLL)	25
2.4.3.	Doku İskelesi Hazırlama Yöntemleri	26
2.4.3.1.	Geleneksel Yöntemler	27
2.4.3.1.1.	Fiber Bağlama	27
2.4.3.1.2.	Çözücü Dökümü - Parçacık Uzaklaştırma	28
2.4.3.1.3.	Membran Laminasyonu	28
2.4.3.1.4.	Eriyik Kalıplama	29
2.4.3.1.5.	Ekstrüzyon	29
2.4.3.1.6.	Gaz Köpükleştirme	29
2.4.3.1.7.	Faz Ayrımı	30
2.4.3.1.8.	Elektro-eğirme	31
2.4.3.1.9.	Dondurarak Kurutma	31
2.4.3.1.10.	Emülsiyon Dondurarak Kurutma	32
2.4.3.1.11.	Yerinde Doku İskelesi Üretimi	32
2.4.3.2.	Bilgisayar Destekli Tasarım Yöntemleri	33
2.4.3.2.1.	Isı Kullanarak Doku İskelesi Üretimi	33
2.4.3.2.2.	Işık Kullanarak Doku İskelesi Üretimi	34
2.4.3.2.3.	Yapıştırıcı Kullanarak Doku İskelesi Üretimi	35
2.4.4.	Doku İskelesi Uygulama Alanları	36
2.5.	Hücre Kültürü Çalışmaları	39
2.5.1.	Tanımı ve Tarihçesi	39
2.5.2.	Hücre Kültürlerinin Uygulama Alanları	39
2.5.3.	Hücre Kültürü Ortamları	40
2.5.4.	Hücre Kültürü Teknikleri	40
2.5.4.1.	Eksplant Kültür Sistemi	41
2.5.4.2.	Süspansiyon Kültür Sistemi	42

2.6.	Naproksen Sodyum (NS)	43
2.6.1.	Fizikokimyasal Özellikleri	43
2.6.2.	Miktar Tayin Yöntemleri	43
2.6.3.	Stabilite	43
2.6.4.	Etki Mekanizması	44
2.6.5.	Farmakolojik Özellikleri	44
2.6.6.	Farmakokinetik Özellikleri	45
3.	GEREÇ VE YÖNTEM	46
3.1	Araç ve Gereçler	46
3.1.1	Kullanılan Kimyasal Maddeler	46
3.1.2	Kullanılan Aletler	47
3.2.	Yöntemler ve Deneyler	49
3.2.1.	NS' un Fizikokimyasal Özelliklerinin İncelenmesi	49
3.2.1.1.	UV Spektrumu	49
3.2.1.2.	FT-IR Spektrumu	49
3.2.1.3.	Erime Derecesi Tayini	49
3.2.1.4.	Diferansiyel Taramalı Kalorimetre (DSC) Termogramı	49
3.2.2.	NS' un Yüksek Basıncılı Sıvı Kromatografisi (HPLC) ile Miktar Tayini	49
3.2.2.1.	Kalibrasyon Doğrusu	50
3.2.2.2.	Analitik Yöntem Validasyonu	50
3.2.2.2.1.	Doğrusallık (Linearity)	51
3.2.2.2.2.	Doğruluk (Accuracy)	51
3.2.2.2.3.	Kesinlik (Precision)	51
3.2.2.2.4.	Duyarlılık (Sensitivity)	53
3.2.2.2.5.	Özgünlük (Specificity)	53
3.2.2.2.6.	Stabilite	53
3.2.3.	Doku İskelelerinin Formülasyon Çalışmaları	53
3.2.3.1.	Ön Formülasyon Çalışmaları	53

3.2.3.2.	Formülasyon Çalışmaları	55
3.2.3.2.1.	Doku İskelelerinin Hazırlanması	56
3.2.3.2.2.	Doku İskelelerinin Kolajen veya Poli-l-lizin ile Kaplanması	57
3.2.4.	Doku İskelelerinin İn Vitro Karakterizasyonu	59
3.2.4.1.	Çap – Kalınlık Tayini	59
3.2.4.2.	Morfolojik Özelliklerinin İncelenmesi	59
3.2.4.3.	FT-IR Spektrumlarının İncelenmesi	59
3.2.4.4.	Porozite Ölçümleri	59
3.2.4.5.	Şişme ve Su Absorplama Özelliklerinin İncelenmesi	59
3.2.4.6.	İn Vitro Degradasyon	60
3.2.4.7.	Doku İskelelerine Yüklene NS Miktarının Belirlenmesi	60
3.2.5.	İn Vitro Salım Deneyleri	61
3.2.5.1.	Salım Ortamı ve Hücresi, Deneyin Yapılışı	61
3.2.5.2.	İn Vitro Salım Deneylerinin Değerlendirilmesi	61
3.2.6.	Hücre Kültürü Çalışmaları	63
3.2.6.1.	Kornea Epitel Hücrelerinin İzolasyonu ve Kültürü	64
3.2.6.2.	İzole Edilen Hücrelerin İmmünohistokimyasal İncelenmesi	65
3.2.6.3.	Hücre Adezyonunun Mikroskopik Olarak İncelenmesi	65
3.2.6.4.	Hücre Morfolojisinin İncelenmesi	65
3.2.6.5.	İn Vitro Biyouyumluluk Testleri	66
3.2.6.5.1.	Sitotoksite Testi	66
3.2.6.5.2.	Proliferasyon Testi	67
3.2.7.	Bulguların İstatistiksel Değerlendirilmesi	67
4.	BULGULAR	68
4.1.	NS' un Fizikokimyasal Özelliklerinin İncelenmesi	68
4.1.1.	UV Spektrumu	68
4.1.2.	FT-IR Spektrumu	69
4.1.3.	Erime Derecesi Tayini	69
4.1.4.	Diferansiyel Tarmalı Kalorimetre (DSC) Termogramı	69

4.2.	NS' un Yüksek Basınçlı Sıvı Kromatografisi (HPLC) ile Miktar Tayini	70
4.2.1.	Kalibrasyon Doğrusu	71
4.2.2.	Analitik Yöntem Validasyonu	72
4.2.2.1.	Doğrusallık	72
4.2.2.2.	Doğruluk	72
4.2.2.3.	Kesinlik	73
4.2.2.3.1.	Tekrarlanabilirlik	73
4.2.2.3.2.	Tekrar Elde Edilebilirlik	74
4.2.2.4.	Duyarlılık	75
4.2.2.5.	Özgünlük	75
4.2.2.6.	Stabilite	79
4.3.	Doku İskelelerinin İn Vitro Karakterizasyonu	80
4.3.1.	Çap – Kalınlık Tayini	80
4.3.2.	Morfolojik Özelliklerinin İncelenmesi	80
4.3.3.	FT-IR Spektrumlarının İncelenmesi	86
4.3.4.	Porozite Ölçümleri	94
4.3.5.	Şişme ve Su Absorplama Özelliklerinin İncelenmesi	94
4.3.6.	İn Vitro Degradasyon	96
4.3.7.	Doku İskelelerine Yüklenen NS Miktarının Belirlenmesi	97
4.4.	İn Vitro Salım Deneyleri	98
4.5.	Hücre Kültürü Çalışmaları	105
4.5.1.	İzole Edilen Hücrelerin İmmünohistokimyasal İncelenmesi	105
4.5.2.	Hücre Adezyonunun Mikroskopik Olarak İncelenmesi	105
4.5.3.	Hücre Morfolojisinin İncelenmesi	108
4.5.4.	İn Vitro Biyouyumluluk Testleri	113
4.5.4.1.	Sitotoksikite Testi	113
4.5.4.2.	Proliferasyon Testi	115
5.	TARTIŞMA	117

5.1.	NS' un Fizikokimyasal Özellikleri ile İlgili Çalışmalar	120
5.2.	Analitik Yöntem Validasyonu	121
5.3.	Doku İskelelerinin Formülasyon Çalışmaları	122
5.4.	Doku İskelelerinin İn Vitro Karakterizasyonu	124
5.4.1.	Çap – Kalınlık Tayini	124
5.4.2.	Morfolojik Özelliklerinin İncelenmesi	125
5.4.3.	FT-IR Spektrumlarının İncelenmesi	127
5.4.4.	Porozite Ölçümleri	128
5.4.5.	Şişme ve Su Absorplama Özelliklerinin İncelenmesi	130
5.4.6.	İn Vitro Degradasyon	131
5.4.7.	Doku İskelelerine Yüklenen NS Miktarının Belirlenmesi	132
5.5.	İn Vitro Salım Deneyleri	133
5.6.	Hücre Kültürü Çalışmaları	136
5.6.1.	İzole Edilen Hücrelerin İmmünohistokimyasal İncelenmesi	137
5.6.2.	Hücre Adezyonunun Mikroskopik Olarak İncelenmesi	137
5.6.3.	Hücre Morfolojisinin İncelenmesi	139
5.6.4.	İn Vitro Biyouyumluluk Testleri	139
5.6.4.1.	Sitotoksikite Testi	139
5.6.4.2.	Proliferasyon Testi	141
6.	SONUÇ	144
	KAYNAKLAR	147
	EKLER	

SİMGELER ve KISALTMALAR

3-DP	3-Dimensional printing
bFGF	Bazik fibroblast büyüme faktörü
BMP-2	Kemik morfojenik proteini-2
BMP-7	Kemik morfojenik proteini-7
C-KLAL	Kombine konjunktival-keratolimbal homogreft transplantasyonu
CLAU	Konjunktival limbal otogreft transplantasyonu
COX-1	Siklooksijenaz-1
COX-2	Siklooksijenaz-2
DMEM	Dulbecco's modified Eagle's medium
DSC	Diferansiyel taramalı kalorimetri
EMA	Avrupa İlaç Ajansı
FBS	Fetal sığır serumu
FDA	Amerikan Gıda ve İlaç Kurumu
FDM	Fused deposition modelling
FT-IR	Fourier transform infrared spektrofotometre
HPLC	Yüksek basınçlı sıvı kromatografisi
KLAL	Kadaverik keratolimbal allogreft transplantasyonu
LR-CLAL	Canlı donör kaynaklı konjunktival limbal homogreft transplantasyonu
MTT	3-(4,5-Dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide
NS	Naproksen sodyum
N-VP	N-vinil pirolidon
PAM	Pressure assisted micro-syringe

PBS	Fosfat tamponu tuzu
PDGF	Platelet türevi büyüme faktörü
PGA	Poli(glikolik asit)
PLA	Poli(laktik asit)
PLGA	Poli(laktik-ko-glikolik asit)
PLL	Poli-l-lizin
PLLA	Poli-l-laktik asit
PMMA	Polimetilmetakrilat
RRSBW	Rosin-Ramler-Sperling-Bennet-Weibull
SEM	Taramalı elektron mikroskobu
SLF	Yapay gözyaşı
SS	Standart sapma
T_g	Camsı geçiş sıcaklığı
TGF- β	Transforming büyüme faktörü- β
VK	Varyasyon katsayısı
β -TCP	β -Trikalsiyum fosfat
$\lambda_{\max}$	Maksimum dalga boyu

ŞEKİLLER

	Sayfa
Şekil 2.1. Gözün şematik kesiti	3
Şekil 2.2. Korneanın tabakaları	5
Şekil 2.3. 1980-2001 yılları arasında dünyada doku mühendisliği alanında alınan patentlerin yıllara göre dağılımı	14
Şekil 2.4. PLGA' in kimyasal formülü	18
Şekil 2.5. Kolajenin kimyasal yapısı	21
Şekil 2.6. Poli-l-lizin hidrobromürün kimyasal yapısı	25
Şekil 2.7. Fiber bağlama yöntemi ile hazırlanmış PGA doku iskelesi	27
Şekil 2.8. Çözücü dökümü-parçacık uzaklaştırma yöntemiyle hazırlanmış doku iskelesi	28
Şekil 2.9. Gaz köpükleştirme yöntemiyle hazırlanmış PLLA doku iskelesi	30
Şekil 2.10. Faz ayrımı yöntemiyle hazırlanmış PLA doku iskelesi	30
Şekil 2.11. Elektro-eğirme yöntemiyle hazırlanmış PLLA doku iskelesi	31
Şekil 2.12. Dondurarak kurutma yöntemiyle hazırlanmış kolajen-glikozaminoglikan doku iskelesi	32
Şekil 2.13. Emülsiyon dondurarak kurutma yöntemiyle hazırlanmış PLGA doku iskelesi	32
Şekil 2.14. SLS yöntemi ile hazırlanmış polietilen doku iskelesi	34
Şekil 2.15. FDM yöntemi ile hazırlanmış polietilen doku iskelesi	34
Şekil 2.16. Stereolitografik yöntem ile hazırlanmış hidroksiapatit doku iskelesi	35
Şekil 2.17. a) 3-DP yöntemiyle hazırlanmış kalsiyum fosfat doku iskelesi, b) PAM yöntemiyle hazırlanmış PLGA doku iskelesi	35
Şekil 2.18. Eksplant kültür sistemi	41
Şekil 2.19. 3T3 eksplant kültür sistemi	42
Şekil 2.20. Süspansiyon kültür sistemi	42
Şekil 2.21. NS' un kimyasal yapısı	43

Şekil 3.1.	Kolajen veya poli-l-lizin kaplı, NS içeren veya boş PLGA doku iskelelerinin hazırlanması	58
Şekil 4.1.	NS' un a) distile su, b) SLF çözeltisi içindeki UV spektrumu	68
Şekil 4.2.	NS' un FT-IR spektrumu	69
Şekil 4.3.	NS' un DSC termogramı	70
Şekil 4.4.	NS' a ($5 \mu\text{g.mL}^{-1}$) ait HPLC kromatogramı	70
Şekil 4.5.	NS' un kalibrasyon doğrusu ve denklemi	72
Şekil 4.6.	Hazırlanan doku iskelesi formülasyonlarında kullanılan yardımcı maddelere ait HPLC kromatogramları	76
Şekil 4.7.	Kaplanmamış PLGA (50:50) doku iskelelerinden elde edilen HPLC kromatogramları	76
Şekil 4.8.	Kolajen kaplı PLGA (50:50) doku iskelelerinden elde edilen HPLC kromatogramları	77
Şekil 4.9.	Poli-l-lizin kaplı PLGA (50:50) doku iskelelerinden elde edilen HPLC kromatogramları	77
Şekil 4.10.	Kaplanmamış PLGA (75:25) doku iskelelerinden elde edilen HPLC kromatogramları	78
Şekil 4.11.	Kolajen kaplı PLGA (75:25) doku iskelelerinden elde edilen HPLC kromatogramları	78
Şekil 4.12.	Poli-l-lizin kaplı PLGA (75:25) doku iskelelerinden elde edilen HPLC kromatogramları	79
Şekil 4.13.	PLGA (50:50) ve PLGA (75:25) polimerleri ile hazırlanan doku iskelesi formülasyonlarının kesim öncesi görüntüleri	81
Şekil 4.14.	PLGA (50:50) ve PLGA (75:25) polimerleri ile hazırlanan doku iskelesi formülasyonlarının kesim sonrası görüntüleri	82
Şekil 4.15.	PLGA (50:50) polimeri ile hazırlanan doku iskelesi formülasyonlarına ait SEM fotoğrafları	84
Şekil 4.16.	PLGA (75:25) polimeri ile hazırlanan doku iskelesi formülasyonlarına ait SEM fotoğrafları	85
Şekil 4.17.	a) Kolajen b) Poli-l-lizinin FT-IR spektrumu	86
Şekil 4.18.	Etkin madde içermeyen PLGA (50:50) doku iskelesi formülasyonlarının FT-IR spektrumu	90

Şekil 4.19.	Etkin madde (NS) içeren PLGA (50:50) doku iskelesi formülasyonlarının FT-IR spektrumu	91
Şekil 4.20.	Etkin madde içermeyen PLGA (75:25) doku iskelesi formülasyonlarının FT-IR spektrumu	92
Şekil 4.21.	Etkin madde (NS) içeren PLGA (75:25) doku iskelesi formülasyonlarının FT-IR spektrumu	93
Şekil 4.22.	PLGA (50:50) doku iskelelerinin su absorplama profilleri (n = 3)	95
Şekil 4.23.	PLGA (75:25) doku iskelelerinin su absorplama profilleri (n = 3)	95
Şekil 4.24.	PLGA (50:50) doku iskelelerinin in vitro degradasyon profilleri	96
Şekil 4.25.	PLGA (75:25) doku iskelelerinin in vitro degradasyon profilleri	97
Şekil 4.26.	NS içeren doku iskelesi formülasyonlarına ilişkin yükleme etkinliği sonuçları (n = 6)	98
Şekil 4.27.	PLGA (50:50) ve PLGA (75:25) doku iskelelerinden NS' un in vitro salım profili (n = 6)	100
Şekil 4.28.	PLGA (50:50) doku iskelelerinden NS' un salım profili (n = 6)	101
Şekil 4.29.	PLGA (75:25) doku iskelelerinden NS' un salım profili (n = 6)	101
Şekil 4.30.	Kaplama yapılmamış PLGA (50:50) ve PLGA (75:25) doku iskelelerinden NS' un salım profili (n = 6)	102
Şekil 4.31.	Kolajen kaplı PLGA (50:50) ve PLGA (75:25) doku iskelelerinden NS' un salım profili (n = 6)	102
Şekil 4.32.	Poli-l-lizin kaplı PLGA (50:50) ve PLGA (75:25) doku iskelelerinden NS' un salım profili (n = 6)	102
Şekil 4.33.	FITC ile konjuge edilmiş keratin 14 ile boyanmış kornea epitel hücreleri	105
Şekil 4.34.	Kornea epitel hücrelerini içeren PLGA (50:50) doku iskelesi formülasyonlarına ait optik mikroskop fotoğrafları	106
Şekil 4.35.	Kornea epitel hücrelerini içeren PLGA (75:25) doku iskelesi	107

	formülasyonlarına ait optik mikroskop fotoğrafları	
Şekil 4.36.	Etkin madde içermeyen PLGA (50:50) doku iskelesi formülasyonlarına hücre adezyonu	109
Şekil 4.37.	NS içeren PLGA (50:50) doku iskelesi formülasyonlarına hücre adezyonu	110
Şekil 4.38.	Etkin madde içermeyen PLGA (75:25) doku iskelesi formülasyonlarına hücre adezyonu	111
Şekil 4.39.	NS içeren PLGA (75:25) doku iskelesi formülasyonlarına hücre adezyonu	112
Şekil 4.40.	Kornea epitel hücrelerini PLGA (50:50) doku iskeleleri ile inkübasyonu sonrasında hayatta kalma yüzdeleri (n = 3)	114
Şekil 4.41.	Kornea epitel hücrelerinin PLGA (75:25) doku iskeleleri ile inkübasyonu sonrasında hayatta kalma yüzdeleri (n = 3)	114
Şekil 4.42.	Kornea epitel hücrelerinin PLGA (50:50) doku iskeleleri ile inkübasyonu sonrasında proliferasyon sonuçları (n = 3)	116
Şekil 4.43.	Kornea epitel hücrelerinin PLGA (75:25) doku iskeleleri ile inkübasyonu sonrasında proliferasyon sonuçları (n = 3)	116

TABLOLAR

	Sayfa
Tablo 2.1. Doku iskelesi hazırlamada kullanılan doğal ve sentetik biyoparçalanabilir polimerler	16
Tablo 2.2. PLGA bazlı ticari ürünler	19
Tablo 2.3. Kolajen tipleri ve vücut içerisindeki dağılımı	22
Tablo 2.4. Kolajen içeren ilaç taşıyıcı sistemler ve uygulamaları	24
Tablo 2.5. Poli-L-lizin içeren ilaç taşıyıcı sistemler ve uygulamaları	26
Tablo 2.6. Doku iskelelerinin ilaç taşıyıcı sistem uygulamaları	37
Tablo 2.7. Piyasada doku iskelesi formunda bulunan ürünlere ait örnekler	38
Tablo 3.1. NS' un HPLC ile miktar tayininde kullanılan kromatografik koşullar	50
Tablo 3.2. Hazırlanan doku iskelelerinde kullanılan polimerler ve kodları	56
Tablo 4.1. NS' un HPLC ile miktar tayininde lineer regresyon verileri (n = 6)	71
Tablo 4.2. Deney içi ve deneyler arası doğruluk	73
Tablo 4.3. Tekrarlanabilirlik sonuçları	74
Tablo 4.4. Gün içi ve günler arası kesinlik	75
Tablo 4.5. Analitik yöntem validasyonunda NS' a ait stabilite sonuçları	79
Tablo 4.6. Hazırlanan doku iskelelerinin çap ve kalınlıkları (n = 12)	80
Tablo 4.7. Hazırlanan doku iskelelerine ait porozite sonuçları (n = 3)	94
Tablo 4.8. NS içeren doku iskelesi formülasyonlarına ilişkin yükleme etkinliği sonuçları (n = 3, $\bar{X} \pm SS$)	98
Tablo 4.9. PLGA (50:50) doku iskelesi formülasyonlarının salım kinetiklerinin değerlendirilmesi	103
Tablo 4.10. PLGA (75:25) doku iskelesi formülasyonlarının salım kinetiklerinin değerlendirilmesi	104

Tablo 4.11.	Kornea epitel hücrelerinin doku iskelesi formülasyonları ile 1, 5 ve 10 gün inkübasyonu sonrasında hayatta kalma yüzdeleri (n = 3)	113
-------------	--	-----

1. GİRİŞ

Travma veya çeşitli hastalıklar nedeniyle meydana gelen organ yetmezlikleri ve kayıpları insan ölümlerinin başlıca nedenleri arasındadır. Bu ciddi problemin aşılmasında ilk olarak transplant cerrahisi düşünülmekteyse de donör sayısındaki yetersizlik, doku uyumsuzluğu ve immün cevabın baskılanmasını takiben meydana gelebilen bakteriyel infeksiyonlar, kanser oluşumu ve virüs infeksiyonları gibi istenmeyen etkiler bu uygulamayı sınırlamaktadır. Bu nedenle son yıllarda organ yetmezliklerinin tedavisinde rekonstrüktif cerrahi ve doku rejenerasyonu tüm dünyada büyük önem kazanmıştır. Doku rejenerasyonu tedavisinde temel olarak doku mühendisliği yaklaşımlarından yararlanılmaktadır. Doku mühendisliğinde genel olarak biyopolimer, hücre ve biyosinyal molekülleri tek başlarına veya birlikte kullanılarak hasarlı dokunun tamiri gerçekleştirilmektedir. Doku mühendisliği ile organ ve dokuların tamirinde sağlıklı veya genetiği değiştirilmiş hücreler yanında bu ortamın sağlanması için bir matriks materyali (destek materyal = doku iskelesi) gerekmektedir. Destek materyali olarak, mekanik dayanıklılıkları ve fizikokimyasal özelliklerinin kolayca kontrol altında tutulabilmesi nedeniyle sıklıkla sentetik veya doğal polimerler kullanılmaktadır. Polimerik doku iskeleleri tek başına veya biyomimetik özelliklerini artırmak amacıyla kolajen ve amniyotik membran gibi endojen matriks maddeleri ile kombine halde hazırlanarak (“smart scaffolds”, “biomimetic scaffolds”) kullanılabilirler. Doku iskeleleri, taşıdıkları hücrelerin korunmasını, lokalize olmasını, lokalize olduğu yerde proliferasyonunu ve farklılaşmasını sağladıklarından doku rejenerasyonu tedavisinin etkinliği ve başarısı için hayati önem taşımaktadırlar.

Korneal lezyonlar, korneada meydana gelen hastalıklar veya termal/kimyasal yanık gibi etmenler sonucunda ortaya çıkan hasarlar olup korneada şiddetli inflamasyona neden olmaktadır. Korneanın yüzeyi sürekli olarak limbal epitelde bulunan kök hücreler tarafından üretilen epitel hücreler ile yenilediğinden yüzeyel epitelde meydana gelen hafif bir hasar klasik tedavi desteği ile iyileşebilir. Ancak korneada meydana gelen hasar geniş bir alanı etkilemişse korneanın fonksiyonunu tekrar kazanabilmesi için kornea dokusu transplantasyonu gereklidir. Transplantasyon işleminde donör bulma ile ilgili problemler ve işlemin

dezavantajları nedeniyle ciddi kısıtlamalar olması, kornea hasarlarının doku mühendisliği yöntemleriyle tedavi edilmesi gerekliliğini ortaya çıkarmaktadır.

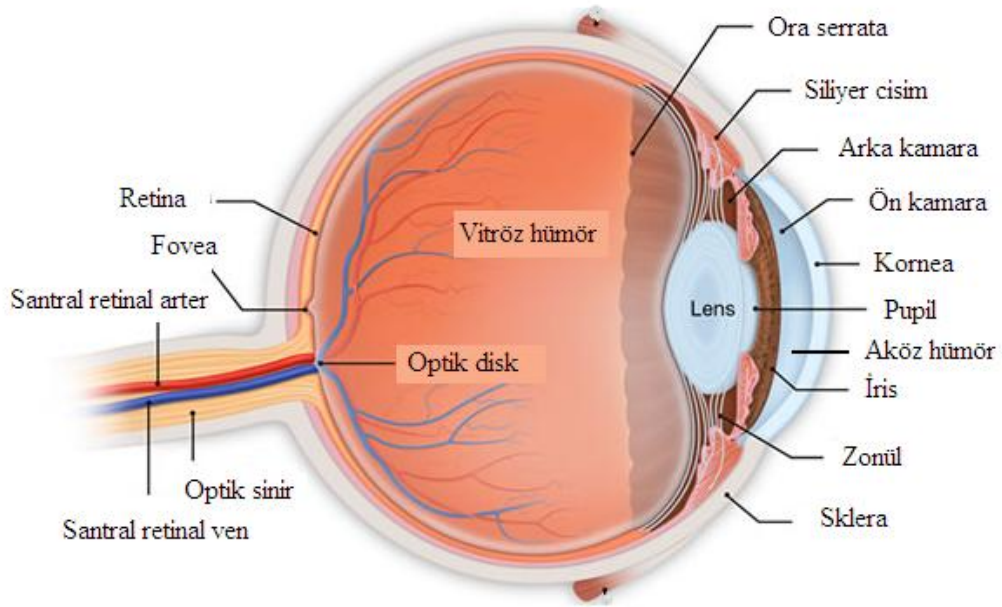
Bu tez kapsamında kornea hasarlarının rejenerasyonunda yeni bir yaklaşımı değerlendirmek ve klinikte karşılaşılan problemlere çözüm bulmak amacıyla tıp (oftalmoloji, histoloji, genetik), eczacılık ve kimya bilim dallarının görüşleri/önerileri bir araya getirilerek çok fonksiyonlu bir doku iskelesi formülasyonu geliştirilmesi amaçlanmıştır. Hazırlanan akıllı doku iskelesi formülasyonunun; a) içerdiği antiinflamatuvar ilaç nedeniyle ortamdaki inflamasyonu gidermesi, b) içerdiği epitel hücreleri nedeniyle hasar görmüş bölgeye sağlıklı hücrelerin aktarılması ile kornea tamirinin gerçekleştirilmesi, c) içerdiği biyogeçimli ve biyoparçalanır polimer (PLGA) ve kaplamada kullanılan kolajen veya poli-l-lizin ile mekanik dayanıklılığın ve biyomimetik özelliğin bir arada sağlanması öngörülmektedir.

Yukarıda belirtilen bilgilerin ışığı altında bu çalışmanın amacı, ciddi hasar görmüş kornea dokusunun rejenerasyonunda ümit vaad edici sistemler olan polimerik doku iskelelerinin tasarlanıp antiinflamatuvar ilaç yüklü olarak hazırlanması, karakterizasyonlarının yapılması, salım özelliklerinin değerlendirilmesi ve hücre kültür çalışmalarının yapılarak formülasyonların kornea epitel hücreleri üzerindeki sitotoksik etkileri ve hücrelerin proliferasyon özelliklerinin incelenmesidir.

2. GENEL BİLGİLER

2.1. Gözün Anatomisi ve Fizyolojisi

Göz küresi yüz kemiklerinin oluşturduğu iki ayrı boşlukta yerleşmiş olan kısmen izole bir doku kompartmanıdır. Genel olarak üç tabakadan oluşur. Bu tabakalar dıştan içe doğru sklera, uvea ve retina olarak isimlendirilir (1). Göz küresinin şematik gösterimi Şekil 2.1’ de verilmiştir.



Şekil 2.1. Gözün şematik kesiti (2).

Göz yuvarlağını en dıştan saran opak, fibröz tabaka sklera olarak isimlendirilir. Sklera kan damarı içermez, beslenmesi hücreler arasında akan sıvı ile olur. Bu tabaka fonksiyonlarını sürdürebilmesi için gözün mekanik dayanıklılığını ve korunmasını sağlar.

Orta tabaka olan uvea, gözün pigmentli damar tabakasıdır. Önden arkaya doğru iris, siliyer cisim ve koroidden oluşur. İris, ince ve pigmentli bir diafram olup kasılabilme özelliğine sahiptir. Siliyer cisimciğin iç yüzeyinden itibaren başlar ve merkezinde pupil yer alır. Esas olarak dilatör (gevşetici) ve sfinkter (kasıcı) kaslardan oluşan bir dokudur. İrise gelen herhangi bir sempatik uyarı dilatör kasların çalışmasına ve dolayısıyla pupilin genişlemesine (midriyazis) neden olurken,

parasempatik bir uyarı sfinkter kasların çalışmasına ve dolayısıyla pupilin daralmasına (miyozis) neden olur. Siliyer cisim, parasempatik sinirler taşıyan yumuşak bir kaptır. Gözün ön bölümünü dolduran aköz hümör salgılamakla görevlidir. Koroid, skleranın iç yüzeyindeki ince, yumuşak, kahverengi tabakadır. Oldukça yoğun bir damar yapısına sahiptir. Temel görevi yapısındaki kan damarları ile retinanın dış tabakalarını beslemektir.

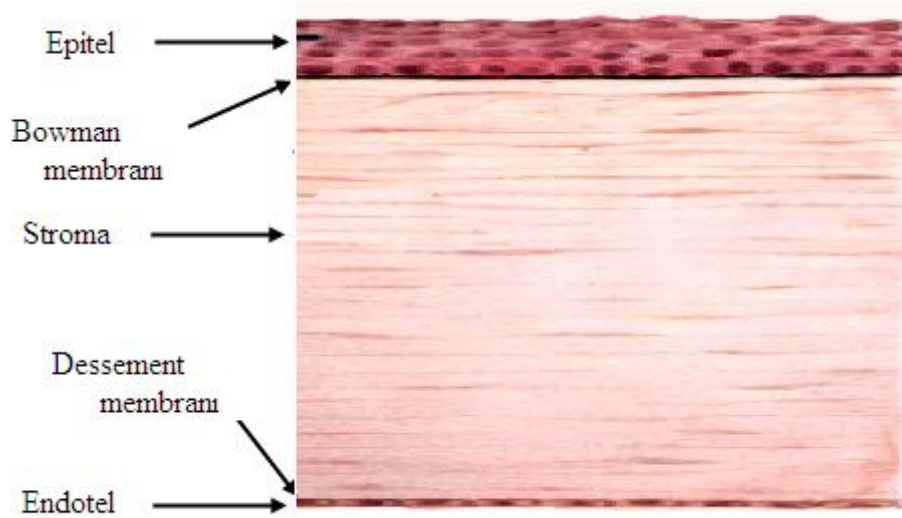
Gözün en iç tabakası olan retina optik sinirleri içerir. Retinada çubuk ve koni olarak isimlendirilen fotoreseptör hücreleri yer alır. Koni hücreleri optik duyarlılığı ve renk ayırımını sağlarken, çubuk hücreleri çevresel görüntünün oluşmasıyla ilgilenir. Retinada bulunan optik sinirler retinada oluşan görüntünün beyne ulaştırılmasını sağlar.

Göz küresinde lens ile ayrılmış iki adet odacık bulunmaktadır. Öndeki bölmede bulunan aköz hümör siliyer cisimden salgılanmakta olup göz içi basıncının ayarlanmasından sorumludur. Aköz hümör, lens ve kornea gibi damarsız dokulara oksijen ve çeşitli besinlerin taşınmasında önemli role sahiptir. Vitroz hümör, arka odacıkta yer alan viskoz bir jel yapısında olup lens ile retina arasında bulunur ve yüksek oranda su içeriğine sahiptir (1,3).

2.1.1. Kornea

Göz küresinin dışarıya bakan ön kısmını saydam özellikte ve damarsız olan kornea tabakası oluşturur. Kornea gözün en önemli kırıcı ortamı olup önden bakıldığında dışbükey ve hafif eliptik görünümlüdür (3,4). Korneanın ön yüzü gözyaşı ile yıkanırken arka yüzü aköz hümör ile temastadır. Metabolizması için gerekli olan materyal ve oksijenin bir kısmını limbal bölgede (korneanın sklera ile birleşme hattı) bulunan kan damarlarından, bir kısmını ise aköz hümör ve gözyaşından difüzyon suretiyle sağlar (1).

Kornea genel olarak beş tabakadan oluşur. Bu tabakalar dıştan içe doğru epitel, “bowman” membranı, stroma, dessement membranı ve endotel olarak isimlendirilir (Şekil 2.2).



Şekil 2.2. Korneanın tabakaları (5).

Epitel Tabakası: Kornea epiteli yaklaşık 50 mikrometre kalınlığında olup ilaçlar da dahil olmak üzere tüm yabancı cisimlerin geçişi için en önemli engeli oluşturur. Kornea epiteli konjunktiva epitelinin devamı şeklinde olarak beş veya altı tabaka epitel hücrelerinden oluşur. Buradaki hücreler çok tabakalı, yassı ve keratinsizdir. Dıştaki hücrelerin yüzeyi gözyaşı filminin gözün ön kısmında kalmasını sağlayarak korneanın ıslanmasına yardım eden mikrovillus ve mikropililerle genişlemiştir. Yüzey tabakadaki epitel hücrelerinde çok sayıda sıkı kavşak bulunması nedeniyle kornea epiteli hücrelerarası geçirgenliği az olan bir dokudur. Epitel tabakası, metabolizması için gerekli oksijeni, aminoasitleri ve glikozu gözyaşı aracılığıyla atmosferden, kornea ile konjunktiva arasında sınır olan limbus çevresindeki kapiller ağdan ve aköz hümörden difüzyon yoluyla sağlar. Hidrofobik özelliğe sahip olan iyonize olmamış bir ilaç kornea epitelinden kolaylıkla geçerken, hidrofilik ve iyonize ilaçların geçişi için epitel önemli bir engel oluşturur.

Bowman Membranı: Korneanın ikinci tabakası olup kolajen liflerden ve bu liflerin arasında yer alan dolgu malzemesinden meydana gelmiştir. Hücresel içeriği ve çoğalma yeteneği olmayan bir tabakadır. Epitelde meydana gelebilecek iltihabi durumların stromaya geçişini engelleyen önemli bir bariyerdir.

Stroma: Kornea kalınlığının % 90' ını oluşturur ve modifiye bağ dokusundan meydana gelir. Stroma, korneanın iskeletini oluşturan en önemli tabakadır. Birbirine

dik açı ile yerleşmiş tip I kolajen lamelleri içerir. Yapısındaki glikozaminglikanlar kolajen lamellerinin düzgün bir tabaka oluşturmaya katkıda bulunarak korneanın saydamlığını sağlar. Stromanın yaklaşık % 78' ini su oluşturur, dolayısıyla hidrofilik ilaçların stromadan geçişi kolaydır.

Dessement Membranı: 10-15 µm kalınlığında, stroma ile endotel arasında yer alan oldukça elastik bir dokudur.

Endotel: Korneanın en arka tabakasıdır. Tek tabakalı epitel benzeri hücrelerden oluşur. Bu hücreler birbirlerinden hücre içi boşluklarla ayrılmıştır. Endotelin üç temel fonksiyonu vardır, bunlar aköz hümöre karşı engel görevi, metabolik pompa fonksiyonu ve korneanın saydamlığını sağlamaktır. Endotel fonksiyonları bozulursa kornea ödemi gelişir (1,6-10).

Kornea, göze uygulanan ilaçların oküler yararlanımı açısından en önemli absorpsiyon membranıdır. Korneadan ilaç absorpsiyonu esas olarak bu membranı oluşturan tabakaların ilaca karşı geçirgenliğine bağlı olarak değişir. Epitel membranı sıkı kavşaklar nedeniyle hücreler arası geçişe dirençlidir. Dolayısıyla ilacın büyük kısmı hücre membranından geçmek zorundadır. Epitel, hidrofilik ve iyonize maddelerin geçişine engel olurken, hidrofobik ve yağda çözünen maddeler bu tabakadan kolayca absorplanır. Hidrofobik, iyonize olmamış bir ilaç epitelden kolaylıkla geçer, epitelin pH'ında iyonize, suda çözünen forma dönüşür ve bu şekilde stromaya geçebilir. Stroma hücre dışı bir matriks olduğu için 500 kD'a kadar büyüklükteki moleküllerin geçişine izin verebilir. Hidrofilik bileşikler stromadan geçerken lipofilik maddeler için stroma bir engel oluşturur. Endotel ise ilaçların geçişine molekül büyüklüğüne bağlı olarak direnç gösterir (3,4). Kornea esas olarak damarsız olduğundan sistemik uygulanan ilaçlar korneaya ulaşamazlar ve bu nedenle de korneal hastalıkların tedavisinde topikal uygulama tercih edilir.

2.1.2. Konjunktiva

Konjunktiva membranı göz akının dış ve göz kapaklarının iç yüzeyini kaplayan bol damarlı bir epitel membranıdır. Konjunktiva korneanın aksine kan damarları açısından zengin bir membrandır. İlacın gözün iç dokularına ulaşması ve etkisini göstermesi için esas olarak korneadan absorplanması gerekmektedir. Göze uygulanan ilacın bir kısmı konjunktiva tarafından da absorplanır. Ancak konjunktivadan absorplanan ilaç, çok sayıda kan damarları nedeniyle büyük oranda

sistemik dolaşıma geçmektedir. Korneal olmayan bu absorpsiyon yolu göze uygulanan bazı ilaçların sistemik yan etkisinin görülmesine yol açabilir (11).

2.2. Oküler Yüzey Hastalıkları

Oküler yüzey, vücuttaki diğer dokularda olduğu gibi deri ile kaplı olmadığından doğal yapısını korumak için çok fonksiyonlu bir özellik gösterir. Oküler yüzeyin normal yapı ve fonksiyonunun korunmasını sağlayan bu sistem, göz kapakları, kirpikler, gözyaşı filmi, konjunktiva ve kornea epitelinden oluşur (12). Bu çok fonksiyonlu yapıyı oluşturan bölümlerin herhangi birinde varolan bir hasar sonucu oküler yüzey hastalıkları meydana gelir. Genel olarak oküler yüzey hastalıkları dünyada 11 milyon hastayı etkilemekte olup, bunlardan 2 milyonu bu sebeple kör olmaktadır. Türkiye’de de dünyadakine benzer bir tablo görülmektedir. Yaklaşık olarak her sene 6000-8000 hasta oküler yüzey hastalıkları sonucunda transplant cerrahisine ihtiyaç duymaktadır (13).

Kapak-kirpik sistemindeki birtakım eksiklikler veya yapısal bozukluklar sonucunda kirpiklerin konjunktival ve korneal yüzeylere mekanik olarak sürtünmesiyle gözün yüzey dokularında çeşitli problemler meydana gelir. Bunun dışında konjenital olarak göz kapağının tam olarak kapanmaması durumunda gözyaşı buharlaşmasının artması sonucu korneal ve/veya konjunktival kuruma meydana gelerek yüzey dokularda inflamasyon görülür (12,14).

Gözyaşı, üst göz kapağının iç yüzeyinde bulunan gözyaşı salgı bezleri (lakrimal bezler) tarafından salgılanır. Gözün çevreye açık yüzeyini kaplayan gözyaşı filmi genel olarak sulu tabaka, müsin ve yağlı tabaka olmak üzere üç tabakadan oluşur. Bu tabakaların herhangi birinde bir anormallik meydana gelirse gözün yüzey yapısında da bozulmalar oluşur. Hastalarda yaşlanmaya bağlı olarak gözyaşı filminin özellikle sulu kısmının daha az üretilmesi sonucunda primer lakrimal hastalık meydana gelir. Eğer, gözyaşı filminin üretimindeki azalma başka bir hastalığa bağlı olarak sekonder bir nedenle (“sjögren” sendromu, oküler sikatrisyel pemfigoid, alkali/termal hasarlar) meydana geliyorsa bu durum sekonder lakrimal hastalık olarak ifade edilir. Gözyaşı filminin müsin tabakasındaki eksiklikler genellikle konjunktivadaki müsin salgılayan goblet hücrelerinin zarar görmesi sonucunda meydana gelir. Bu hücrelerin kaybı veya hasarı “sjögren” sendromu, oküler sikatrisyel pemfigoid, alkali/termal hasarlar gibi hastalıklara bağlı olarak

gelişen inflamasyonlar sonucunda oluşur. Buna ilave olarak, gözyaşı filminin lipid tabakasında görülen anomalilerin en temel sebebi blefarittir. Bakteri kaynaklı bu hastalık sonucunda gözyaşı filminin lipid tabakasında yapısal değişimler meydana gelir ve gözyaşının stabil yapısı bozulur (12,15).

Konjunktiva ve kornea, gözün kurumasının engellenmesi için mutlaka nemli olması gereken mukoz membranlardır. Konjunktiva, infeksiyonlara karşı gözün korunmasında önemli bir fonksiyona sahiptir. Konjunktiva ve korneada meydana gelen hastalıkların en belirgin özelliği, immün sistemden kaynaklanan veya spesifik olmayan akut veya kronik inflamasyonlara neden olmalarıdır. İmmün sistemden kaynaklanan inflamasyonlar mevsimsel konjunktivit ve viral konjunktivit tipinde olabildiği gibi daha ciddi durumlar olan “şöğren” sendromu, oküler sikatrisyel pemfigoid gibi hastalıklar sonucunda da meydana gelebilir. Spesifik olmayan inflamasyon, oküler yüzeydeki kimyasal, termal veya travmatik hasar sonucunda oluşur. Eğer konjunktivadaki inflamasyon konjunktivanın epitel dokusunu geçmediyse bu durumda meydana gelen hasar geri dönüşümlüdür. Daha ciddi durumlarda ise geri dönüşümsüz inflamasyon meydana gelir ve oküler yüzeydeki problemler daha da ciddileşir (12,16).

Korneada meydana gelen ciddi hasarlar şiddetli inflamasyona neden olmaktadır. Hasar gerçekleştikten sonra yabancı maddeleri ve hasarlı dokuyu uzaklaştırmak için hemen immün cevap meydana gelmektedir. Daha sonra bu cevap, inflamasyon hücrelerinin aktivasyonu sonucunda prostaglandinler, tromboksanlar, lökotrienler, vazoaktif aminler ve sitokinler vb gibi kimyasal mediyatörler tarafından amplifiye edilmektedir (17). İmmün cevap sonucu ortaya çıkan prostaglandinler intraoküler basıncın yükselmesi ve iris düz kaslarının kasılmasıyla, miyozis ve vasküler permeabilitenin artması sonucu aköz hümörde protein konsantrasyonunun artmasına, böylelikle damarsız olan korneada damarlanma ve takiben skar oluşumu, görmede bulanıklık ve tedavinin yapılmadığı durumlarda körlüğe neden olmaktadır. Korneal inflamasyonun tedavisinde antiinflamatuvar ilaçlar kullanılmaktadır. Bu ilaçların topikal kullanımı, yüksek lokal ilaç konsantrasyonu sağlamaları ve sistemik yan etkilere neden olmamaları nedeniyle en çok tercih edilen yoldur. Bu durumda uygulanmak üzere antiinflamatuvar ilaçlar arasında düşünülen ilk grup steroidler olsa da steroidlerin intraoküler basıncı daha da artırmaları, kataraktı ilerletmeleri ve

stromal erimeye bağılı olarak korneada delinmelere neden olmaları gibi yan etkileri tedavi edici özelliklerinin önüne geçmektedir (18). Aralarında naproksen sodyum gibi aril propiyonik asit türevlerinin de olduğu non-steroidal antiinflatuvar ilaçların topikal uygulanmaları sonucunda korneal inflamasyonun tedavisinde etkin ve güvenilir oldukları, hatta bu grup ilaçların korneal epitel hücrelerine bakteri adezyonunu engelledikleri bilinmektedir (19).

2.2.1. Limbal Kök Hücre Eksikliği

Kornea epiteli her yedi günde bir kendini yenileme özelliğine sahip olup, bu yenilenmenin esas kaynağı epitelin bazal tabakasındaki korneoskleral limbus bölgesinde yer alan kök hücre popülasyonudur. Kornea epitelinde herhangi bir hasar meydana geldiğinde limbal bölgede bulunan kök hücreler epitel hasarının olduğu bölgeye göç ederek bu bölgenin rejenerasyonunu sağlar (20-22). Limbal kök hücre popülasyonu ile ilgili problemler ise kornea epitelinin rejenerasyon yeteneğinin azalmasına neden olur. Bu durumda hasta kızarıklık, iritasyon, fotofobi ve görme fonksiyonunun azalması gibi rahatsızlıklardan yakını. Başlangıçta kornea epiteli düzensiz ve bulanıktır. Zaman içerisinde epitel hasarı kalıcı olabilir ve stromada skarlaşma, ülserasyon ve incelme meydana gelir (12). Kornea epitelinde meydana gelen hasar sonucunda yeterli sayıda limbal kök hücre sağlanamazsa, konjunktiva korneal dokunun yerini alır. Bu durum konjunktivalizasyon olarak isimlendirilir. Kornea epitelinin yerini alan konjunktival doku kornea epiteline göre daha zayıf ve daha geçirgen olup hücresel bağlantıları zayıftır. Buna ek olarak korneal permeabilitenin artması sonucu korneal stromada inflamasyona neden olan lökositlerin gözyaşı filminden korneaya geçişi kolaylaşır (23-26). Ayrıca kornea epitel hücrelerinin yerini alan konjunktival hücreler normal korneada bulunan antianjiyogenik faktörleri salgılayamadığından korneada vaskülarizasyon gelişir (27).

Limbal kök hücre eksikliği, kornea epitelinde konjunktiva goblet hücrelerinin varlığı ile teşhis edilir. Bu durum, başlıca konjenital ve travmatik olmak üzere pek çok sebepten ötürü meydana gelebilir. Konjenital limbal kök hücre eksikliği, kişide sonradan ortaya çıkmayıp doğuştan var olan limbal kök hücre eksikliğidir (12). Travmatik limbal kök hücre eksikliği ise oküler yüzeyde meydana gelen bir travmayı takiben sekonder olarak gelişir. Oküler yüzeyde görülen bu travma, alkali-asit yanıkları, termal hasar veya fiziksel bir travma olabilir. Travmatik limbal kök hücre

hasarının görüldüğü pek çok vakada başlangıçta akut olarak kök hücre kaybı görülür. Devamında travma sonucunda gelişen inflamasyona bağlı olarak da ikincil bir kök hücre kaybı gerçekleşir (12).

Alkali veya aside maruz kalma sonrasında akut olarak kornea epitel hasarı görülmeyebilir. Gözün zarar gören yüzeyi iyileştirme kapasitesi, limbal kök hücrelerdeki hasarın boyutuna bağlı olarak değişir. Limbal kök hücre popülasyonunda herhangi bir zarar olmadığında yüzeydeki büyük epitelyal hasar kolaylıkla onarılabilir. Ancak, alkali ve asit yanıkları genellikle limbal kısma zarar verebilecek boyutta olduğu için hasarın onarımı pek mümkün olmaz. Pek çok vakada limbal kök hücre popülasyonunun yetersizliğine bağlı olarak korneda konjunktivalizasyon görülür (28).

Özellikle iş kazası olarak oküler yüzeyin sıcak metal objelere veya sıvılara maruz kalması sonucunda ortaya çıkan termal yanıklarda daha ciddi oküler hasarlar meydana gelir ve limbal kök hücre popülasyonunda belirgin bir azalma görülür (29,30).

Bunların dışında iyatrojenik limbal kök hücre eksikliği, cerrahi işlem sırasında limbusda meydana gelen travma sonucunda kök hücrelerin kaybı ile gerçekleşir. Cerrahi işlem sonrasında pilokarpin, beta blokörler, antibiyotikler, kortikosteroidler ve mitomisin C gibi ilaçların kronik olarak topikal tedavide kullanılması sonucunda da kornea epitelini zarar görür ve meydana gelmiş olan kök hücre hasarı gelişerek oküler yüzey hastalıkları görülür. Hastalığın klinik tablosunda korneanın çevresinden başlayarak yavaşça merkeze doğru yayılan bir epitelyopati söz konusudur. Bu durum özellikle daha önceden yapılmış olan limbal cerrahi bölgesine doğru özelleşir (31).

2.2.2. Otoimmün Hastalıklar

Oküler yüzey hastalıklarına neden olan otoimmün hastalıklar “Stevens-Johnson” sendromu ve oküler sikatrisyel pemfigoid olarak sıralanabilir. Bu rahatsızlıklarda inflamasyon, hastalığın ilerlemesinde primer etkindir (12).

“Stevens-Johnson” sendromu, deri ve mukoz membranları etkileyen otoimmün bir hastalıktır. Akut fazı takip eden kronik bir fazla karakterize bir durumdur. Akut fazda hastalarda şiddetli konjunktivit ve korneal anomaliler görülür. Akut belirtiler hafifledikten sonra kronik faz devreye girer. Kronik fazda göz

kapağını kapsayan ve konjunktivada goblet hücrelerinin kaybıyla sonuçlanan konjunktival skarlaşma ve konjunktival keratinizasyona neden olan ciddi göz kurulukları meydana gelir. Akut inflamasyon fazında büyük oranda limbal kök hücrelerin kaybı ve hasarı meydana gelir. Kronik fazda meydana gelen gözyaşı anomalileri sonucunda kalıcı epitel hasarları, konjunktivalizasyon, stromal opaklaşma ve ülser meydana gelir. Hastalığın fazına göre tedavi stratejileri değişir. Hastalığın erken döneminde oküler yüzeydeki inflamasyonların tedavisine yönelik olarak antiinflamatuvar ilaçlar ve antibiyotikler kullanılır. Hastalığın kronik fazında tedavi inflamasyonu azaltmaya yöneliktir. Daha ileri aşamalarda limbal kök hücre nakli gerekebilir (32-35).

Oküler sikatrisyel pemfigoid mukoz membranları etkileyen sistemik bir hastalıktır. Konjunktivada subepitelyal skarlaşma ve fibrozis ile karakterize bir durumdur. Hastalığın ilerleyen dönemlerinde gözyaşı ile ilgili problemler ortaya çıkar. Göz kapağı anomalileri gelişebilir. Hastalığın tedavisi inflamasyonun azaltılmasına yöneliktir. Topikal tedavi genellikle yetersiz kaldığından kortikosteroidler, azatioprin ve metotreksat gibi ilaçlar kullanılarak sistemik tedavi yapılır (36).

2.3. Oküler Yüzey Hastalıklarında Tedavi Yaklaşımları

Oküler yüzey hastalıkları esas olarak limbal epitelyal hücre eksikliğine bağlı olarak ortaya çıktığından, tedavideki asıl amaç bu hücrelerin yerine konmasıdır. Bu amaçla klinikte pek çok girişimsel tedavi yaklaşımı bulunmaktadır. Bu yöntemler, konjunktival limbal otogreft transplantasyonu (CLAU), canlı donör kaynaklı konjunktival limbal homogreft transplantasyonu (LR-CLAL), kadaverik keratolimbal allogreft transplantasyonu (KLAL), kombine konjunktival-keratolimbal homogreft transplantasyonu (C-KLAL), amniyotik membran transplantasyonu ve yapay doku transplantasyonu olarak sıralanabilir (37,38).

2.3.1. Konjunktival Limbal Otogreft Transplantasyonu (CLAU)

Konjunktival limbal otogreft transplantasyonu, kişinin sağlıklı gözünden alınan limbal dokunun konjunktiva epiteli ile birlikte aynı kişinin hasta gözüne transplantasyonudur. Bu teknik, hastanın yalnızca tek gözünde limbal epitel hücre eksikliği bulunduğu zaman geçerli bir yöntemdir. En büyük avantajı cerrahi işlem

sonrasında immünosupresyon gerektirmemesidir. Limbal epitel kök hücre eksikliği olan hastalarda genellikle iki göz de etkilendiğinden bu durum yöntemin kullanılabilirliğini kısıtlamaktadır. Özellikle her iki gözün de etkilenmediği, kısmi limbal hücre kaybının bulunduğu durumlarda oldukça etkili bir yöntemdir (39).

2.3.2. Canlı Donör Kaynaklı Konjunktival Limbal Homograft Transplantasyonu (LR-CLAL)

Canlı donör kaynaklı konjunktival limbal homograft transplantasyonu, sağlıklı donörden alınan limbal dokunun konjunktiva epiteli ile birlikte hasta göze transplantasyonudur. Genel olarak konjunktival limbal otograft transplantasyonuna benzer teknik ve mekaniğe sahip olan bir yöntemdir. Kişinin kendi dokusu yerine başka bir doku kullanıldığından özellikle iki gözünde de limbal epitel eksikliği olan hastalar için uygundur. Kişinin kendi dokusu kullanılmadığından cerrahi işlem sonrasında doku reddi riski söz konusudur. Bu risk özellikle inflamasyonlu gözlerde daha fazladır (12).

2.3.3. Kadavra Kaynaklı Keratolimbal Homograft Transplantasyonu (KLAL)

Kadavra kaynaklı keratolimbal homograft transplantasyonu, kadavra gözünden alınan limbal dokunun kornea epiteli ile birlikte hasta göze transplantasyonudur. Bu teknikte çok fazla sayıda limbal epitel hücrenin transferi mümkündür. Çok ciddi boyutlarda limbal epitel eksikliği olan hastaların tedavisinde kullanılır. Genellikle her iki gözünde de problem olan hastalar için uygundur (38).

2.3.4. Kombine Konjunktival ve Keratolimbal Homograft Transplantasyonu (C-KLAL)

Kombine konjunktival ve keratolimbal homograft transplantasyonu, kadavra kaynaklı keratolimbal doku ile canlı limbal homograftın birlikte transplantasyonudur. Bu yöntem özellikle “Stevens-Johnson” sendromu, oküler sikatrisyel pemfigoid ve bazı kimyasal yanıklar gibi konjunktival hasarın olduğu durumlarda yararlıdır (12).

2.3.5. Amniyotik Membran Transplantasyonu

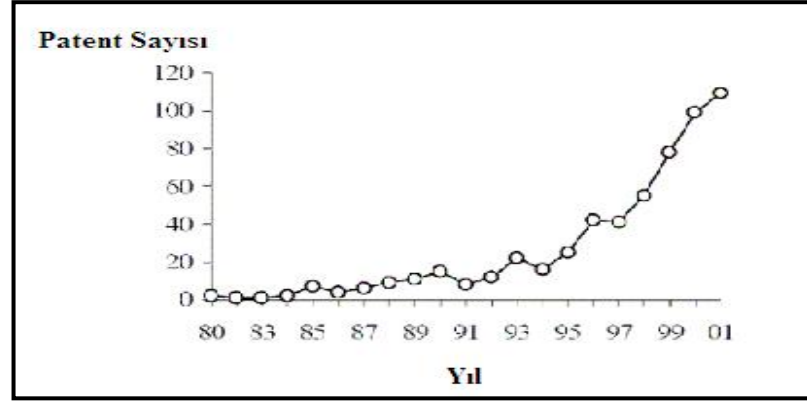
Amniyotik membran, plasentanın en iç tabakası olup, stromal matriks, kalın bazal membran ve tek tabakalı epitel membran olmak üzere üç tabakadan oluşur.

Korneal epitelyal iyileşmeyi sağladığı ve oküler yüzeydeki inflamasyonu azalttığı bilinmektedir. Bu etkisini konjunktival bileşenleri taklit ederek, proteolitik aktiviteyi azaltarak ve goblet hücrelerinin yoğunluğunu artırarak gösterdiği bilinmektedir. Amniyotik membran esas olarak limbal epitel hücreleri içermediğinden limbal epitel hücre eksikliğinin tedavisinde tek başına yeterli olmamaktadır. Ancak hücre proliferasyonunu ve epitel migrasyonunu tetikleyerek cerrahi işlemi sonrasında oküler yüzeyin reepitelizasyonunu sağlamaktadır. Aynı zamanda sahip olduğu antiinflamatuvar etkisi sebebiyle de cerrahi işlemi desteklemektedir. Bu nedenle limbal hücre transplantasyonu ile kombine olarak kullanılması önerilmektedir (40-43).

2.3.6. Doku Mühendisliği

Doku mühendisliği, biyomalzeme, hücre ve biyosinyal (yapışma ve büyüme faktörleri) bileşenlerini tek başlarına veya birlikte kullanarak canlı dokuların tamiri ya da yeniden yapılanması için biyoloji, kimya ve mühendislik ilkelerinin uygulanmasıdır. Doku mühendisliği terimi ilk olarak 1987’de California Üniversitesi’nden Dr. Y. C. Fung tarafından dile getirilmiştir. Buna ilaveten, bilimsel çevrelerin doku mühendisliği konusuna odaklanmasında iki makale çok etkili olmuştur. Bunlardan biri Nerem tarafından 1991’de hücre mühendisliği konusunda, diğeri ise Langer ve Vacanti tarafından 1993’de doku mühendisliği başlığı altında yayınlanmıştır (44,45). Temel bilimciler, malzeme bilimcileri, mühendisler, hücre biyologları, eczacılar ve klinisyenlerin ortak çabalarıyla günümüzde doku mühendisliği disiplinlerarası bir alan haline gelmiştir. Şu anda doku mühendisliğinde geline son nokta klinikte kullanılabilecek çeşitli ürünlerin tasarlanmasıdır. Doku mühendisliği alanında alınan patentler incelendiğinde 1990 yılında dünyada toplam 20 patent alınmış iken bu sayının 2001 yılında 100’ ü aştığı görülmektedir (Şekil 2.3) (46). Amerikan Gıda ve İlaç Kurumu (FDA) ve Avrupa İlaç Ajansı (EMA) verilerine bakıldığında bu kurumlar tarafından doku mühendisliği ürünlerine dair regülasyonların oluşturulduğu ve bu ürünlerin **“hücre bazlı tıbbi ürünler”** adı altında değerlendirildiği görülmektedir. Bu durum doku mühendisliği bilim dalının büyük bir ivme ile geliştiğini ve sanayiye uygulanabilir hale geldiğini göstermektedir. Günümüzde doku mühendisliği klinikte kullanılabilecek çeşitli ürünlerin geliştirilebileceği aşamaya gelmiştir. Doku mühendisliğinin ilk ticari ürünü

olan deri dokusu (Dermagraft®), başta ABD ve İngiltere olmak üzere pek çok ülkede piyasaya sunulmuştur. Kıkırdak, geçici karaciğer-destek sistemleri, pankreas konusunda klinik çalışmalar halen devam etmektedir. Araştırmacılar kemik, karaciğer, kornea, sinir, kalp kapakçıkları, boşaltım sistemi, damarlar ve diğer birçok yumuşak doku ile yoğun biçimde çalışmalarını sürdürmektedirler (47).



Şekil 2.3. 1980-2001 yılları arasında dünyada doku mühendisliği alanında alınan patentlerin yıllara göre dağılımı (46).

Doku mühendisliği uygulamalarında farklı yaklaşımlar bulunmaktadır. Bunlardan ilkinde yeni dokunun oluşumu için yalnızca biyomalzeme kullanılırken, hücre nakli olarak adlandırılan diğer bir yaklaşımda sadece hücreler kullanılarak tedavi amaçlanmaktadır. Diğer yaklaşımlarda ya biyomalzeme ile biyosinyal bileşenleri birlikte kullanılmakta ya da biyomalzeme, hücre ve biyosinyal bileşenlerinin üçünün bir arada kullanılması söz konusu olmaktadır. Hücre çoğalmasını yeni doku veya organları oluşturacak şekilde yönlendirmek ve gerekli mekanik desteği sağlamak için biyomalzemelerden üç boyutlu doku iskeleleri üretilir (48).

Doku mühendisliğindeki son gelişmeler, oküler yüzey hastalıkları sonucunda zarar görmüş olan korneanın onarımında da başarıyla uygulanmıştır (49-52). Gelişmiş ülkeler de dahil olmak üzere dünyadaki pek çok ülkenin ciddi bir kornea donör kıtlığı ile karşı karşıya bulunması, göz bankası sisteminin göz kaynaklarında yalnızca çok küçük bir artışa neden olması ve sağlıklı donör doku oranının oldukça düşük olması sebebiyle, oküler yüzey hastalıkları sonucunda zarar görmüş korneanın

doku mühendisliği teknikleri kullanılarak tedavi edilmesi klinikte uygun bir alternatif olarak görülmektedir (49,50). Lee ve arkadaşları yaptıkları bir çalışmada, poli(laktid-ko-glikolid)/kolajen doku iskeleleri hazırlamışlar ve bu iskeleleri model olarak yüzeyde yara oluşturulmuş tavşan gözüne implante etmişlerdir. Sonuçta doku iskelelerine yükledikleri hücreler ve iskeleyi oluşturan destek materyalin etkisiyle yaralı gözde iyileşme gözlemlemişlerdir (51). Yine Oh ve arkadaşları yaptıkları çalışmada, poli(laktid-ko-glikolid) doku iskeleleri hazırlamışlar ve bu iskeleleri korneada ciddi hasar oluşturulmuş tavşan gözüne implante etmişlerdir. Bu işlem sonrasında yaralı tavşan gözünü reepitelizasyona bakarak izlemişler ve 9 gün sonunda tamamen reepitelizasyona bağlı olarak iyileşme gözlemlemişlerdir (52).

2.4. Doku İskeleleri

2.4.1. Tanımı ve Özellikleri

Doku mühendisliğinin temel bileşenlerinden biri olan doku iskeleleri, hücre büyümesini ve gelişmesini etkin bir biçimde desteklemek amacıyla doğal veya sentetik polimerler kullanılarak hazırlanan ve esas olarak polimerik matriks ve hücrelerden oluşan sistemlerdir (50,53-56).

Doku iskelelerinden beklenen başlıca özellikler; biyoparçalanır ve biyoyumlu olması, parçalanma hızının doku oluşum hızı ile uyumlu olması, yeterli mekanik dayanıklılığa sahip olması, gözenekli ve geniş yüzey alanına sahip olması, hücrelerin yapışmasını, gelişmesini ve işlevini artıran bir yüzey kimyasına sahip olması ve istenilen şekil ve boyutta üretilebilir olmasıdır (46,57).

Doku iskeleleri esas olarak gerçek doku mikroçevresine benzer bir şekilde üç boyutlu yapıda hazırlanmışlarından yapay bir hücre dışı matriks olarak düşünülmektedirler. Doku iskeleleri, rejenerasyonu istenen vücut bölgesine implante edilerek uygulanırlar. Doku iskelelerinin hücrelerin bir arada tutulması, düzenlenmesi, üretilmesi ve istenen dokuyu oluşturmaları gibi fonksiyonlarının yanında temel görevleri, çevre dokulardan doku iskelesine göç eden hücrelerin büyümesini yönlendirmektir. Bunun yanında kontrollü ilaç salımı uygulamaları için de potansiyel sistemlerdir (57-60).

2.4.2. Doku İskelesi Hazırlamada Kullanılan Matriks Maddeleri

Doku iskelelerinin hazırlanmasında genellikle biyolojik olarak parçalanabilen polimerler kullanılır. Polimerlerin yapısal çeşitlilikleri ve istenen kimyasal, yüzeylerarası, mekanik ve biyolojik fonksiyonlarını sağlayan yüzey ve iç özelliklerinin tam anlaşılması gerekliliği nedeni ile polimer seçimi formülasyon tasarımında büyük önem taşımaktadır. Doku iskelesi hazırlamada kullanılan doğal ve sentetik polimerler Tablo 2.1’de özetlenmiştir.

Tablo 2.1. Doku iskelesi hazırlamada kullanılan doğal ve sentetik biyoparçalanabilir polimerler (61).

Sınıflandırma	Polimer
• Doğal Polimerler	
Protein bazlı polimerler	Kolajen, albumin, jelatin
Polisakkaritler	Agaroz, aljinat, hiyaluronik asit, dekstran, kitin ve kitosan
• Sentetik Polimerler	
Poliesterler	Poli(laktik asit), poli(glikolik asit), Poli(laktik-ko-glikolik asit), poli(hidroksi bütirat), poli(ϵ -kaprolakton), poli(β -malik asit)
Polianhidritler	Poli[bis(p-karboksifenoksi propan-ko-sebasik asit)], poli(yağ asidi dimer-ko-sebasik asit)
Poliamidler	Poli(imino karbonatlar), poli(amino asitler)
Fosfor bazlı polimerler	Polifosfatazlar, polifosfonatlar
Diğerleri	Poli(siyano akrilatlar), poli(üretanlar)

Sentetik biyoparçalanabilir polimerlerin en önemli üstünlüğü önceden belirlenen özelliklere (molekül büyüklüğü, yük, hidrofobisite, parçalanma süresi) göre sentezlenebilmeleri ve yüksek saflıkta, kolay ve ucuz bir şekilde üretilmeleridir (61,62). Bunun yanında istenen şekli kolaylıkla alabilmeleri ve yüksek mekanik dayanıklılığa sahip olmaları da üretim ve implantasyon açısından kolaylık sağlar. Sentetik polimerler bu avantajlarına karşın hücre büyümesi ve yayılması açısından dezavantajlara sahiptirler. Doğal polimerler hücre adezyonu, büyümesi ve yayılması açısından oldukça uygun olmalarına rağmen mekanik dayanıklılıklarının oldukça

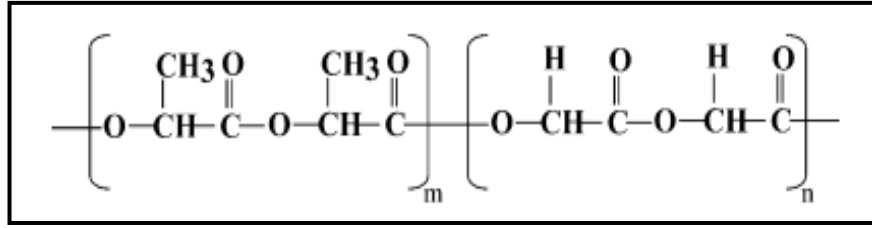
düşük olması nedeniyle implantasyon sırasında problemlere neden olurlar. Dolayısıyla, doku iskelesi materyallerinin seçimi ve sentezi her spesifik uygulama için farklıdır ve bu seçim polimerin fiziksel, kütle aktarım ve biyolojik etkileşim özellikleri değerlendirilerek yapılır.

Doku iskelesinin fiziksel özelliklerini mekanik karakteristiği ve parçalanma davranışı belirler. Doku iskelesi hazırlanıp yerleştirildikten sonra istenilen özelliklerdeki doku oluşumu, polimerin makroskopik ve mikroskopik seviyedeki mekanik özelliklerine bağlıdır. Makroskopik seviyede, doku iskelesi oluşan dokuları taşımalı, mikroskopik seviyede ise hücrelerin büyümesi, farklılaşması ve doku oluşumu için bulunduğu organizma ile uyumlu olmalıdır. Bu sistemlerin mekanik performansı, polimerin özelliklerinden, jelleşme koşullarından ve şişme-parçalanma özelliklerinden etkilenmektedir. Doku iskelelerinin parçalanması yeni doku oluşum hızı ile uyumlu olmalı ve biyoaktif moleküllerin kontrollü salımına yeterli olmalıdır. Bu sistemlerin kütle aktarım özelliği, proteinlerin, hücrelerin ve atık ürünlerin doku iskelesi ortamlarına aktarımıyla bağlantılıdır ve kütle aktarımı difüzyon ile gerçekleşmektedir. Doku iskelelerinin biyolojik özellikleri hücrelerin yapışma, proliferasyon ve farklılaşma gibi çeşitli fonksiyonlarını devam ettirebilecek şekilde olmalıdır. Tüm bu özellikler dikkate alındığında; doku iskeleleri hazırlanırken sentetik ve doğal polimer kombinasyonlarının kullanılması ile ideal üç boyutlu sistemlerin oluşması sağlanır (58).

2.4.2.1. Poli(laktik-ko-glikolik asit) (PLGA)

Son yıllarda, sentetik polimerlerden poliester türevleri olan poli(laktik asit) (PLA), poli(glikolik asit) (PGA) ve özellikle poli(laktik-ko-glikolik asit) (PLGA) biyoyoumlu ve biyoparçalanır özellikleri nedeniyle tıpta ve farmasötik alanda sıklıkla tercih edilmektedir (63-66).

Düşük molekül ağırlıklı PLGA, laktik ve/veya glikolik asitin direkt kondenzasyonu (poliesterifikasyon) ile sentezlenir. Bu polimerlerin yüksek molekül ağırlıklı türevlerinin sentezi ise siklik dimerlerin (laktik ve/veya glikolik asitlerin siklik diesteri) halka açılması polimerizasyonu ile gerçekleştirilir (64,65). PLGA' in kimyasal formülü Şekil 2.4' de görülmektedir.



Şekil 2.4. PLGA'in kimyasal formülü (67).

Bu polimerlerin cerrahi suture üretimindeki avantajları pek çok araştırma tarafından gösterilmiştir (64,65). Oluşturdukları lifli yapılar, yüksek mekanik dayanıklılık, düşük immünojenite ve toksisite, mükemmel biyouyumluluk ve uygun biyoparçalanma kinetiği gibi pek çok üstünlüğe sahiptir. Ayrıca laktid/glikolid polimerlerinin suture materyali olarak bağ rekonstrüksiyonu, trakeal replasman, vasküler doku, sinir onarımı ve dental onarım gibi uygulamalarda sunduğu avantajlar bu polimerleri biyomedikal uygulamalar için çekici kılmıştır (64-66).

Bu polimerlerin biyoparçalanabilirlik, biyouyumluluk ve doku reaksiyon kinetiği pek çok araştırmacı tarafından incelenmiştir (63-66). Çok sayıda ilaç grubunun taşınması için tasarlanan mikroküre, mikrokapsül, nanopartikül, pellet, implant ve film gibi taşıyıcı sistemlerin yapımında da yine bu polimerler kullanılmıştır. Özellikle ilaç taşınmasında Amerikan İlaç ve Gıda Kurumu (FDA) tarafından onaylı olmaları ve kolaylıkla ilaç taşıyıcı sistem olarak tasarlanabilmeleri nedeniyle laktid/glikolid polimerleri bu alanda sıklıkla kullanılmıştır (63-66). FDA tarafından onay almış PLGA bazlı ticari ürünlerin bazıları Tablo 2.2' de özetlenmiştir.

Tablo 2.2. PLGA bazlı ticari ürünler (68).

Ürün Adı	Etkin Madde	Dozaj Şekli	Endikasyon
Lupron Depot®	Löprolid asetat	Mikroküre	Prostat kanseri
Nutropin Depot®	Büyüme hormonu	Mikroküre	Pediyatrik büyüme hormonu eksikliği
Suprecur® MP	Buserelin asetat	Mikroküre	Prostat kanseri
Decapeptyl®	Triptorelin pamoat	Mikroküre	Prostat kanseri
Sandostatin LAR® Depot	Oktreotid asetat	Mikroküre	Akromegali
Somatuline® LA	Lanreotid	Mikroküre	Akromegali
Trelstar™ Depot	Triptorelin pamoat	Mikroküre	Prostat kanseri
Arestin®	Minosiklin	Mikroküre	Periodontal hastalık
Risperidal®	Risperidon	Mikroküre	Antipsikotik

PLGA' in kimyasal, fiziksel ve biyolojik özelliklerinin tam olarak anlaşılabilmesi için öncelikli olarak bu polimeri oluşturan monomerlerin (PLA ve PGA) özelliklerinin incelenmesi gerekir. PLA doğada optik olarak aktif sterik formda (L-PLA) ve inaktif olarak rasemik formda (D,L-PLA) bulunur (63,65,66). L-PLA polimer zincirindeki düzgün yapı nedeniyle yarı kristal yapıya sahipken, D,L-PLA polimer zincirindeki düzensizlikler nedeniyle amorf yapıya sahiptir (64,66). Bu özelliğinden dolayı, D,L-PLA, L-PLA' ya göre polimer matriksinde ilacın daha homojen dağılmasına neden olduğundan özellikle ilaç taşıyıcı sistemlerin tasarlanmasında daha fazla kullanılır (66). PGA, PLA' nın yapısında bulunan metil gruplarını içermediğinden yüksek kristal yapıya sahiptir. Laktik asit glikolik asitten daha hidrofobik olduğundan laktik asit oranı yüksek olan PLGA kopolimerleri daha az hidrofilik olup, daha az su absorbe eder ve daha yavaş parçalanır (63,64).

Molekül ağırlığı, polidispersite indeksi gibi fiziksel özellikler bu polimerlerin mekanik gücünü dolayısıyla da ilaç taşıyıcı sistem olarak karakteristiklerini etkiler (64,65). Bu özellikler aynı zamanda polimerin biyoparçalanma oranını ve hidrolizini de kontrol eder. Ticari PLGA polimerleri molekül ağırlığı ile ilişkili olan intrinsik viskozite değeri ile karakterize edilir (64).

Mekanik güç, şişme davranışı, hidrolize uğrama kapasitesi ve biyoparçalanma hızı PLGA kopolimerinin kristal özelliklerinden doğrudan etkilenir (61). PLGA' in kristal özellikleri, kopolimer zincirindeki monomer bileşenlerinin tipine ve molar oranına bağlı olarak değişir (63). Elli:elli (50:50) oranında laktik ve glikolik asit taşıyan PLGA polimerleri daha yüksek oranda laktik asit taşıyan PLGA polimerlerine göre daha hızlı parçalanır (65). L-PLA ve PGA' den sentezlenen PLGA polimerleri kristal yapıda bulunurken, D,L-PLA ve PGA' den hazırlanan PLGA polimerleri doğada amorf yapıda bulunur (64,65). Ayrıca % 70' in altında PGA taşıyan PLGA polimerlerinin doğada amorf yapıda bulunduğu bilinmektedir (69). Polimerlerin kristalinite derecesi ve erime noktası molekül ağırlığı ile doğrudan ilişkilidir (64,65).

PLGA kopolimerlerinin camsı geçiş sıcaklıkları (T_g) fizyolojik sıcaklığın (37°C) üzerinde olduğundan doğada camsı yapıda bulunur. Bu nedenle sahip oldukları katı zincir yapısı, bu polimerlere biyoparçalanır bir sistem olarak tasarlanabilmelerini sağlayan yüksek mekanik dayanıklılık kazandırır (64,65). Kopolimer bileşimindeki laktid içeriğinin ve molekül ağırlığının azalmasıyla PLGA polimerlerinin T_g değerlerinin azaldığı bilinmektedir (70).

Seçilen PLGA polimerlerinin doku iskelesi halinde formüle edilebilmesi için yüksek mekanik özelliklere sahip olması gerekir. Molekül ağırlığı, kopolimer bileşimi (laktid/glikolid oranı), kristalinite derecesi ve polimeri oluşturan zincirlerin geometrik düzeni gibi özellikler polimerin mekanik dayanıklılığını etkilemektedir (63-65).

PLGA' in biyolojik olarak parçalanması şişen polimerde rastgele hidrolitik zincir kesilmesi ile meydana gelir (63-65). Biyolojik olarak parçalanma işlemi sırasında tekli polimer zincirlerinin yarılmaması sonucunda PLGA zincirlerinde bulunan karboksilik asit son gruplarının sayısının arttığı ve bu durumun söz konusu işlemi katalizlediği bildirilmiştir (64,66).

PLGA kopolimerlerinin biyolojik olarak parçalanma hızı, polimer zincirindeki laktik ve glikolik asitlerin molar oranına, polimerin molekül ağırlığına, kristalinite derecesine ve polimerin T_g değerine bağlıdır (64,65). PLGA' in biyolojik olarak parçalanması için 3 fazlı bir mekanizma önerilmektedir (71):

1. rastgele zincir yarılmaması fazı: polimerin molekül ağırlığı önemli bir şekilde azalır ancak kayda değer bir kütle kaybı ve çözünür monomer ürünleri meydana gelmez.

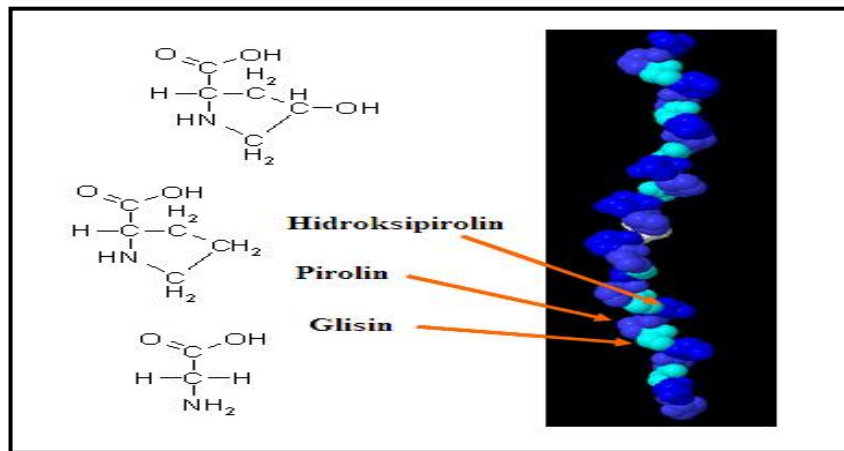
2. orta faz: bu fazda molekül ağırlığının azalmasına hızlı bir kütle kaybı ve çözünür oligomer ve monomer ürünlerinin oluşumu eşlik eder.

3. polimer çözünmesinin tamamlanma fazı: çözünür oligomerik parçalardan çözünür monomer ürünleri oluşur.

PLGA' in biyolojik olarak parçalanmasında enzimlerin rolü net değildir. PLGA biyolojik olarak parçalandığında laktik ve glikolik asit meydana gelmektedir. Laktik asit, trikarboksilik asit döngüsüne girerek metabolize edilir ve vücuttan CO₂ ve H₂O olarak uzaklaştırılır. Glikolik asit ya değişmeden böbreklerden atılır ya da trikarboksilik asit döngüsüne girerek vücuttan CO₂ ve H₂O şeklinde uzaklaştırılır (63-66).

2.4.2.2. Kolajen

Kolajen, tüm insan ve hayvan dokularında en çok bulunan doğal bir proteindir. Özellikle insanlarda toplam vücut proteinlerinin 1/3' ünü oluşturur (72,73). Kıkırdakta % 50, korneada % 68 ve deride % 74 oranında bulunur. Ekstrasellüler matriksin en temel bileşenidir. Yapısında % 35 glisin, % 11 alanin bulunur ve diğer proteinlerden farklı olarak % 12 pirolin ve % 9 hidroksipirolin içerir (74). Kolajen, α zincirleri olarak bilinen üç polipeptid zincirinin üçlü heliks konfigürasyonu halinde bulunduğu farklı moleküllerden oluşur (Şekil 2.5).



Şekil 2.5. Kolajenin kimyasal yapısı (75).

Kolajen molekülünü oluşturan heliks yapısının uzunluğuna, yapısına ve helikal formda olmayan kısımların büyüklüğüne göre 46 farklı polipeptid zincirinden oluşan toplam 28 tip kolajen molekülü tanımlanmıştır (Tablo 2.3).

Tablo 2.3. Kolajen tipleri ve vücut içerisindeki dağılımı (76).

Tip	Sınıf	Doku
I	Lifimsi	Dermis, tendon, kemik, bağ doku, kornea
II	Lifimsi	Kıkırdak, vitröz
III	Lifimsi	Deri, kan damarları, ince bağırsak
IV	Ağımsı	Bazal membranlar
V	Lifimsi	Kemik, dermis, kornea, plasenta
VI	Ağımsı	Kemik, kıkırdak, kornea, dermis
VII	Lifimsi	Dermis, mesane
VIII	Ağımsı	Dermis, beyin, kalp, böbrek
IX	Lif-bağlı	Kıkırdak, kornea, vitröz
X	Ağımsı	Kıkırdak
XI	Lifimsi	Kıkırdak, omurga
XII	Lif-bağlı	Dermis, tendon
XIII	Membran-bağlı	Endotelial hücreler, dermis, göz, kalp
XIV	Lif-bağlı	Kemik, dermis, kıkırdak
XV	Çoklu üçlü heliks	Kapiller damarlar, testis, böbrek, kalp
XVI	Lif -bağlı	Dermis, böbrek
XVII	Membran-bağlı	Epitelial hücreler
XVIII	Çoklu üçlü heliks	Bazal membranlar, doku
XIX	Lif-bağlı	Bazal membranlar
XX	Lif-bağlı	Kornea
XXI	Lif-bağlı	Mide, böbrek
XXII	Lif-bağlı	Doku kavşakları
XXIII	Membran-bağlı	Kalp, retina
XXIV	Lifimsi	Kemik, kornea
XXV	Membran-bağlı	Beyin, kalp, testis
XXVI	Lif-bağlı	Testis, yumurtalık
XXVII	Lifimsi	Kıkırdak
XXVIII	-	Dermis, siyatik siniri

Tip I kolajen, özellikle deri, tendon ve kemik gibi dokularda bulunan en yaygın kolajen çeşitidir. Değişik aminoasit bileşimine sahip ilk ikisi $\alpha 1$ ve $\alpha 2$ olarak adlandırılan üç farklı zincirden oluşur. Tip II kolajen özellikle hiyalin kıkırdak bileşiminde bulunur ve birbirinin aynısı olan iki α zincirinin farklı bir polipeptid zinciriyle kondenzasyonu sonucu oluşur. Tip III kolajen, tip I kolajene bağlı olarak çok sınırlı miktarlarda bulunur ve kan damarlarında en yaygın olarak bulunan kolajen türüdür (77). Tip IV kolajen ise, bazal membranlarda zayıf lifimsi ağlar şeklinde bulunur (78).

Kolajen nötral proteazlar tarafından gerçekleştirilen ataklara karşı dayanıklıdır. Nötral pH' da yalnızca çinko içeren, yaklaşık 40-50 kDa ağırlığındaki metalloproteinaz tipindeki kolajenazlar, kolajenin heliks yapısının N-terminal bölgesine bağlanabilir (79). Bu kolajenazlar yüksek aktivite gösterebilmek için genellikle kofaktör olarak kalsiyuma ihtiyaç duyar (80). Kolajen molekülleri genellikle dış kısımdan başlayarak parçalanır. Kolajenaz enzimi kolajenin üçlü heliks yapısının yüzeyinden bağlanır ve bu aşamadan sonra enzim dış kısımdan başlayarak yapının iç kısmına doğru parçalanmaya başlar (81). Üçlü heliks yapı bozulduktan sonra jelatinazlar ve spesifik olmayan proteinazlar kolajen molekülünü küçük peptidllere ve aminoasitlere parçalar (78). Dış kaynaklı kolajenin uygulanmasından sonra kolajen materyalinin yapısına göre kompleks bir hücresel cevap başlar. Makrofajlardan ve nötrofillerden katepsin salgılanmasıyla kolajenin parçalanması asidik bir yolağa girer (82). Bu yüzden spesifik olmayan proteolitik parçalanmayı arttırmak için kolajen asit ile muamele edilebilir (83). İlaç taşıyıcı kolajen sistemleri, içerdiği etkin maddeye bağlı olarak değişik parçalanma kinetikleri gösterebilir. Steroidler immün sistemi modifiye ederek parçalanmayı yavaşlatır, büyüme faktörü ve immünostimulanlar ise hücresel cevabı artırarak parçalanmayı hızlandırır (84).

İmplant, film, sünger ve diğer ilaç taşıyıcı sistemlerin tasarlanmasında kullanılan kolajenin izolasyonunda genellikle deri ve tendon gibi kolajen içeriği zengin dokulardan faydalanılır. Bu amaçla sığır, domuz, koyun ve insan plasentası kolajen izolasyonunun yapıldığı türlerdir (85).

Kolajen doğal bir materyal olması, düşük immünojenisiteye sahip olması ve normal olarak insan vücudunda bulunmasından dolayı biyomedikal uygulamalar için çekici bir maddedir. Kolajen, film, sünger, jel, enjektabl çözeltiler, dispersiyonlar

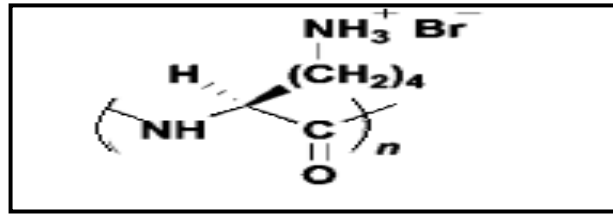
gibi tıbbi amaçla kullanılabilecek pek çok sistemin tasarlanmasında kullanılır (86-89). Aynı zamanda, kaplama ajanı olarak hücre büyümesi ve yapışmasını artırmak amacıyla da kullanılır (51,90). Kolajenin oftalmoloji, yara iyileşmesi, tümör tedavisi ve doku mühendisliğinde ilaç taşıyıcı sistem olarak kullanılmasına ilişkin çalışmalar devam etmektedir (91-117). Kolajenin ilaç taşıyıcı sistem olarak uygulamaları Tablo 2.4’ de özetlenmiştir.

Tablo 2.4. Kolajen içeren ilaç taşıyıcı sistemler ve uygulamaları (91-117).

Uygulama Bölgesi	Dozaj Şekli	İlaç	Endikasyon	Referans
Göz	Insert	Gentamisin	İnfeksiyon	91
		Pilokarpin	Glokom	92
		Eritromisin	İnfeksiyon	93
Göz	Shield	Tobramisin	İnfeksiyon	94
		Polimiksin B sülfat	İnfeksiyon	95
		Trimetoprim	İnfeksiyon	96
		Vankomisin	İnfeksiyon	97,98
		Pilokarpin	Glokom	99
		Steroidler	İnflamasyon	100
		Gentamisin	İnfeksiyon	101,102
Göz	Nanopartikül	Siklosporin	Homograft implantasyon	103,104
Göz	Jel	Keterolak	İnflamasyon	105
Genel uygulama	İnjektasyon	Vinbalstin	Lokal kanser tedavisi	106
		Sisplatin	Lokal kanser tedavisi	107,108
Kemik	Sünger	Gentamisin	İnfeksiyon	109-112
Deri	Sünger	Gentamisin	İnfeksiyon	113,114
Genel uygulama	Sünger	Büyüme faktörleri	Doku yenilenmesi	115
Deri	Mikropartikül	Tetrakain	Lokal anestezi	116
		Lidokain	Lokal anestezi	116
		Retinol	Doku yenilenmesi	117

2.4.2.3. Poli-l-lizin (PLL)

Poli-l-lizin (PLL), l-lizinin karboksil ve amino grupları arasındaki peptid bağı ile karakterize edilen poli-amino asit yapılı, katyonik bir moleküldür (Şekil 2.6). Değişik sentez yöntemleri kullanılarak, lineer konformasyonda veya dendritik polipeptid olarak değişik molekül ağırlıklarında (1000-300,000 Da) PLL sentezlemek mümkündür (118).



Şekil 2.6. Poli-l-lizin hidrobromürün kimyasal yapısı (118).

PLL ilk defa 1977 yılında Shima ve Sakai tarafından *Streptomyces albulus* bakteri kültüründe “Dragendorff pozitif” bir materyal olarak keşfedilmiştir (119). Bu madde *Streptomyces albulus* mutant zincirinden aerobik fermentasyon yoluyla sentezlenir (120). PLL’ in sudaki çözünürlüğü yüksek olup, izoelektrik noktası yaklaşık 9’ dur. Sudaki çözeltisi 100°C de 30 dakika kaynatılıp, 120°C de 20 dakika otoklavlandığında parçalanma göstermez ve polimer zinciri stabil kalır (121). PLL’ in miktar tayini anyonik bir boya olan metil oranj kullanılarak kolorimetrik olarak yapılır (122). Doğal ortamlardaki biyolojik parçalanmasına dair çok az sayıda çalışma bulunmasına rağmen PLL’ in mikrobiyal parçalanmasını katalizleyen pek çok enzim tespit edilmiştir (123-125).

Bakteri ve mantarlara karşı güçlü antimikrobiyal aktivitesi, spor üremesi üzerindeki güçlü inhibitör etkisi ve farelerde yapılan pek çok çalışma sonucu toksik olmadığının gösterilmesi sonucu PLL, diğer koruyucularla kombine olarak düşük konsantrasyonlarda gıda koruyucusu olarak kullanılır (126-128). Gıda koruyucusu olarak kullanımının yanı sıra biyomedikal alanda da çeşitli uygulamalara sahiptir. Biyomedikal alanda ilaç taşıyıcı sistem tasarımı, gen taşınmasında ve kaplama ajanı olarak sıklıkla kullanılır. Biyoparçalanır, biyouyumlu olması, katyonik yapıya sahip olmasından dolayı biyomedikal uygulamalar için ideal bir maddedir. PLL, nanopartikül, mikroküre, lipozom, film ve jel gibi tıbbi amaçla kullanılabilecek pek

çok sistemin tasarlanmasında ve kaplama ajanı olarak hücre büyümesi ve yapışmasını arttırmak amacıyla doku mühendisliğinde kullanılır (129). Daha önceki çalışmalarda PLL ile kaplanmış yüzeylerde hücre büyümesi ve yapışmasının artırıldığı gösterilmiştir (129,130). PLL' in ilaç taşıyıcı sistem olarak uygulamaları Tablo 2.5' de özetlenmiştir.

Tablo 2.5. Poli-l-lizin içeren ilaç taşıyıcı sistemler ve uygulamaları (131-144).

Dozaj Şekli	İlaç	Endikasyon	Referans
Nanopartikül	Risedronat	Kemik metastazı	131
Dendrimer	Doksorubisin	Kanser	132
Dendrimer	Kamptotesin	Kanser	133
Dendrimer	DNA	Hepatit	134
Misel	Doksorubisin	Kanser	135
Dendrimer	Metotreksat	Kanser	136
Film	Kemik morfojenik proteini-2 (BMP-2)	Kemik yenilenmesi	137
Nanopartikül	Mitomisin C	Kanser	138
Lipozom	DNA	Gen taşınımı	139
Mikroküre	Transforming büyüme faktörü- β (TGF- β)	Kıkırdak yenilenmesi	140
Dendrimer	-	Korneal neovaskülarizasyon	141
Dendrimer	siRNA	Gen taşınımı	142
Nanopartikül	Vasküler endotelial büyüme faktörü	Miyokardiyal iskemi	143
Hidrojel	Bazik fibroblast büyüme faktörü	İskemi	144

2.4.3. Doku İskelesi Hazırlama Yöntemleri

Doku iskelesi hazırlamada kullanılan yöntemler geleneksel yöntemler ve bilgisayar destekli tasarım yöntemleri olmak üzere ikiye ayrılır.

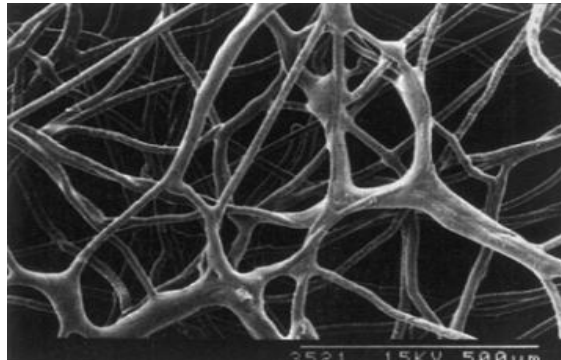
2.4.3.1. Geleneksel Yöntemler

2.4.3.1.1. Fiber Bağlama

Fiber bağlama yöntemi en eski doku iskelesi üretim yöntemleri arasında yer almaktadır. Bu yöntem, biyoparçalanır poliglikolik asit (PGA) yapıdaki ameliyat ipliklerinin doku iskelesi olarak kullanılabilmesi amacıyla geliştirilmiştir. Fiber bağlama yöntemi poli-l-laktik asit (PLLA) ile bağlama ve PLLA ile kaplama olmak üzere iki şekilde yapılabilmektedir (145).

PLLA ile bağlama yönteminde öncelikle PGA' dan oluşan örülmemiş ağ dokusu bir kalıba yerleştirilir. PLLA, PGA' yı çözmeyen bir çözücü içinde çözündürülür ve bu polimer çözeltisi PGA örülmemiş ağ dokusu üzerine dökülür. Kurutma işlemi ile çözücü uzaklaştırılır ve geriye içinde PGA ağ dokusunun hapsediği bir PLLA-PGA kompoziti kalır. Bu yapı PGA' nın erime sıcaklığının üzerine kadar ısıtılır ve birbirine temas eden PGA iplikçikleri eriyerek fiziksel olarak birleşir. Yapıda bulunan PLLA aynı çözücü kullanılarak uzaklaştırılır. Kurutma işlemi sonunda PGA' dan oluşan, yapısal bütünlüğü sağlanmış, ağsı formda bir doku iskelesi üretilmiş olur (Şekil 2.7) (146).

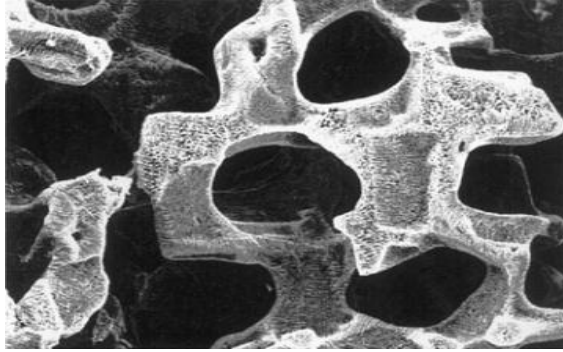
PLLA ile kaplama yönteminde ise PGA' dan oluşan örülmemiş ağ dokusu teflon silindire sarılır. Dönmekte olan silindire PLLA çözeltisi spreylendikten sonra kurutma yapılır. Bu yöntem ile PGA iplikçikleri PLLA ile birbirine bağlanır ve böylece üzerinde PLLA katmanı bulunan içi boş tüpsel formda PLLA-PGA kompozitleri üretilmiş olur (147).



Şekil 2.7. Fiber bağlama yöntemi ile hazırlanmış PGA doku iskelesi (146).

2.4.3.1.2. Çözücü Dökümü - Parçacık Uzaklaştırma

Bu yöntemde polimer uygun çözücü içinde çözündürüldükten sonra bu çözeltinin içine porojen adı verilen katı parçacıklar ilave edilir. NaCl, şeker, jelatin ve parafin porojen olarak kullanılabilen maddelerdir. Daha sonra bu karışım, yapışmayacağı düz bir yüzeye dökülür ve çözücü uzaklaştırılır. Böylece içinde porojenlerin bulunduğu membran formunda katı polimerik yapı elde edilir. Bu yapı porojen maddenin içinde çözüneceği herhangi bir çözücü ile etkileştirildiğinde porojen yapıdan uzaklaştırılır. NaCl, şeker ve jelatin için çözücü olarak su, parafin için hekzan kullanılmaktadır. Bu işlem sonrasında porojenlerin terk ettiği bölgeler gözenek olarak kalır (148,149). Dolayısıyla bu yöntemle, gözenek boyutu ve özellikleri kontrol edilebilen membran formundaki doku iskeleleri üretilmiş olur (Şekil 2.8). Porojenin özellikleri değiştirilerek farklı özelliklerde doku iskelesi üretimi mümkündür. Bu yöntemdeki kısıtlama, polimerik çözeltinin çözücünün yapıdan uzaklaştırılabilmesi için yüzeye ince bir tabaka halinde dökülmesi nedeniyle ince membranların üretilmesidir. Aksi takdirde çözücünün uzaklaştırılmasıyla ilgili sorunlar oluşmaktadır (148).



Şekil 2.8. Çözücü dökümü-parçacık uzaklaştırma yöntemiyle hazırlanmış doku iskelesi (150).

2.4.3.1.3. Membran Laminasyonu

Membran laminasyonu, çözücü dökümü-parçacık uzaklaştırma yönteminde üç boyutlu doku iskelelerinin üretilmemesi probleminin aşılması için geliştirilmiştir. Bu yöntemde, polimer için uygun olan bir çözücü, çözücü dökümü-parçacık uzaklaştırma yöntemi ile üretilmiş olan polimerik membranların arasına sürülüp üst üste dizilerek üç boyutlu doku iskeleleri elde edilir. Üst üste dizilerek birbirine

yapıştırılan membranların gözeneklilik özellikleri aynı olmalı ve yapıştırma bölgeleri ayırt edilmeyecek kadar düzgün olmalıdır. Yapıştırma için kullanılan bazı organik çözücülerin çok toksik olması ve doku iskelesinin biyouyumluluğunu etkilemesi bu yönteme bazı sınırlamalar getirmektedir (151,152).

2.4.3.1.4. Eriyik Kalıplama

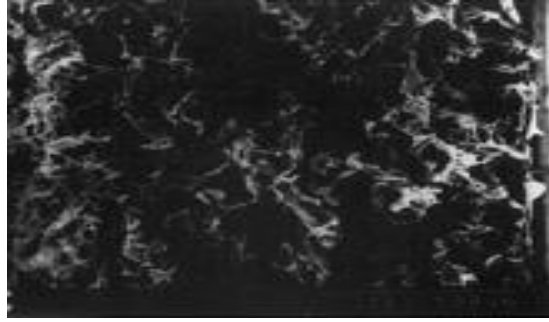
Çözücü dökümü-parçacık uzaklaştırma yönteminde üç boyutlu doku iskelelerinin üretilmemesi probleminin aşılması için geliştirilen bir diğer yöntem eriyik kalıplama yöntemidir. Bu yöntemde, çözücü kullanılmadan polimer ve porojen katı halde karıştırıldıktan sonra, karışım istenilen geometriye sahip kalıba dökülür. Kalıba ısı uygulanarak polimer eriyik hale getirilir. Sonrasında doku iskelesi, porojenin içinde çözüneceği çözücü ile etkileştirilerek porojen yapıdan uzaklaştırılır ve istenilen geometriye sahip, üç boyutlu, gözenekli doku iskeleleri üretilmiş olur (153,154).

2.4.3.1.5. Ekstrüzyon

Ekstrüzyon, genellikle endüstriyel polimerlerin hazırlanmasında kullanılan bir yöntemdir. Bu yöntemde, katı haldeki polimer ve porojen ekstrudere ilave edilir. Ekstruderin içinde bulunan vida bir yandan polimer-porojen karışımını makinenin çıkışına doğru iletirken bir yandan da uyguladığı sıkıştırma hareketi ile polimerin eriyik hale geçmesini sağlar. Ekstruderin çıkışına gelen eriyik haldeki polimer ve porojen basınçla dışarı atılır ve çıkışta bulunan başlığın özelliklerine bağlı olarak farklı kalınlıkta, fiber formunda doku iskelelerinin üretimi gerçekleştirilir (155,156).

2.4.3.1.6. Gaz Köpükleştirme

Toksik organik çözücülerin dezavantajlarını ortadan kaldırmak için geliştirilen bir yöntemdir. Bu yöntemde basınçla kalıplama ile üretilmiş olan polimer diskleri belirli süreler boyunca yüksek basınçlı karbondioksit maruz bırakılmaktadır. Böylece polimerik yapıların karbondioksit ile etkileşmiş olan yüzeylerinde kapalı gözenekler oluşmaktadır (Şekil 2.9). Bu yöntem yüzeylerin gözeneklendirilmesi için uygun olmakla beraber doku iskelelerinde tercih edilen içsel bağlantılı gözenek yapısı sağlanamadığından başka yöntemler ile birlikte yüzey gözenekliliği için kullanılmaktadır (157).



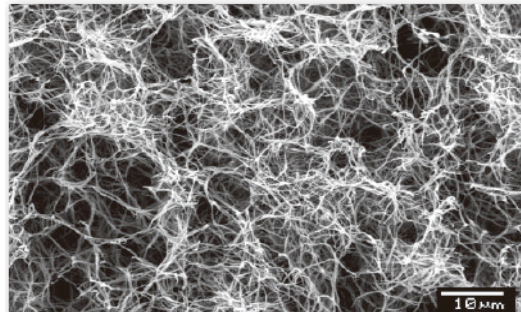
Şekil 2.9. Gaz köpükleştirme yöntemiyle hazırlanmış PLLA doku iskelesi (158).

2.4.3.1.7. Faz Ayrımı

Bu yöntemde, polimer çözeltisi soğutulduktan sonra ayrılmış olan çözücü fazı yapıdan uzaklaştırılır ve geriye kalan polimerce zengin faz katılarak doku iskelesini oluşturur. Faz ayrımı yöntemi, sıvı-sıvı ve katı-sıvı faz ayrımı olmak üzere ikiye ayrılır.

Sıvı-sıvı faz ayrımında polimer, düşük donma noktası sıcaklığına sahip ve kolay süblimleşebilen bir çözücü içinde çözündürülür ve sonrasında bu çözelti çözücünün donma noktasının altına soğutulur. Donan çözücü yapıdan vakumlu kurutma ile süblimleştirilerek gözenekli doku iskeleleri üretilmiş olur (Şekil 2.10) (158,159).

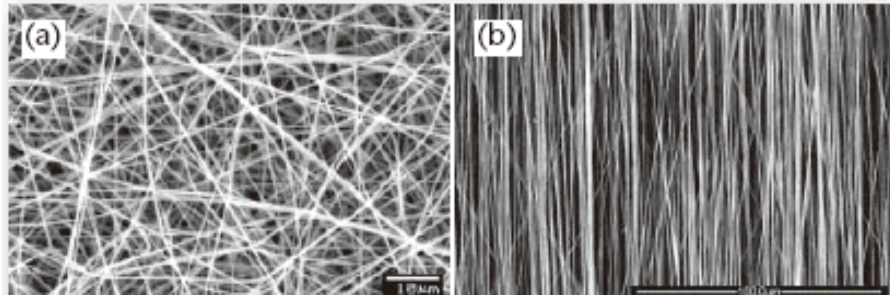
Katı-sıvı faz ayrımında ise polimer uygun çözücüde çözündürüldükten sonra sistem soğutulur ve çözücü kristalleri oluşur. Çözücü kristalleri yapıdan vakumlu kurutma yöntemi ile uzaklaştırıldıktan sonra gözenekli doku iskeleleri üretilmiş olur (160,161).



Şekil 2.10. Faz ayrımı yöntemiyle hazırlanmış PLA doku iskelesi (162).

2.4.3.1.8. Elektro-eğirme

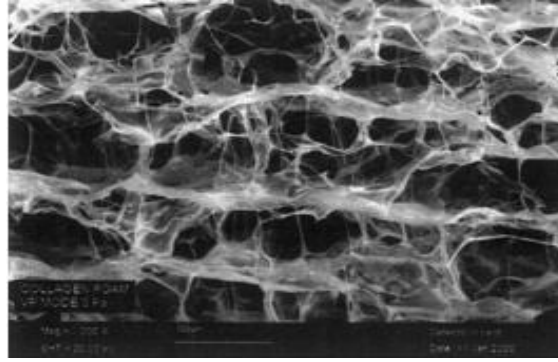
Bu yöntemde polimer çözeltisi damlatılmak üzere bir enjektörde bekletilir. Polimerik çözelti ve toplama plakasına yüksek gerilim uygulanarak eğirme işlemi başlar. Bu aşamada polimer çözelti damlasına iki farklı kuvvet grubu etki eder: damlacığın damlamasını engelleyen yüzey gerilim kuvvetleri ve damlacığı harekete geçirip eğrilmesini sağlayan elektriksel kuvvetler. Elektriksel kuvvetler yüzey gerilim kuvvetini yendiğinde polimerik çözelti eğrilir ve toplama panelinde fiber formunda ürün birikir. Oluşan fiberlerin kalınlığı damlatma noktası ile toplama paneli arasındaki mesafeye doğrudan bağlıdır. Bu mesafe arttıkça fiberlerin çapı küçülmektedir. Bu yöntemle nanofiberlerden oluşan ince membranların üretimi mümkün olmaktadır (Şekil 2.11) (163,164).



Şekil 2.11. a, b) Elektro-eğirme yöntemiyle hazırlanmış PLLA doku iskelesi (162).

2.4.3.1.9. Dondurarak Kurutma

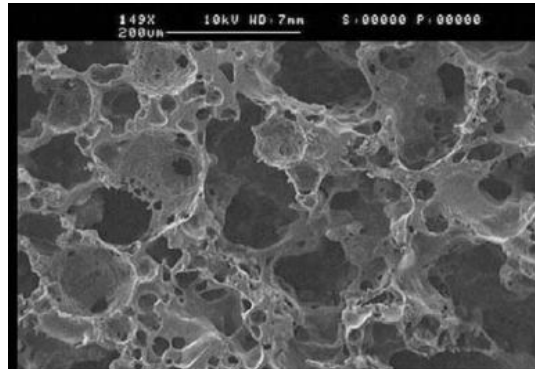
Sünger formundaki üç boyutlu doku iskelelerinin üretimi için kullanılan bu yöntemde hazırlanan polimer çözeltileri uygun şartlar altında dondurulmakta, sonrasında donmuş olan doku iskeleleri liyofilize edilmektedir. Liyofilizasyon işlemiyle polimer çözücüsü uzaklaştırılarak makro gözenekli doku iskeleleri elde edilmiş olur (Şekil 2.12). Bu yöntemle yüksek spesifik por yüzey alanına sahip kalın doku iskeleleri üretmek mümkündür. Bu nedenle biyoaktif molekül yüklü ilaç taşıyıcı sistem tasarımında bu yöntem sıklıkla kullanılır (165).



Şekil 2.12. Dondurarak kurutma yöntemiyle hazırlanmış kolajen-glikozaminoglikan doku iskelesi (166).

2.4.3.1.10. Emülsiyon Dondurarak Kurutma

Bu yöntemde hidrofobik polimer çözeltisine sulu faz eklenerek emülsiyon hazırlanır. Bu emülsiyon dondurulduktan sonra liyofilizasyon işlemine tabi tutulur ve çözücünün uzaklaştırılmasını takiben sünger formundaki üç boyutlu doku iskeleleri hazırlanmış olur (Şekil 2.13) (167,168).



Şekil 2.13. Emülsiyon dondurarak kurutma yöntemiyle hazırlanmış PLGA doku iskelesi (167).

2.4.3.1.11. Yerinde Doku İskelesi Üretimi

Yerinde doku iskelesi üretimi yöntemi, özellikle kemik ve kıkırdak gibi, hasar olduğunda mekaniksel bütünlüğün acil olarak geri kazanılması gereken katı dokuların tedavilerinde yararlı olan bir yöntemdir. Kemik çimentosu olarak da bilinen biyoparçalanır olmayan polimetilmetakrilat (PMMA), mekanik özelliklerin geri kazanımı için hasarın bulunduğu bölgeye doldurularak kullanılmaktadır (169).

Yerinde doku iskelesi üretimi yöntemine bir başka örnek olarak polipropilenfumarat verilebilir. Oda sıcaklığında sıvı olan bu polimer, operasyon sırasında N-vinil pirolidon (N-VP) ile çapraz bağlanarak jel formuna geçer ve hasarlı bölgeye doldurularak katılaşması için bir süre beklenir. Böylece hasarın geometrisine uygun biyoparçalanır bir doku iskelesi üretimi gerçekleştirilir (170).

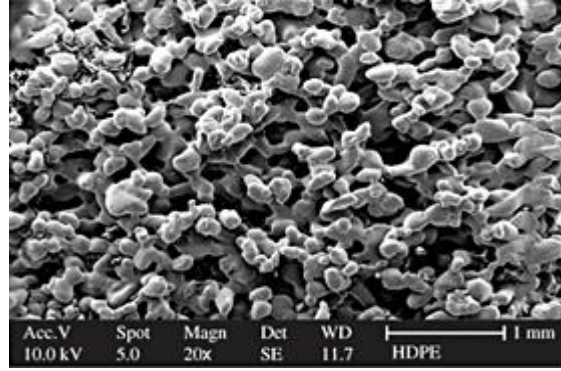
2.4.3.2. Bilgisayar Destekli Tasarım Yöntemleri

Bilgisayar destekli tasarım yöntemleri, özellikle doku iskelesi mimarisinin ve gözenek özelliklerinin kontrolü açısından geleneksel yöntemlere göre pek çok üstünlüğe sahiptir. Üretimden önce bilgisayar ortamında geometrisi tasarlanan doku iskelesi tamamen bu tasarıma uygun bir şekilde ısı, ışık, yapıştırıcı ve kalıp kullanarak üretilmektedir. Bu yöntemlerin diğer bir özelliği ise çok küçük boyutlarda da üretimin gerçekleştirilebilmesidir (171).

2.4.3.2.1. Isı Kullanarak Doku İskelesi Üretimi

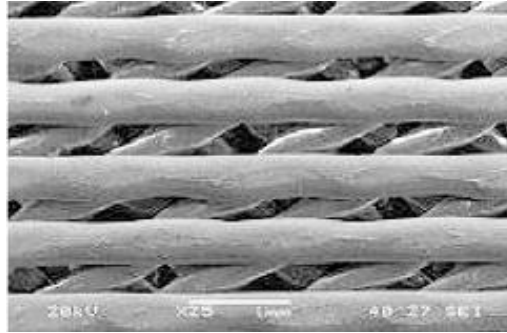
Bilgisayar destekli tasarım yöntemlerinde ısı kullanıldığı zaman işlem, polimer filmlerinin lazer ile istenilen geometride kesilip ısı varlığında birleştirilmesi gibi basit olabilir. Bununla birlikte “Selective Laser Sintering” (SLS) ve “Fused Deposition Modelling” (FDM) gibi çok daha karışık yöntemler de mevcuttur. Isı işlemi doğal polimerlerin yapısını bozabildiği için genellikle bu yöntemler sentetik polimerler için uygundur (171).

SLS yönteminde, katı fazda bulunan toz halindeki polimer bir yüzeye dağıtılmaktadır. Daha sonra x-y düzleminde hareket edebilen bir lazer, daha önce bilgisayarda tasarlanan geometriye uygun bir şekilde hareket ederek bu tozun üzerine lazer uygulaması yapar. Lazere maruz kalan bölgelerde sıcaklık artışına bağlı olarak polimerin erimesi, birleşmesi ve sonrasında katılaşması gerçekleşir. Böylece istenilen geometriye sahip polimerik bir katman elde edilir. Bu katman üzerine tekrar polimer tozu atılıp lazer uygulaması yapıldığında katman katman istenilen geometriye ulaşılır (Şekil 2.14) (171,172).



Şekil 2.14. SLS yöntemi ile hazırlanmış polietilen doku iskelesi (172).

FDM yönteminde ise, polimere ısı uygulanarak eriyik hale getirilir ve bu eriyik bir başlıktan akıtılarak polimer lif formuna getirilir. Bu başlık bilgisayarda hazırlanan tasarıma uygun olarak lifleri belirli bir uzunlukta keser ve belirli bir düzende dizer. Bu işlem katman katman devam ettiğinde tasarlanan geometriye uygun bir doku iskelesi üretimi mümkün olur (Şekil 2.15) (171,173).



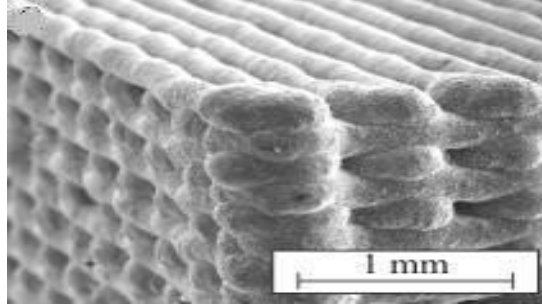
Şekil 2.15. FDM yöntemi ile hazırlanmış polietilen doku iskelesi (173).

2.4.3.2.2. Işık Kullanılarak Doku İskelesi Üretimi

Işık kullanılarak yapılan bilgisayar destekli tasarım yöntemlerinde “Stereo Litografik” uygulamalar ön plana çıkmaktadır.

Stereo litografi üretim düzeneğinde, içi polimer çözeltisi ile dolu olan bir havuz, bu havuz içinde z ekseninde hareket eden bir asansör ve x-y düzeneğinde hareket edebilen bir ultraviyole lazer bulunmaktadır. Bilgisayarda tasarlanan geometriye göre lazer çözelti yüzeyine uygulama yapar ve sonuç olarak lazerle etkileşen noktalar katılır. Bunu takiben asansör aşağıya doğru hareket eder ve katılan polimerik yapının üstü bir miktar çözelti ile kaplanır. Lazer uygulaması

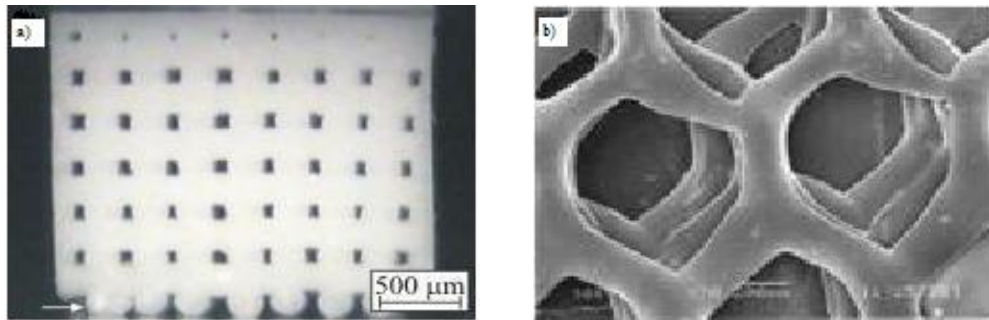
devam ettikçe doku iskelesinin yüksekliği artmakta, böylece istenilen geometride doku iskelelerinin üretimi gerçekleştirilmektedir (Şekil 2.16) (174,175).



Şekil 2.16. Stereolitografik yöntem ile hazırlanmış hidroksiapatit doku iskelesi (176).

2.4.3.2.3. Yapıştırıcı Kullanılarak Doku İskelesi Üretimi

Yapıştırıcı kullanılarak üretim yapılırken kullanılan özelleşmiş uygulamalara örnek olarak “3-Dimensional Printing” (3-DP) ve “Pressure Assisted Micro-syringe” (PAM) gösterilebilir. 3-DP uygulamasında toz haldeki polimer bir yüzeye dağıtmakta ve bir dağıtıcı modül yardımıyla bilgisayarda tasarlandığı şekilde belirli noktalara yapıştırıcı püskürtülmektedir. Ortam polimer tozu ile sürekli olarak beslendiğinde üç boyutlu, istenilen geometriye sahip doku iskelelerinin üretimi gerçekleştirilmektedir (167). PAM yönteminde polimer, aynı zamanda yapıştırıcı görevi yapabilen bir çözücü içerisinde çözülür ve enjektör ile elde edilen fiberler belirli uzunluklarda ve düzende yerleştirilir. Bu işlem katman katman devam ettiğinde tasarlanan geometriye uygun bir doku iskelesi üretimi mümkün olur (Şekil 2.17) (177-179).



Şekil 2.17. a) 3-DP yöntemiyle hazırlanmış kalsiyum fosfat doku iskelesi (176),
b) PAM yöntemiyle hazırlanmış PLGA doku iskelesi (179).

2.4.4. Doku İskelesi Uygulama Alanları

Doku iskelelerinin üç boyutlu doku taklitçisi olarak potansiyel klinik kullanımlarının yanı sıra, canlı dokunun kompleks fizyolojisinin in vitro çalışmasını incelemek ve farmakotoksisite çalışmaları açısından hayvan modellerine alternatif oluşturmak amacıyla da kullanımı söz konusudur (180-182). Polimerik doku iskelelerinin doku rekonstrüksiyonu için kullanılması, birçok yapısal ve fonksiyonel özelliğe sahip olan polimerlerin değişik hücre tiplerinin ve etkin maddelerin taşınmasına ve idamesine imkan sağlamaları nedeniyle ümit vaad etmektedir. Bu nedenle doku iskelelerinin ilaç taşıyıcı sistem olarak kullanımı da son yıllarda sıklıkla tercih edilmektedir. Bu sistemler sayesinde ilacın kontrollü bir şekilde hedef bölgede salınması sağlanmaktadır (183). Doku iskelelerinin ilaç taşıyıcı sistem olarak kullanılmasına ilişkin literatürde yer alan çalışmalar Tablo 2.6' da verilmektedir.

Tablo 2.6. Doku iskelelerinin ilaç taşıyıcı sistem uygulamaları (184-193).

Endikasyon	Polimer	İlaç	Referans
Miyokardiyal neovaskülarizasyon	PLGA	Bazik fibroblast büyüme faktörü (bFGF)	184
Kemik rejenerasyonu	Kitosan	Kemik morfojenik proteini (BMP-2/BMP-7)	185
Cerrahi işlem sonrası enfeksiyon	PLGA	Sefoksitin sodyum	186
Kemik rejenerasyonu	Poli(ϵ -kaprolakton) /Hidroksiapatit	Tetrasiklin hidroklorür	187
Kemik rejenerasyonu	PLGA/ Hidroksiapatit	Gentamisin sülfat	188
Doku rejenerasyonu	PLA/PGA	İbuprofen	189
Doku rejenerasyonu	Kitosan/ Siklodekstrin	Ketoprofen	190
Kemik rejenerasyonu	Kitosan/ Hidroksiapatit	Deksametazon	191
Kemik rejenerasyonu	PLGA	Askorbat-2-fosfat	192
Deri rejenerasyonu	Poliüretan	Platelet türevi büyüme faktörü (PDGF)	193

Doku iskeleleri endüstriyel boyutta üretilebilen dozaj şekilleridir. Dolayısıyla piyasada doku iskelesi formunda pek çok ürün bulunmaktadır. Bu ürünlerin sayısı da her geçen gün artmaya devam etmektedir. Doku iskelesi formunda piyasada bulunan ürünler Tablo 2.7' de verilmektedir (194-196).

Tablo 2.7. Piyasada doku iskelesi formunda bulunan ürünlere ait örnekler (194-196).

Ürün	Firma	Materyal
Apligraft®	Novartis Co.	İnsan derisi
Axis™	Mentor	İnsan dermisi
Bard® Dermal Allograft	Bard	Kadavra dermisi
CorMatrix®	CorMatrix Cardiovascular Inc.	Kardiyovasküler ekstrasellüler matriks
CuffPatch™	Arthrotek	Domuz barsak mukozası
Dermagraft®	Smith & Nephew	İnsan dermisi
DurADAPT™	Pegasus Biologicals	At perikardiyumu
Dura-Guard®	Synovis Surgical	Sığır perikardiyumu
Durasis®	Cook SIS	Domuz barsak mukozası
Durepair®	TEI Biosciences	Fetal sığır derisi
Epicel®	Genzyme Tissue Repair	Otogreft epidermisi
Graft Jacket®	Wright Medical Tech.	İnsan derisi
Oasis®	Healthpoint	Domuz barsak mukozası
OrthADAPT™	Pegasus Biologicals	At perikardiyumu
Pelvicol®	Bard	Domuz dermisi
Peri-Guard®	Synovis Surgical	Sığır perikardiyumu
Permacol™	Tissue Science Laboratories	Domuz derisi
PriMatrix™	TEI Biosciences	Fetal sığır derisi
Restore™	DePuy	Domuz barsak mukozası
Stratasis®	Cook SIS	Domuz barsak mukozası
SurgiMend™	TEI Biosciences	Fetal sığır derisi
Surgisis®	Cook SIS	Domuz barsak mukozası
TissueMend®	TEI Biosciences	Fetal sığır derisi
TransCyte®	Smith & Nephew	İnsan derisi
Vascu-Guard®	Synovis Surgical	Sığır perikardiyumu
Veritas®	Synovis Surgical	Sığır perikardiyumu
Vitoss®	Orthovita Inc.	İnsan kemik dokusu bileşenleri, β -Trikalsiyum fosfat (β -TCP)
Xelma™	Molnlycke	Ekstrasellüler matriks
Xenform™	TEI Biosciences	Fetal sığır derisi

2.5. Hücre Kültürü Çalışmaları

2.5.1. Tanımı ve Tarihçesi

Hücre kültürü, spontan migrasyon, mekanik yolla veya enzimatik parçalanma ile bir dokudan ayrılmış olan hücrelerin üretilmesidir ve yaklaşık yüz yıl önce kullanılmaya başlanan bir tekniktir (196). 1907 yılında Ross Harrison plazma pıhtısında ürettiği kurbağa embriyo dokularındaki sinir liflerini incelemiş ve bu kültürde sinir liflerinin gelişimini ve büyümesini gözlemlemiştir (197). 1912 yılında Alexis Carrel yaptığı çalışmalarla tavuk embriyo bağ dokusunun üç aydan daha uzun bir süre için büyütülmesini ve tavuk embriyo kalp parçalarının üç aya kadar muhafaza edilmesini gerçekleştirmiş ve hücre kültürünün olanaklarını genişletmiştir (198). Hücre kültürü teknolojisinin gelişmesinde bir sonraki önemli aşama 1948 yılında Katherine Sanford ve arkadaşlarının tekli hücrelerin kültür ortamında büyütülmesini başarmasıdır (199). 1955 yılında Harry Eagle, hücreleri büyütmek için kullanılan kompleks doku ekstraktlarının ve pıhtıların aminoasitler, vitaminler, ko-faktörler, karbonhidratlar ve küçük miktarlarda serum proteinleri ile desteklenen tuzların karışımı ile yer değiştirebileceğini göstermiş ve hücre kültüründe yeni bir alan açmıştır (200). Her hücre tipinin fonksiyonlarını sürdürmesi için optimum besin karışımına ihtiyacı olduğunun gösterilmesi, spesifik hücre tipleri için özel kültür ortamlarının üretilmesine neden olmuştur (201). Memeli hücrelerinin kültüründe büyük ölçekli kültür tekniklerinin kullanımı ile rekombinant ekspresyon ve hibridoma tekniklerinin birleştirilmesi, rekombinant proteinlerin üretiminde kullanılan endüstriyel hücre kültürü için önemli bir adım olmuştur (202). 1992’ de Rosenfield ve arkadaşları tarafından yapılan çalışmalarda genetik olarak modifiye edilmiş hücreler çeşitli hastalıkların tedavisinde kullanılmaya başlanmıştır ki bu, hücre kültürü teknolojisinin kullanıldığı son ve önemli alanlardan biri olmuştur (203).

2.5.2. Hücre Kültürlerinin Uygulama Alanları

Günümüzde hücre kültürü çalışmalarına hemen hemen her alanda yaygın olarak rastlamak mümkündür. Bu alanlar aşağıda sıralanmıştır (204,205):

- Viral aşılar ve viral teşhis amaçlı kullanım,
- Monoklonal antikorlar ile antikor üretimi,

- Hormonların ve büyüme faktörlerinin üretimi,
- Enzim üretimi,
- Somatik gen tedavisi,
- Tümör aşılı,
- Canlı hücrelerin “grafting” amaçlı kullanımı (eritrositlerin organizma dışında transfüzyon amacıyla kullanılması, kanser tedavisinde kemik iliğinin kullanılması, limbal kök hücre eksikliğinin tedavisinde limbal epitel hücrelerinin kullanılması),
- Kompleks üç boyutlu doku tasarımı (yapay deri, kornea, karaciğer, pankreas).

2.5.3. Hücre Kültürü Ortamları

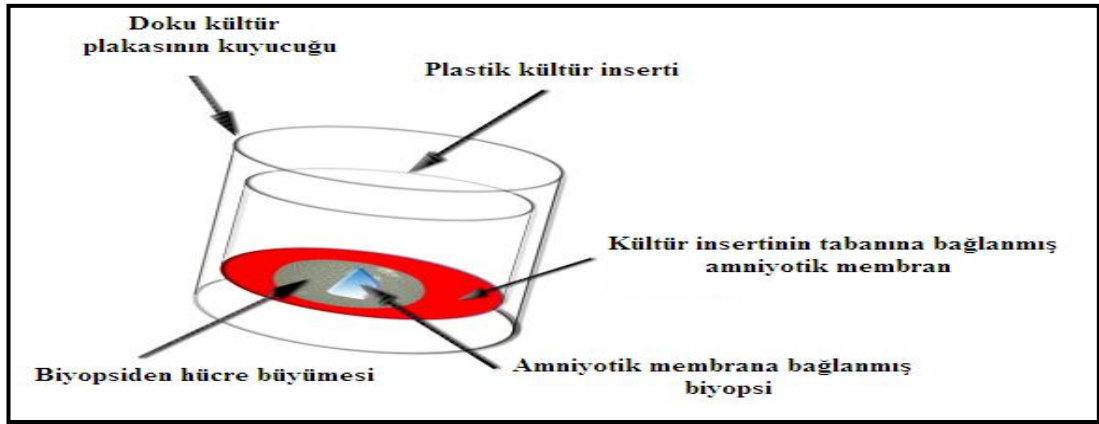
Hücre kültür ortamları hücrelerin üremesini sağlayan besin karışımlarıdır. Bu karışımlara genellikle serum ya da başka bir kompleks biyolojik sıvı (süt, embiyo ekstresi, plazma) ya da belirlenmiş hormon ve büyüme faktörleri karışımları ilave edilir. Hücre kültürü ortamları bölünen hücreleri beslemek üzere gerekli olan aminoasitler, yağ asitleri, şekerler, iyonlar, eser elementler, vitaminler gibi esansiyel besin maddelerini ve hücre için uygun kimyasal çevreyi oluşturmada gerekli olan ko-faktörleri, iyonları ve molekülleri içerir. En sık kullanılan tipleri dana serumu, fetal sığır serumu, at ve insan serumudur. Serumun bileşiminde temel olarak proteinler, polipeptidler, hormonlar, mineraller, metabolitler, besinler ve inhibitörler bulunur. Hücre kültürü ortamlarına, kültürü bakteri ve mantar kontaminasyonlarından korumak için penisilin, streptomisin, gentamisin gibi antibiyotikler ilave edilebilir. Ortamın temel gaz bileşimi O_2 ve CO_2 olup, değişik hücre tiplerinin O_2 ihtiyaçları farklıdır. Hücre kültüründe serum, ortama % 5-25 oranında eklenerek kullanılır. (202).

2.5.4. Hücre Kültürü Teknikleri

Hücrelerinin vücut dışında kültürünün yapılmasında “eksplant kültür sistemi” ve “süspansiyon kültür sistemi” olmak üzere iki ana yöntem uygulanmaktadır.

2.5.4.1. Eksplant Kültür Sistemi

Eksplant kültür sisteminde, hem substrat hem de kültürü yapılan hücreler için taşıyıcı olarak görev alan amniyotik membran kullanılır (Şekil 2.18) (206-209). Bu yöntemde hücrelerin membrana adhere olması beklenir. Amniyotik membranla hücreler arasında bağlanma gerçekleştikten sonra bu bileşim kültür ortamı içine daldırılır. Kullanılan kültür ortamı, hücrelerin proliferasyonunu sağlaması ve amniyotik membranın yüzeyini kaplaması için besinler ve mitojenleri içermelidir (210).



Şekil 2.18. Eksplant kültür sistemi (210).

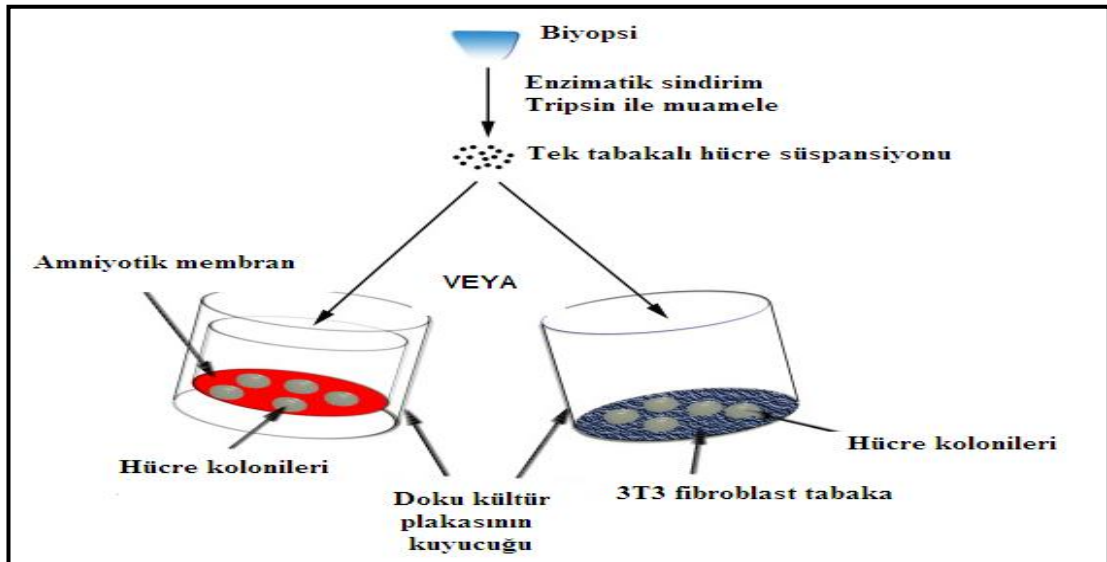
Bu yöntemin bir farklı türü 3T3 eksplant kültür sistemidir (Şekil 2.19). Bu sistemde, hücre kültür kuyucuğunun alt kısmında büyümesi engellenmiş 3T3 fibroblastlar bulunur (211). Bu hücreler embriyonik fareden izole edilen öncül hücrelerdir. Yüksek proliferasyon kapasitesine sahiptirler ve özellikle limbal epitel hücrelerin kültüründe sıklıkla kullanılırlar (212,213). Bu sistemde hem amniyotik membran hem de 3T3 fibroblastlar hücrelerin farklılaşmasını engelleyerek temel hücre popülasyonunu artırır (212,214).



Şekil 2.19. 3T3 eksplant kültür sistemi (210).

2.5.4.2. Süspansiyon Kültür Sistemi

Süspansiyon kültür sistemi enzimleri ve tripsini içerir (Şekil 2.20). Bu sistemde enzimler istenmeyen dokuları sindirir ve hücreleri istenmeyen dokulardan ayırır. Tripsin ise hücre kümelerini tek tabakalı hücre süspansiyonu şeklinde ayırır. Bu süspansiyon daha sonra amniyotik membrana veya 3T3 fibroblast besleyici tabakasını içeren doku kültür kabına ekilir. Üzerine kültür ortamı eklenir ve hücreler inkübasyona bırakılır (210).

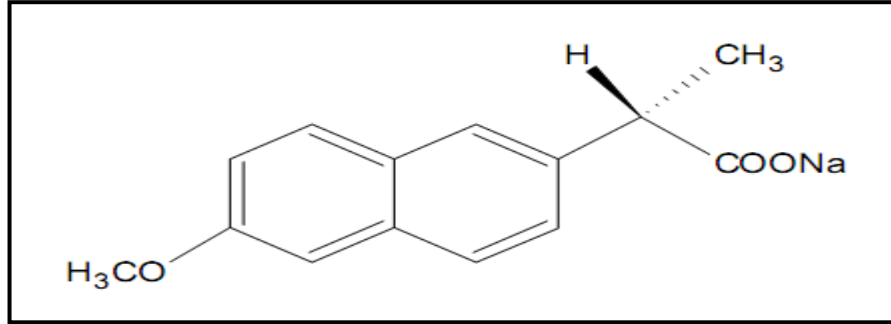


Şekil 2.20. Süspansiyon kültür sistemi (210).

2.6. Naproksen Sodyum (NS)

2.6.1. Fizikokimyasal Özellikleri

NS, S-(-)-2-(6-Metoksi-2-naftil) propiyonik asit sodium tuzu olup, analjezik ve antipiretik etkili nonsteroidal antiinflamatuvar bir ilaçtır. NS' un kimyasal yapısı Şekil 2.21' de gösterilmiştir (215).



Şekil 2.21. NS' un kimyasal yapısı (215).

NS, beyaz kremi renkte kristal yapılu bir toz olup, suda ve metil alkolde çözünür, etanolde az, asetonda çok az çözünür, kloroform ve toluende çözünmez. Kapalı formülü $C_{14}H_{13}NaO_3$ olup, molekül ağırlığı 252.24 g/mol' dür (216).

2.6.2. Miktar Tayin Yöntemleri

NS' un miktar tayini için en sık kullanılan yöntem yüksek basınçlı sıvı kromatografisi (HPLC) olup bu yöntem ile maddenin hammadde (217), tablet (218-220), plazma (221-224), idrar (225) ve intestinal perfüzyon (226) örneklerinden tayini gerçekleştirilmiştir. Bu yöntemler mobil faz, kullanılan kolon ve kullanılan dedektör bakımından farklılıklar göstermektedir.

2.6.3. Stabilite

NS' un sulu çözeltilerinde ısı ve ışığa karşı dayanıksız olduğu bildirilmiştir. NS sulu çözeltilerinde ısı ve ışıkla indüklenen hızlı ve güçlü bir parçalanma yolağına girmektedir (227).

2.6.4. Etki Mekanizması

NS diğ er nonsteroidal ilaçlarda olduğu gibi siklooksijenaz aktivitesini inhibe ederek etki gösterir. Memelilerde esas olarak iki temel siklooksijenaz tanımlanmıştır. Siklooksijenaz-1 (COX-1) normal gastrointestinal ve renal fonksiyonların sürdürülmesinde etkili olan prostaglandin sentezinden sorumludur. Siklooksijenaz-2 (COX-2) ise inflamasyonda rol alan prostaglandinlerin üretilmesinden sorumludur. Dolayısıyla COX-2 inhibisyonu antiinflamatuvar aktivitenin ortaya çıkmasını sağlar. NS ise inflamasyon sırasında COX-2 ile aktivitesi ile indüklenen prostaglandin sentezini inhibe ederek etki gösterir (228-230).

2.6.5. Farmakolojik Özellikleri

NS, romatoid artrit, osteoartrit, primer dismenore, akut gut, bursit, tendonit gibi durumlarda, dental ve ortopedik cerrahi işlemleri takiben görülen acı ve ağrılarda, vasküler kaynaklı baş ağrılarının profilaksi ve tedavisinde kullanılan nonsteroidal antiinflamatuvar bir ilaçtır (222,228,231).

Erişkinlerde mutad doz olarak günde iki kez 250-375 mg dozunda kullanılır. Bir defalık dozu 500 mg' a çıkarılabilir. Çocuklarda günde 10 mg/kg dozunda kullanımı mevcut olup, uzun süreli kullanım halinde güvenilirliği saptanmış tek propiyonik asit türevi antiinflamatuvar ilaçtır (232).

Diğ er nonsteroidal antiinflamatuvar ilaçlarda olduğu gibi naproksen sodyum da oral yolla alındığında gastrointestinal kanalda rahatsızlıklara yol açabilir. Yiyeceklerle birlikte alınması sıklıkla karşılaşılan bu yan etkinin hafifletilmesine yardımcı olur. Baş ağrısı, baş dönmesi, uyuşukluk, terleme ve depresyon yapabilir. Kronik kullanım sonrasında akut böbrek ve karaciğ er yetmezliklerine neden olabilir (232).

NS' un oftalmik olarak topikal yolla kullanımı genellikle katarakt ameliyatları ve pek çok refraktif işlemleri takiben meydana gelen operasyon sonrası inflamasyonu tedaviye yöneliktir. Ayrıca sistoid makular ödemin önlenmesi, tedavisinde ve alerjik konjunktivitlerin tedavisinde NS sıklıkla kullanılır (233). NS oftalmik olarak uygulandığında inflamasyona neden olan proteinler, polimorfonükleer lökositler ve prostaglandinlerin aköz hüümördeki seviyesini düşürerek oküler alanda meydana gelen inflamasyonun tedavisini sağlar. Bununla birlikte, NS' un % 0.2 oranındaki oftalmik çözeltilerinin etkin ve güvenilir bir

şekilde postoperatif oküler inflamasyonu önlediği ve kontrol altına aldığı bildirilmiştir (19,234).

Topikal yolla kullanılan oftalmik NS' un nazal mukozadan absorpsiyonu bronşiyel astım ve alevlenme gibi birtakım sistemik yan etkilerin ortaya çıkmasına neden olur. Topikal yolla uygulanan oftalmik NS' un lokal iritan etkisi ise konjunktival hiperemi, yanma, acı ve korneal hissizlik şeklinde ortaya çıkar. (233).

2.6.6. Farmakokinetik Özellikleri

NS, gastrointestinal kanaldan çabuk ve tam olarak absorbe edilir. (222,228,235). Absorpsiyonu besinler tarafından yavaşlatılır fakat azaltılmaz. Magnezyum ve alüminyum türevi antiasitler NS' un absorpsiyonunu azaltırken, bikarbonatlar absorpsiyonu artırır. Plazma pik konsantrasyonuna kullanımından 1-2 saat sonra ulaşır (231,235,236). Oral biyoyararlanımı % 95, dağılım hacmi 0,16 l/kg' dır. Terapötik konsantrasyonda plazma proteinlerine % 99' dan daha fazla oranda bağlanır (228). NS, karaciğerde glukronik asitle konjuge edilmek suretiyle yüksek oranda inaktif olan 6-O-desmetil naproksene metabolize olur. Hem NS hem de dezmetil naproksen açılglukronid konjugatlarına metabolize olur. NS' un yaklaşık olarak %95' i idrarla itrah edilirken itrah edilenlerin %1' inden azı değişmemiş ilaç, %66-92' si 6-O-desmetil naproksen olarak atılır (228,237). Uygulanan dozun %3' ü feçesle atılır. Emziren annelerde süt içine de itrah edilir. Eliminasyon yarılanma ömrü 13 saat kadardır (232).

3. GEREÇ VE YÖNTEM

3.1. Araç ve Gereçler

3.1.1. Kullanılan Kimyasal Maddeler

Asetik asit	Merck, Almanya
Diklorometan	Merck, Almanya
Dispaz	Gibco Invitrogen, ABD
“Dulbecco’s Modified Eagle’s / Ham’s F12” (DMEM/Ham’s F12) (1:1)	Biochrom AG, Almanya
Fetal sıgır serumu (FBS)	Biochrom AG, Almanya
Fosfat tamponu tuzu (PBS)	Biochrom AG, Almanya
“Giemsa” boyası	Merck, Almanya
Hidroklorik asit	Riedel-de H��en, Almanya
��zopropanol	Merck, Almanya
Kalsiyum klorür dihidrat	Carlo Erba Reagenti, İtalya
L-glutamin	Biochrom AG, Almanya
Metanol (HPLC grade)	Sigma Aldrich, ABD
MTT	Sigma, ABD
“May grünwald” fiksasyon ajanı	Merck, Almanya
Naproksen sodyum	Abdi İbrahim, Türkiye
Paraformaldehit	Merck, Almanya
Penisilin/Streptomisin (10000U/10000��g/mL)	Biochrom AG, Almanya
PLGA (50:50) (Resomer RG 503)	Boehringer-Ingelheim, Almanya
PLGA (75:25) (Resomer RG 753 S)	Boehringer-Ingelheim, Almanya
Poli-l-lizin hidrobromür	Sigma Aldrich, ABD
Potasyum klorür	Merck, Almanya
Sitokeratin 14	Abcam, ABD
Sodyum asetat trihidrat	Pancreac QuimicaSa, İspanya
Sodyum hidroksit	Riedel-de H��en, Almanya
Sodyum klorür	Merck, Almanya
Tip I sıgır tendon kolajeni	Sigma Aldrich, ABD
Tripsin – EDTA ��zeltisi	Biochrom AG, Almanya

Ultra saf su	Millipore, ABD
“Vectashield”	Vector Labs, İsviçre

3.1.2. Kullanılan Aletler

Diferansiyel Taramalı Kalorimetre	DSC Q 100TA Instruments, ABD
ELISA Okuyucu	ASYS-UVM 304, Avusturya
Erime Derecesi Tayin Cihazı	Thomas Hoover Melting Point Apparatus, ABD
Floresan Mikroskop	Leica, ABD
FT-IR Spektrometresi	FT-IR 420 Spec, ABD
Hassas Terazi	Shimadzu AX 200, Japonya
HPLC Sistemi	Agilent 1100 Series, Almanya
Hücre Kültürü için Flask	Greiner bio-one, Almanya
Hücre Kültür Kuyucukları	Greiner bio-one, Almanya
Işık Mikroskobu	Leica, Almanya
İnkübatör	Sanyo MCO-18AIC, Japonya
Kolon	Waters Spherisorb S10 ODS2 C ₁₈ 200 x 4.6 mm
Laminar Hava Akımlı Kültür Kabini	BHG 2000 S/D, D: Group Company, İtalya
Liyofilizatör	Heto PowerDry PL 3000, Danimarka
Manyetik Karıştırıcı	Heidolph, Almanya
Manyetik Karıştırıcı	Variomag, Almanya
Membran Filtre	Millipore, ABD
Mikropipet	Eppendorf, Almanya
pH metre	Sartorius, Almanya
Santrifüj Aleti	Hermle Z383 K, Almanya
Su Banyosu	SBD 300, Şimşek Labor Teknik, Türkiye
Steril Pipet	Greiner bio-one, Almanya
Steril Santrifüj Tüpü	Greiner bio-one, Almanya
Taramalı Elektron Miroskobu	Joel-SEM-ASID 10, Japonya
Ultra Saf Su Sistemi	Simplicity 185-Millipore, ABD
Ultrasonik Prob	Bandelin D-12207, Almanya
Ultrasonik Banyo	Branson B 220 Smith Kline, ABD
UV Spektrofotometre	UV-1800, Shimadzu, Japonya

Universal Test Cihazı	Lloyd Instruments, Internal Extensometer, ABD
Vakumlu Etüv	Salvis, KUTS11, İsviçre
Yatay Çalkalayıcı Su Banyosu	Memmert, Almanya
Yüzey Alanı&Por Büyüklüğü	Nova 2200e, Quantachrome Ins., ABD
Ölçüm Cihazı	

3.2. Yöntemler ve Deneyler

3.2.1. NS' un Fizikokimyasal Özelliklerinin İncelenmesi

3.2.1.1. UV Spektrumu

NS' un distile su veya yapay gözyaşı (SLF) içinde hazırlanan $2.5 \mu\text{g.mL}^{-1}$ konsantrasyondaki çözeltilerinin 200 - 400 nm dalga boyu aralığında UV spektrumu alınmış ve çözeltilerin gösterdiği λ_{max} değeri tespit edilmiştir. Deneyde kullanılan SLF çözeltilisini hazırlamak için 8.3 g sodyum klorür, 1.4 g potasyum klorür ve 84 mg kalsiyum klorür dihidrat tartılarak 1000 mL' ye distile su ile tamamlanmış, çözeltinin pH' sı 0,2 N sodyum hidroksit kullanılarak pH 7.4' e ayarlanmıştır (238).

3.2.1.2. FT-IR Spektrumu

NS' un FT-IR analizinde $600 - 4000 \text{ cm}^{-1}$ dalga sayısı aralığında “FT-IR 420 Spec” spektrometresi ile spektrumu çekilmiş ve değerlendirilmiştir.

3.2.1.3. Erime Derecesi Tayini

Kılcal tüp içerisine konulan NS' un erime noktası, “Thomas Hoover Melting Point Apparatus” erime derecesi tayin cihazında saptanmıştır. İçinde NS bulunan kılcal tüpler cihaza yerleştirildikten sonra, cihazın standart ısıtma hızına göre sıcaklığı yükseltilerek, NS' un erimeye başladığı sıcaklık ile erimenin tamamlandığı sıcaklık aralığı kaydedilmiştir.

3.2.1.4. Diferansiyel Taramalı Kalorimetre (DSC) Termogramı

NS' un termal analizi, “DSC Q 100” diferansiyel taramalı kalorimetre kullanılarak yapılmıştır. Alüminyum plaklar arasına yerleştirilen örneğin (3 mg) 10°C/dakika hızda, $195 - 295^\circ\text{C}$ sıcaklık aralığında, azot atmosferi altında DSC termogramları çekilmiştir. DSC cihazının kalibrasyonu indiyum standardı kullanılarak gerçekleştirilmiştir.

3.2.2. NS' un Yüksek Basıncılı Sıvı Kromatografisi (HPLC) ile Miktar Tayini

NS' un HPLC ile miktar tayininin gerçekleştirilmesi için Shimek ve arkadaşları (239) tarafından geliştirilen metod modifiye edilerek kullanılmıştır. NS' un miktar tayininde kullanılan kromatografik koşullar Tablo 3.1' de özetlenmiştir.

Tablo 3.1. NS' un HPLC ile miktar tayininde kullanılan kromatografik koşullar.

Kolon	C18 ODS2 200x4.6mm
Mobil faz	Metanol : Asetat Tamponu (pH 5.1) (50:50)
Enjeksiyon hacmi	10 µL
Akış hızı	1 mL.dk ⁻¹
Dedektör	Floresans dedektör
Dalga boyu	254 nm eksitasyon/ 352 nm emisyon
Sıcaklık	30 °C

3.2.2.1. Kalibrasyon Doğrusu

NS' un kalibrasyon doğrusunun elde edilmesi için, etkin maddenin SLF içinde 50 µg.mL⁻¹ konsantrasyonda, 6'şar adet stok çözeltisi hazırlanmış ve her birinde 0.1, 0.5, 1, 2.5, 5, 10 µg.mL⁻¹ konsantrasyonda NS olacak şekilde SLF ile seyreltmeler yapılarak 6 farklı seri oluşturulmuştur. Kalibrasyon doğrusu, çözeltilerin konsantrasyonlarına karşı elde edilen pik alanları kullanılarak çizilmiştir.

3.2.2.2. Analitik Yöntem Validasyonu

Analitik yöntem validasyonu, analizi yapılacak maddenin tayininde kullanılacak olan analitik yöntemin belirlenen koşullarda doğru, özgün ve tekrarlanabilir olduğunu garanti etmek için uygulanan prosedürdür. Metod validasyonu, kullanılan analitik yöntemin güvenilirliğinin teminatıdır (240). Bir analitik metodun değerlendirilmesinde anahtar kriterler aşağıda sıralanmıştır:

- Doğrusallık ("Linearity")
- Doğruluk ("Accuracy")
- Kesinlik ("Precision")
- Duyarlılık ("Sensitivity")
- Özgünlük ("Specificity")
- Tutarlılık ("Ruggedness")/ Tekrar Uygulanabilirlik ("Robustness")
- Stabilitate ("Stability")

3.2.2.2.1. Doğrusallık (“Linearity”)

Doğrusallık, bir analitik yöntemin belirli bir aralıkta, analizi yapılan maddenin konsantrasyonu ile deney sonuçlarının direk olarak orantılı olmasını sağlama yeteneğidir (241). Bu amaçla etkin maddenin SLF içinde $50 \mu\text{g.mL}^{-1}$ konsantrasyonda 6' şar adet stok çözeltileri hazırlanmış ve her birinde 0.1, 0.5, 1, 2.5, 5, $10 \mu\text{g.mL}^{-1}$ konsantrasyonda NS olacak şekilde SLF ile seyreltmeler yapılarak 6 farklı seri oluşturulmuştur. Kalibrasyon doğrusu, çözeltilerin konsantrasyonlarına karşı pik alanları kullanılarak elde edilmiştir.

3.2.2.2.2. Doğruluk (“Accuracy”)

Doğruluk, kullanılan analitik yöntem ile elde edilen deney sonuçlarının gerçek değerlere yakınlığını ifade eder (241). NS' un miktar tayini için kullanılan yöntemin deney içi (intra-assay) ve deneylerarası (inter-assay) doğruluğunun değerlendirilmesinde aşağıda verilen formül kullanılmıştır (Formül 3.1) (242).

$$\text{Doğruluk} = \frac{\text{Ortalama tayin edilen konsantrasyon} - \text{İlave edilen konsantrasyon}}{\text{İlave edilen konsantrasyon}} \times 100$$

(3.1)

Deney içi doğruluğun tespiti için kalibrasyon eğrisinde yer alan 3 farklı konsantrasyonda (düşük, orta, yüksek; 0.1, 1, $10 \mu\text{g.mL}^{-1}$), her bir konsantrasyondan 6 adet olacak şekilde standart çözeltiler hazırlanmış ve aynı gün içinde arka arkaya ölçümleri gerçekleştirilmiştir.

Deneyler arası doğruluğun tespiti için kalibrasyon eğrisinde yer alan 3 farklı konsantrasyonda (düşük, orta, yüksek; 0.1, 1, $10 \mu\text{g.mL}^{-1}$), her bir konsantrasyondan 6 adet olacak şekilde standart çözeltiler hazırlanmış ve birbirini takip eden 3 gün tayin edilmiştir.

3.2.2.2.3. Kesinlik (“Precision”)

Kesinlik, bir analitik yöntemin tekrarlanabilirlik derecesinin ölçümü olarak tanımlanır (241). Spesifik analiz koşulları altında elde edilen bağımsız analitik sonuçlar arasındaki uyumun derecesidir. Kesinlik, yalnız tesadüfi hataların dağılımı

ile ilişkilidir, gerçek değerlerle ilgisi yoktur. Bir analitik yöntemin kesinliği, istatistiksel açıdan yeterli değerlendirmenin yapılacağı sayıda, aynı derişimde örnek ardı ardına ölçülerek, örnekler için varyasyon katsayısı (VK) hesaplanarak değerlendirilir. Kesinlik, tekrarlanabilirlik (“repeatability”) ve tekrar elde edilebilirlik (“reproducibility”) olarak ifade edilir (240).

Tekrarlanabilirlik (“Repeatability”)

Kullanılan analitik yöntemin farklı deney zamanlarında güvenilirliğinin kanıtlanması için yapılmaktadır.

Tekrarlanabilirliğin tespiti için, kalibrasyon eğrisinde yer alan 3 farklı konsantrasyonda (düşük, orta, yüksek; 0.1, 1, 10 $\mu\text{g.mL}^{-1}$) standart çözeltiler hazırlanmış ve aynı çözeltilerin pik alanları HPLC ile 6 kez ayrı ayrı okutulup, hesaplanmıştır. Pik alanlarına karşılık gelen derişimler için VK değerleri hesaplanmıştır. Analitik yöntemin tekrarlanabilirliğinin uygunluğunun gösterilmesi için VK’ nın % 2’ den küçük olması önerilmektedir (241).

Tekrar Elde Edilebilirlik (“Reproducibility”)

Aynı konsantrasyondaki çözeltiden hareketle, aynı laboratuvar, aynı analist ve aynı cihaz kullanılarak gerçekleştirilen ölçümlerde uyum ve uygunluk incelenir. Üç farklı derişim düzeyinde uygun sayıda bağımsız çözelti kullanılarak aynı gün ve farklı günlerde yapılır.

Deney içi tekrar elde edilebilirliğin tespiti için kalibrasyon eğrisinde yer alan üç farklı konsantrasyonda (düşük, orta, yüksek; 0.1, 1, 10 $\mu\text{g.mL}^{-1}$) her bir konsantrasyondan 6 adet olacak şekilde standart çözeltiler hazırlanmış ve aynı gün içinde arka arkaya ölçümleri gerçekleştirilmiştir.

Deneyler arası tekrar elde edilebilirliğin tespiti için kalibrasyon eğrisinde yer alan 3 farklı konsantrasyonda (düşük, orta, yüksek; 0.1, 1, 10 $\mu\text{g.mL}^{-1}$) her bir konsantrasyondan 6 adet olacak şekilde standart çözeltiler hazırlanmış ve birbirini takip eden 3 gün tayin edilmiştir.

Tekrar elde edilebilirliğin değerlendirilmesinde, pik alanlarına karşılık gelen derişimler için varyasyon katsayısı değerleri hesaplanmıştır. Analitik yöntemin tekrar edilebilirliğinin uygunluğunun gösterilmesi için gün içi ve günler arası kesinlik çalışmalarında VK % 2’ den küçük olmalıdır (240).

3.2.2.2.4. Duyarlılık (Sensitivity)

Saptama Sınırı (“Limit of Detection”)

Analizi yapılan maddenin kalitatif olarak saptanabildiği en düşük konsantrasyondur. Bu değer, sinyal:gürültü oranının 3:1 olduğu konsantrasyon ile ifade edilir (241,242).

Miktar Tayin Sınırı (“Limit of Quantitation”)

Analitik yöntemin belirlenen şartlarında, analizi yapılan maddenin kabul edilebilir kesinlik ve doğruluk ile tayin edilebildiği en düşük konsantrasyon olarak tanımlanır. Bu değer, sinyal:gürültü oranının 10:1 olduğu konsantrasyon ile ifade edilir (241,242).

3.2.2.2.5. Özgünlük (“Specificity”)

Özgünlük, bir analitik yöntemin sadece amaçlanan bileşenleri tayin edebilme yeteneği olup, sayısal değeri yoktur. Özgünlüğün tayini için, hazırlanan doku iskelesi formülasyonlarında kullanılan yardımcı maddelerin (poli(laktik-ko-glikolik asit) (PLGA) (50:50), PLGA(75:25), kolajen, poli-l-lizin) formülasyonlarda bulunan konsantrasyonlardaki (%16.6 (a/h), %16.6 (a/h), %0,001 (a/h), %0,003 (a/h)) çözeltileri hazırlanmış ve etkin madde ile aynı şartlarda pik verip vermediklerinin incelenmesi için HPLC kromatogramları alınmıştır. Ayrıca, ilaç yükleme ve in vitro salım çalışmalarında etkin madde yüklü doku iskelelerine uygulanan işlemler boş doku iskelelerine de uygulanarak HPLC kromatogramları elde edilmiştir.

3.2.2.2.6. Stabilité

NS’ un deney süresince stabil kaldığının gösterilmesi amacıyla $0.1 \mu\text{g.mL}^{-1}$ ve $10 \mu\text{g.mL}^{-1}$ konsantrasyonda çözeltiler hazırlanmış, örnekler hemen, oda sıcaklığında bekletildikten 6 saat ve 24 saat sonra analiz edilmiştir.

3.2.3. Doku İskelelerinin Formülasyon Çalışmaları

3.2.3.1. Ön Formülasyon Çalışmaları

Polimer Seçimi: Polimerik yapıdaki doku iskelelerinin hazırlanması için, Amerikan Gıda ve İlaç Kurumu (FDA) onaylı ve biyoparçalanır olan, farklı kopolimer oranlarına sahip türevleri kullanılarak parçalanma süresi ve etkin madde

salım kinetikleri kontrol edilebilen ve oküler alanda pek çok başarılı uygulamaları olan (51,243-245) PLGA' in tez çalışmamızda kullanılması planlanmıştır. Yapılan ön çalışmalarda 50/50 ve 75/25 (PLA/PGA) kopolimer oranına sahip PLGA polimerleri ile yapılan üretimlerde doku iskelelerinin mekanik olarak dayanıklı ve kesim vb. gibi ileri aşamalar için uygun olduğu tespit edildiğinden bu iki kopolimer oranı ile çalışmalara devam edilmiştir.

Üretim Yöntemi: Etkin maddenin sudaki çözünürlüğünün yüksek olması ve laboratuvarımızın teknik altyapısı göz önünde bulundurularak, üretim yöntemi olarak emülsiyon dondurarak kurutma yöntemi seçilmiştir (167,168). Bu yöntem için literatür ve patent taramalarının sonucunda tespit edilen genel polimer fazı/sulu faz oranlarından yola çıkarak pek çok oran ile üretim yapılmış ve optimum mekanik dayanıklılık ve salım özelliklerini sağlayan oranlarla çalışmalara devam edilmiştir.

Dondurma Sıcaklığının Tespit Edilmesi: Doku iskelelerinin kalıplara döküldükten sonra dondurma işleminin sağlanabilmesi için değişik sıcaklıklar [-20 °C, -80 °C, sıvı azot(-196 °C)] denenmiş, şekil alabilme ve mekanik dayanıklılık açısından en uygun dondurma sıcaklığı -80 °C olarak belirlenmiştir.

Plastizer Etkisi: Literatürde doku iskelelerinin hazırlanmasında uygun mekanik dayanıklılığın elde edilmesi ve kesim vb. ileri aşamaların başarılı bir şekilde gerçekleştirilebilmesi için plastizer kullanılabileceği bildirilmiştir (246,247). Bu nedenle formülasyonlara değişik tipte (polietilen glikol 4000, polivinil alkol) ve konsantrasyonda (% 0.5-1) plastizerler eklenerek mekanik dayanıklılık, esneklik ve kesim işlemleri için etkinlikleri değerlendirilmiştir. Plastizer içermeyen formülasyonlarla karşılaştırma yapıldığında, her iki plastizer için her iki oranda da herhangi bir pozitif etki gözlenmemiştir. Bu nedenle formülasyonlara plastizer ilave edilmemesine karar verilmiştir.

Kesim Yönteminin Tespit Edilmesi: Emülsiyon dondurarak kurutma yöntemi ile doku iskeleleri uygulanacakları bölge ve amaç göz önünde bulundurularak belirli çap ve kalınlıklarda üretilebilmektedir. Üretim sırasında kalıba dökme ve çıkarma işlemlerindeki sınırlamalar nedeniyle kalınlığı oldukça düşük olan doku iskeleleri için en uygun yöntem doku iskelelerinin belirli boyutlarda üretilerek istenen incelikte kesilmesidir. Literatürde kesim işlemleri için vibratom, mikrotom ve bistüri kullanıldığı tespit edilmiş ve hazırlanan doku iskelelerinin vibratom,

mikrotom ve bistüri yöntemi ile kesim işlemi yapılmıştır (248-250). Yapılan bu çalışmalarda en düzgün olan ve kalınlık açısından standart sapmanın en düşük olduğu bistüri ile kesim yöntemi seçilmiştir.

Etkin Madde Etkisi: Etkin madde içeren doku iskelelerinin hazırlanmasında kullanılacak olan NS' un doku iskelelerinin şekil ve mekanik dayanıklılığı üzerinde olumsuz bir etkisi olup olmadığı makroskobik gözlemle incelenmiş ve herhangi bir olumsuz etki saptanmamıştır.

3.2.3.2. Formülasyon Çalışmaları

Doku iskelelerinin hazırlanmasında biyoparçalanır ve biyoyoumlu bir polimer olan PLGA' in değişik kopolimer oranlarına sahip PLGA (50:50) ve PLGA (75:25) türevleri kullanılmıştır. PLGA doku iskeleleri “emülsiyon dondurarak kurutma” yöntemi kullanılarak hazırlanmıştır (167,168). Hazırlanan formülasyonların kodları Tablo 3.2' de verilmiştir.

Tablo 3.2. Hazırlanan doku iskelelerinde kullanılan polimerler ve kodları.

Kullanılan Polimer		Formülasyon Kodu
Boş Doku İskeleleri	Polilaktid-ko-glikolik asit (50:50)	PLGA50-B
	Polilaktid-ko-glikolik asit (50:50) ve Kolajen	PLGA50-B-K
	Polilaktid-ko-glikolik asit (50:50) ve Poli-l-lizin	PLGA50-B-L
	Polilaktid-ko-glikolik asit (75:25)	PLGA75-B
	Polilaktid-ko-glikolik asit (75:25) ve Kolajen	PLGA75-B-K
	Polilaktid-ko-glikolik asit (75:25) ve Poli-l-lizin	PLGA75-B-L
Etkin Madde Yüklü Doku İskeleleri	Polilaktid-ko-glikolik asit (50:50) – NS	PLGA50-NS
	Polilaktid-ko-glikolik asit (50:50) ve Kolajen – NS	PLGA50-NS-K
	Polilaktid-ko-glikolik asit (50:50) ve Poli-l-lizin – NS	PLGA50-NS-L
	Polilaktid-ko-glikolik asit (75:25) – NS	PLGA75-NS
	Polilaktid-ko-glikolik asit (75:25) ve Kolajen – NS	PLGA75-NS-K
	Polilaktid-ko-glikolik asit (75:25) ve Poli-l-lizin – NS	PLGA75-NS-L

3.2.3.2.1. Doku İskelelerinin Hazırlanması

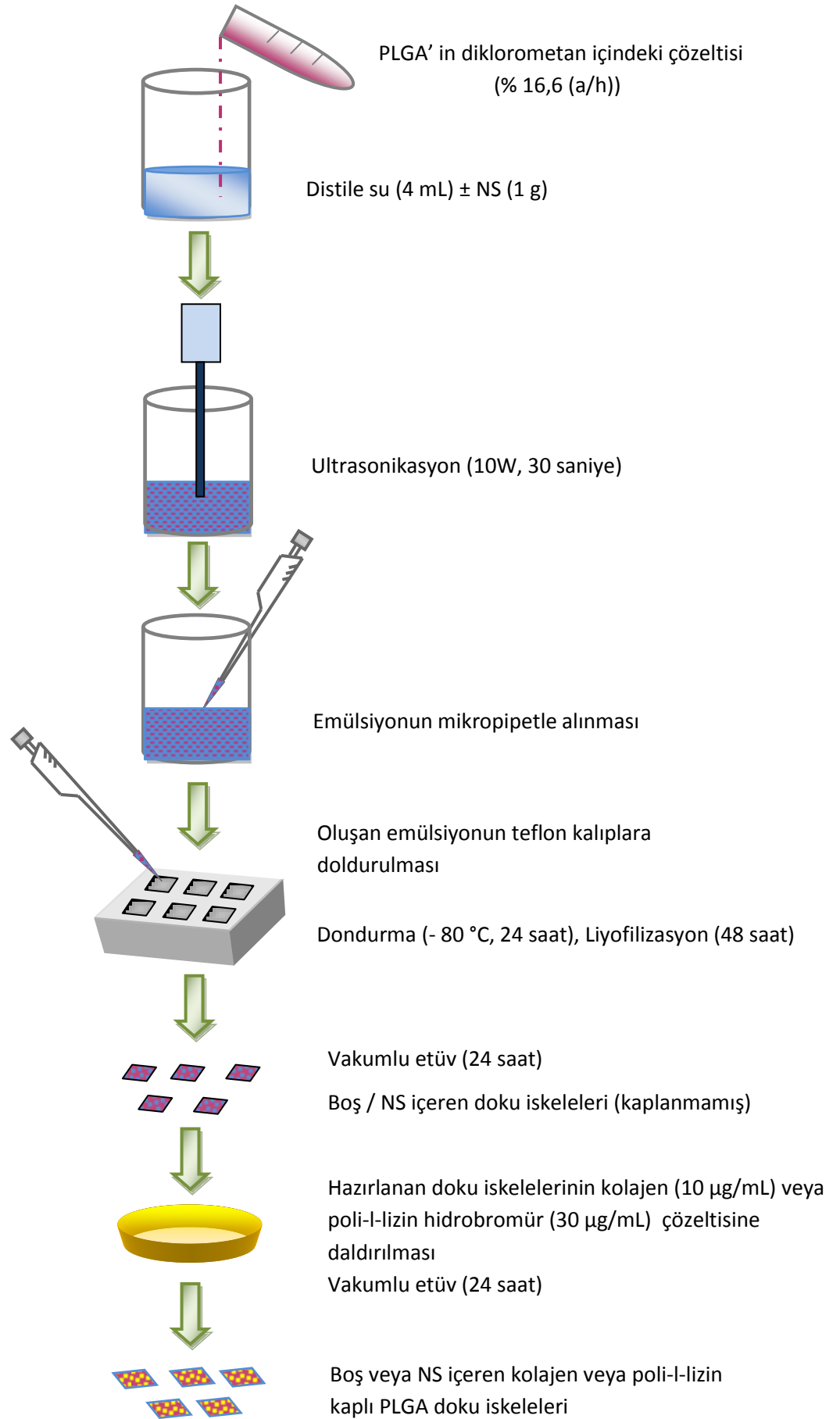
Etkin madde içermeyen doku iskelelerinin hazırlanması için, PLGA (1 g) tartılmış ve üzerine 6 mL diklorometan eklenerek tamamen çözününceye kadar vortekslenmiş ve bu çözelti üzerine 4 mL distile su ilave edilmiştir. Elde edilen karışım ultrasonik prob yardımıyla homojenize edilmiş (10W, 30 saniye) ve emülsiyon oluşumu sağlanmıştır. Oluşan bu emülsiyon, mikropipet yardımıyla 5 mm çapında, 1 cm uzunluğundaki silindirik teflon kalıplara dökülmüştür. Teflon kalıplar 24 saat boyunca -80 °C’ de buzdolabında dondurulduktan sonra, 48 saat süreyle liyofilize edilmiştir. Kalıplardan çıkarılan doku iskeleleri herhangi bir organik solvan kalıntısı olmaması için, liyofilizasyon işlemini takiben 24 saat boyunca oda sıcaklığında vakumlu etüvde tutulmuş ve bu şekilde etkin madde içermeyen,

silindirik 0.5 cm (çap) x 1 cm (kalınlık) boyutlarında PLGA doku iskeleleri hazırlanmıştır (Şekil 3.1). Doku iskelelerinin istenen boyutlara gelmesi için hazırlanan silindirik doku iskeleleri 2 mm kalınlığında, 5 mm çapında olacak şekilde bistüri yardımıyla kesilmiştir.

NS yüklü doku iskelelerinin hazırlanması için yine PLGA (1 g) tartılmış ve üzerine 6 mL diklorometan eklenerek tamamen çözününceye kadar vortekslenmiş ve bu çözelti NS' un (1 g) 4 mL distile sudaki çözeltisi üzerine ilave edilmiştir. Yukarıda belirtildiği gibi boş doku iskelelerinin hazırlanmasındaki aynı işlemlerle devam edilerek NS yüklü doku iskeleleri hazırlanmıştır.

3.2.3.2.2. Doku İskelelerinin Kolajen ve Poli-l-lizin ile Kaplanması

Hazırlanan boş ve NS yüklü doku iskelesi formülasyonlarının hücre ile etkileşiminin artırılması için doku iskelelerine kolajen ve poli-l-lizin ile kaplama yapılmıştır. Doku iskelelerinin kolajen veya poli-l-lizin ile kaplanmasında kolajenin 0,001 N hidroklorik asitteki 10 µg/mL' lik veya poli-l-lizin hidrobromürün distile sudaki 30 µg/mL' lik çözeltileri hazırlanmış ve doku iskeleleri bu çözeltiler içerisinde 30 dakika süreyle tutulmuştur (51,251). Kolajen veya poli-l-lizin ile kaplanan doku iskeleleri vakumlu etüvde 24 saat süreyle bekletilmiş ve bu sayede organik solvan/su kalıntılarının uzaklaşması sağlanmıştır. Böylece poli-l-lizin veya kolajen kaplı boş veya NS yüklü PLGA doku iskeleleri hazırlanmıştır (Şekil 3.1).



Şekil 3.1. Kolajen veya poli-l-lizin kaplı, NS içeren veya boş PLGA doku iskelelerinin hazırlanması.

3.2.4. Doku İskelelerinin İn Vitro Karakterizasyonu

3.2.4.1. Çap - Kalınlık Tayini

Hazırlanan doku iskelesi formülasyonların kesilmeden önce ve kesildikten sonra çap ve kalınlık ölçümleri gerçekleştirilmiştir. Tüm ölçümler 12 adet doku iskelesi üzerinde yapılmış olup, sonuçlar ortalama $\pm$ standart sapma olarak verilmiştir.

3.2.4.2. Morfolojik Özelliklerinin İncelenmesi

Hazırlanan doku iskelelerinin yüzey özellikleri Taramalı Elektron Mikroskobu (SEM) kullanılarak incelenmiştir. Doku iskeleleri iki taraflı yapışkan band aracılığıyla metal levhalar üzerine tespit edilmiştir. Bu işlemi takiben, örnekler marka kaplama cihazında (BIORAD) 100 Å kalınlığında altın ile kaplanmıştır. Daha sonra örnekler SEM (Joel-SEM-ASID 10) ile incelenmiş ve fotoğrafları çekilmiştir. Doku iskelelerinin genel şekilsel özelliklerinin incelenmesi amacıyla ise dijital fotoğraf makinesi ile fotoğrafları çekilmiştir.

3.2.4.3. FT-IR Spektrumlarının İncelenmesi

Hazırlanan doku iskelesi formülasyonlarının kolajen ve poli-l-lizin ile kaplama etkinliğinin değerlendirilmesi amacıyla saf halde NS, kolajen, poli-l-lizin ve formülasyonların 600 - 4000 cm^{-1} dalga sayısı aralığında FT-IR spektrumları çekilmiştir.

3.2.4.4. Porozite Ölçümleri

Doku iskelelerinin porozite ölçümleri “Nova 2200e” yüzey alanı ve por büyüklüğü ölçüm cihazı kullanılarak gerçekleştirilmiştir. Hazırlanan doku iskeleleri yüzey alanı ve por büyüklüğü ölçüm cihazında 2 gün süreyle degaze edildikten sonra azot atmosferi altında analiz edilmiş ve elde edilen sonuçlar BJH por büyüklüğü dağılımları hesaplanarak değerlendirilmiştir. Tüm ölçümler üç tekrarlı olarak gerçekleştirilmiştir.

3.2.4.5. Su Absorplama Özelliklerinin İncelenmesi

Doku iskelelerinin su alım deneyleri SLF çözeltisi içinde 49 gün süreyle üç tekrarlı olarak gerçekleştirilmiştir. Doku iskelelerinin su alım özelliklerinin

değerlendirilmesi için hazırlanan formülasyonların başlangıç ağırlıkları (W_0) tespit edilmiş, daha sonra doku iskeleleri $37^\circ\text{C} \pm 0.5^\circ\text{C}$ de SLF çözeltisi içinde inkübe edilmiş ve inkübasyon sonucunda zamanın fonksiyonu olarak bu ağırlıklardaki değişim tespit edilmiştir (253). Bunun için doku iskeleleri 1, 3, 5, 7, 10, 14, 21, 28, 35, 42 ve 49. günlerde SLF çözeltisi içerisinde çıkarılmış, yüzeylerindeki fazla su standardize bir işlemle alınmış ve her bir doku iskelesinin ağırlığı tartılarak belirlenmiştir (W_t). Doku iskelelerinin zamanın fonksiyonu olarak yüzde su alımı aşağıdaki formül kullanılarak hesaplanmıştır (Formül 3.2).

$$\% \text{ Su Alımı} = \left[\frac{W_t - W_0}{W_0} \right] \times 100$$

(3.2)

3.2.4.6. İn Vitro Degradasyon

Doku iskelelerinin in vitro degradasyonlarının değerlendirilmesi SLF çözeltisi içinde ve PLGA (50:50) polimerinin kullanıldığı formülasyonlar için 7 hafta, PLGA (75:25) polimerinin kullanıldığı formülasyonlar için 13 hafta süreyle üç tekrarlı olarak gerçekleştirilmiştir (254). Doku iskelelerinin degradasyon özellikleri, formülasyonların $37^\circ\text{C} \pm 0.5^\circ\text{C}$ de SLF çözeltisi içindeki inkübasyonu sonucunda çözeltinin pH' sında meydana gelen değişim kaydedilerek değerlendirilmiştir. PLGA (50:50) polimerinin kullanıldığı formülasyonlar için 1, 3, 5, 7, 10, 14, 21, 28, 35, 42, 49. günlerde ve PLGA (75:25) polimerinin kullanıldığı formülasyonlar için 1, 3, 5, 7, 10, 14, 21, 28, 35, 42, 49, 56, 63, 70, 77, 84, 91. günlerde SLF çözeltisi içerisinde doku iskeleleri çıkarılarak çözeltinin pH' sı ölçülmüştür. Bu ölçümü takiben doku iskeleleri üzerine taze SLF çözeltisi ilave edilerek bir sonraki ölçüme kadar tekrar inkübasyona bırakılmıştır.

3.2.4.7. Doku İskelelerine Yüklenen NS Miktarının Belirlenmesi

Doku iskelelerine yüklenen NS miktarının belirlenmesi için hazırlanan formülasyonlar üzerine 5 mL diklorometan eklenmiş ve bu şekilde polimerin (PLGA) çözünmesi sağlanmıştır. Daha sonra bu faz üzerine 10 mL SLF ilave edilmiş, 30 dakika ultrasonik banyoda bekletildikten sonra ekstraksiyon işlemi

yapılmış ve böylece NS' un SLF fazına geçmesi sağlanmıştır (255). Bu süre sonunda karışım 14000 rpm' de 10 dakika santrifüjlenerek süpernatant ayrılmıştır. Elde edilen süpernatant 0,45 µm por çapına sahip membran filtreden süzülerek HPLC kolonuna enjekte edilmiştir. Sonuçta bulunan pik alanı değerleri kalibrasyon doğrusuna yerleştirilerek bu alanlara karşılık gelen konsantrasyon değerleri hesaplanmıştır. Tüm deneyler altı tekrarlı olarak gerçekleştirilmiştir.

3.2.5. İn Vitro Salım Deneyleri

3.2.5.1. Salım Ortamı ve Hücresi, Deneyin Yapılışı

PLGA doku iskelelerinin in vitro salım deneyleri için 7 ± 0.1 mg olacak şekilde hassas terazide tartılan formülasyonlar ($n = 6$) 2 mL' lik eppendorf tüplere alınmış ve üzerlerine 1 mL SLF çözeltisi ilave edilmiştir. Aynı şekilde hazırlanan 6 salım hücresi, sıcaklığı 37 ± 0.5 °C' de sabit tutulan ve çalkalama hızı 20 rpm olan yatay çalkalayıcı su banyosuna yerleştirilmiştir (192,256,257). Bu işlemler NS içeren/içermeyen, kaplı/kapsız tüm doku iskelelerine uygulanmıştır. Belirli zaman aralıklarında (0.5, 1, 2, 4, 6, 8, 24, 72, 120 ve 168. saat) tüplerden 1 mL örnek alınmış ve bu örnekler 0.45 µm por çapına sahip membran filtrelerden süzülerek HPLC kolonuna enjekte edilmiştir. Örnek alınmasından sonra geride kalan doku iskelelerinin üzerine yeniden 1 mL SLF ilave edilmiş ve salım hücreleri tekrar su banyosuna yerleştirilmiştir. Kalibrasyon doğrusundan hareketle zamana bağlı olarak salınan NS miktarı % kümülatif olarak belirlenmiştir.

3.2.5.2. İn Vitro Salım Deneylerinin Değerlendirilmesi

In vitro salım çalışmaları sırasında elde edilen örneklerin HPLC kolonuna enjeksiyonundan sonra, hesaplanan pik alanları değerlerinin kalibrasyon doğru denkleminde yerleştirilmesi ile salınan NS miktarları tespit edilmiştir. Elde edilen bu miktarlar % kümülatif salım cinsinden zamanın fonksiyonu olarak değerlendirilmiştir. Salım mekanizmasını belirlemek için etkin madde salımının sıfır, birinci derece, Hixson Crowell, Higuchi ve RRSBW (Rosin-Ramler-Sperling-Bennet-Weibull) kinetiklerine uyum iyiliği analizi "A Program for In Vitro Dissolution Kinetics, IVIV Kinetic Correlation and Rutin" programı ile yapılmıştır (258). In vitro dissolüsyon profillerinin karşılaştırılması çalışmalarında referans olarak herhangi bir kaplama yapılmamış olan PLGA50-NS ve PLGA75-NS kodlu

formülasyonlar alınmış ve diğer formülasyonların farklılığı f_2 (benzerlik faktörü) hesaplanarak değerlendirilmiştir. Ayrıca bu formülasyonların kendi aralarındaki benzerliğin tespiti için formülasyonların kendi içerisinde ayrı ayrı f_2 değerleri hesaplanmıştır. Benzerlik faktörü değerinin 50 ya da daha büyük olması durumunda, in vitro çözünme profillerinin benzer olduğu bildirilmiştir (259). İncelenen kinetikler (Formül 3.3, 3.4, 3.5, 3.6 ve 3.7) için uygulanan formüller aşağıda verilmiştir:

$$3\sqrt{100 - 3\sqrt{m}} = Kt \quad (\text{Hixon-Crowell}) \quad (3.3)$$

$$100 - m = kd\sqrt{t} \quad (\text{Higuchi}) \quad (3.4)$$

$$\ln m = -kt + a \quad (\text{Birinci Derece}) \quad (3.5)$$

$$m = 100 - k_0t \quad (\text{Sıfır Derece}) \quad (3.6)$$

$$md = 1 - \exp [-(t-T_i)^{b/a}] \quad (\text{RRSBW}) \quad (3.7)$$

Yukarıdaki formüllerde:

- t: Zaman
m: % çözünmeden kalan ilaç
K: Küpkök salım hızı sabiti (zaman⁻¹)
kd: Higuchi salım hızı sabiti (zaman⁻¹)
k: Birinci derece hız sabiti (zaman⁻¹)
k₀: Sıfır derece hız sabiti (zaman⁻¹)
T_i: Çözünme/salım işleminin başlangıcından önceki gecikme süresi ("lag-time")
b: Şekil parametresi
a: Sabit

Salım hakkında anlamlı bilgi elde etmek ve verileri istatistiksel olarak karşılaştırmak için bağımlı değişkenlerin aynı formda olması gerekmektedir. Bu nedenle yukarıda verilen formüller yeniden düzenlenmiştir (Formül 3.8, 3.9, 3.10, 3.11, 3.12) (260).

$$m = (3\sqrt{100} - Kt)^3 \quad (\text{Hixon-Crowell}) \quad (3.8)$$

$$m = 100 - kd\sqrt{t} \quad (\text{Higuchi}) \quad (3.9)$$

$$m = e^a e^{-kt} \quad (\text{Birinci Derece}) \quad (3.10)$$

$$m = 100 - k_0 t \quad (\text{Sıfır Derece}) \quad (3.11)$$

$$md = 1 - \exp [-(t-T_i)^{b/a}] \quad (\text{RRSBW}) \quad (3.12)$$

f_2 benzerlik testi (Formül 3.13) için uygulanan formül aşağıda verilmiştir (259).

$$f_2 = 50 \times \log \left\{ \left[1 + \frac{1}{n} \sum_{t=1}^n [R_t - T_t]^2 \right]^{-0.5} \right\} \times 100 \quad (3.13)$$

Yukarıdaki formülde:

- n: Dissolüsyon örnek alma zaman noktalarının sayısı,
 Rt: Referans ilacın % salınan miktarı
 Tt: Test ilacın % salınan miktarını göstermektedir.

3.2.6. Hücre Kültürü Çalışmaları

Hücre kültürü çalışmaları, etkin madde içeren/içermeyen, kaplı olan ya da olmayan tüm PLGA doku iskelesi formülasyonları üzerinde gerçekleştirilmiştir. Hücre kültürü çalışmalarında kullanılan hücre tipi, çalışmamız sırasında Albino tavşanların korneal dokusundan izole edilen epitel hücreler olup, kültür ortamı olarak fetal sıgır serumu (FBS) (% 20), penisilin/streptomisin (10000U/10000µg/mL) (% 1) ve “Dulbecco’s Modified Eagle’s / Ham’s F12”(DMEM/Ham’s F12) (1:1) karışımı kullanılmıştır.

Hücre kültürü çalışmalarında öncelikle tavşan korneasından epitel hücreleri izole edilmiş, izole edilen hücrelerin kornea epitel hücresi olduğu tespit edilmiş ve bu hücreler kültür edildikten sonra hazırlanan doku iskelesi formülasyonları üzerine ekilerek morfolojik ve mikroskopik incelemeler, sitotoksikite testleri ve hücre proliferasyon testleri gerçekleştirilmiştir.

3.2.6.1. Kornea Epitel Hücrelerinin İzolasyonu ve Kültürü

Hücre kültürü çalışmalarında kullanılacak olan kornea epitel hücrelerinin izolasyonu için, Hacettepe Üniversitesi Deney Hayvanları Laboratuvarında bulunan, daha önceden başka in vivo çalışmalarda kullanılmış ve ötenazi yapılacak olan Albino tavşanlar (3 adet) kullanılmıştır. Bu tavşanların seçiminde aşağıdaki kriterler göz önünde bulundurulmuştur:

- a) tavşanların gözlerine herhangi bir işlem (ilaç uygulaması, cerrahi işlem vb.) uygulanmamış olmalı,
- b) tavşana, gözde herhangi bir birikme veya toksisiteye neden olacak lokal veya sistemik bir ilaç uygulanmamış olmalı,
- c) tavşan gözünde herhangi bir enfeksiyon, hastalık belirtisi vb. olmamalıdır.

Bu çalışmaların gerçekleştirilmesi için H.Ü. Hayvan Deneyleri Yerel Etik Kurulu'ndan 2010/1-1 nolu izin alınmıştır.

Deney için seçilen tavşanlara sodyum fenobarbital çözeltisi (100 mg/kg) intravenöz olarak uygulanarak ötenazi yapılmıştır. Ötenazi yapılmış tavşanların gözündeki limbal bölgeden 2-3 mm genişliğinde kesik açıldıktan sonra göz çıkarılmış ve kurumasını engellemek için işlem sırasında sürekli olarak fosfat tampon tuzu (PBS) ile yıkanmıştır. Yüzeyden yapılan kesilerle kornea dokusu gözün diğer kısımlarından ayrılmış ve dört parçaya bölünerek, 16-20 saat boyunca, 4° C' de, 5 mg/mL dispaz içeren flasklar içinde dağıtılarak, %1 oranında penisilin-streptomisin eklenmiş DMEM : Ham's - F12 içinde, 20-30 devir/dakikada yatay olarak çalkalanarak inkübe edilmiştir. Bu inkübasyonun sonucunda, epitel tabakası hemen altında bulunan stromadan ayrılmış ve nazik olarak yapılan mekanik işlem ile yıkama solüsyonu olan PBS içinde yüzer hale getirilmiştir. Ayrılan epitelyal tabakalar 15 mL % 0.25 tripsin/ % 0.01 EDTA solüsyonu içeren 50 mL' lik steril tüp içine aktarılmış ve 20-25 dakika boyunca 37 °C' de 40 devir/dakika olacak şekilde yatay çalkalama ile inkübe edilmiştir (261-264). Daha sonra % 20 FBS ve % 1 penisilin-streptomisin içeren DMEM : Ham's - F12 çözeltisi ile tripsin nötralize edilmiş ve hücre süspansiyonu 100 ve 40 µm' lik filtreler kullanılarak filtre edilmiştir. Elde edilen tek tabakalı hücre süspansiyonu 1500 rpm de 5 dakika santrifüj edilmiş, % 20 FBS, % 1 penisilin-streptomisin içeren DMEM : Ham's - F12

çözeltisi içinde, 37 °C’ de, % 5 CO₂ içeren ortamda kültür edilmiş ve hücre kültür ortamı 2 günde bir değiştirilmiştir.

3.2.6.2. İzole Edilen Hücrelerin İmmünohistokimyasal İncelenmesi

Tavşan korneasından izole edilen epitel hücrelerin tanımlanması, immünohistokimyasal boyama ile yapılmıştır. Bu amaçla önceden cam lam üzerinde kültürü yapılmış olan epitel hücreleri soğuk metanol (4 °C) ile oda sıcaklığında 10 dakika süreyle fiksasyona tabi tutulmuş ve kurutulmuştur. Hücreler PBS çözeltisi ile rehidrate edildikten sonra, 15 dakika süreyle % 4 oranında sıgır serum albumini (BSA) içeren PBS içerisinde bloke edilmiştir. Blokasyonu takiben hücreler keratin 14 (FITC ile konjuge edilmiş) ile muamele edilmiş ve oda sıcaklığında 2 saat süreyle inkübe edilmiştir (265). Hücrelerin kültür edildiği lamlar mikroskopik inceleme esnasında floresan ışığın kaybolmasını engellemek amacıyla “vectashield” : gliserol (1:9) karışımı ile sabitlendikten sonra hazırlanan örnek floresan mikroskobu ile incelenmiştir.

3.2.6.3. Hücre Adezyonunun Mikroskopik Olarak İncelenmesi

Hazırlanan doku iskelelerine hücre adezyonunun incelenmesi amacıyla, formülasyonlar 30 dakika süreyle UV altında sterilize edilmiş (266) ve 96 kuyucuklu plaklara yerleştirilmiştir. Tavşan kornea epitel hücreleri her bir doku iskelesi formülasyonunun bulunduğu kuyucuklara 15 x 10³ hücre/kuyucuk olacak şekilde ve ortam olarak % 20 FBS, % 1 penisilin-streptomisin içeren DMEM : Ham’s - F12 kullanılarak ekilmiştir. Doku iskeleleri üzerine ekilmiş olan kornea hücreleri 37 °C’ de, % 5 CO₂ içeren ortamda, 3 gün süreyle inkübasyona bırakılmış ve 3. günün sonunda doku iskeleleri PBS ile yıkandıktan sonra “may grünwald” fiksasyon ajanı ile 5 dakika fikse edilmiş ve ardından PBS ile tekrar yıkandıktan sonra 1:10 oranında PBS ile seyreltilmiş “giemsa” boyası ile 15 dakika süreyle muamele edilmiştir. Hazırlanan örnekler optik mikroskopta incelenerek doku iskelesi formülasyonları üzerinde hücre adezyonu değerlendirilmiştir.

3.2.6.4. Hücre Morfolojisinin İncelenmesi

Hücre morfolojisinin incelenmesi amacıyla, hazırlanan PLGA doku iskeleleri 30 dakika süreyle UV altında sterilize edilmiş (266) ve 96 kuyucuklu plaklara yerleştirilmiştir. Tavşan kornea epitel hücreleri her bir doku iskelesi

formülasyonunun bulunduğu kuyucuklara 15×10^3 hücre/kuyucuk olacak şekilde ve ortam olarak % 20 FBS, % 1 penisilin-streptomisin içeren DMEM : Ham's - F12 kullanılarak ekilmiştir. Doku iskeleleri üzerine ekilmiş olan kornea hücreleri 37 °C' de, % 5 CO₂ içeren ortamda, 3 gün süreyle inkübasyona bırakılmış ve 3. günün sonunda hücreler % 4 paraformaldehit çözeltisi ile 30 dakika süreyle fikse edilmiş (267) ve doku iskelelerine ekilen hücre morfolojisinin gözlemlenebilmesi için örnekler marka kaplama cihazında (BIORAD) 100 Å kalınlığında altın ile kaplandıktan sonra Taramalı Elektron Mikroskobu (SEM) fotoğrafları çekilmiştir.

3.2.6.5. İn Vitro Biyouyumluluk Testleri

3.2.6.5.1. Sitotoksosite Testi

Hazırlanan PLGA doku iskelelerinin biyouyumluluk testleri FDA' nın tıbbi cihazlar ile ilgili kılavuzlarında yer alan ISO-10993-5 ‘‘Biological Evaluation of Medical Devices’’ standartlarına göre yapılmış (268) ve formülasyonların indirek sitotoksitesi incelenmiştir. Sitotoksosite çalışmalarında MTT (3-(4,5-Dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide) testi kullanılmıştır (269).

Hazırlanan PLGA doku iskeleleri UV altında 30 dakika süreyle sterilize edilmiş (266) ve üç kez hücre kültür ortamı olan % 20 FBS, % 1 penisilin-streptomisin içeren DMEM : Ham's - F12 ile yıkanmıştır. Daha sonra doku iskeleleri mililitresinde 0.2 g doku iskelesi olacak şekilde, hücre kültür ortamını içeren tüplere alınmış ve 37 °C' de, 1, 5 ve 10 gün süreyle hücre kültür ortamı ile muamele edilmiştir. Diğer taraftan kornea epitel hücreleri (15×10^3 hücre/mL) 96 kuyucuklu plaklara ekilmiş ve bu plaklarda bir gece inkübe edilmiştir. İnkübasyondan sonra 96 kuyucuklu plaktaki hücre kültür ortamı uzaklaştırılmış ve tüplerde 1,5 ve 10 gün süreyle doku iskelesi ile muamele edilmiş kültür ortamı (200µL/kuyucuk) kuyucuklardaki hücreler üzerine ilave edilerek hücrelerin bu ortamla 24 saat süreyle inkübasyonu sağlanmıştır. Bu süre sonunda kuyucuklardaki kültür ortamı atılmış ve hücrelere 100 µL taze ortam ve 13 µL MTT solüsyonu (5µg/mL, DMEM : Ham's - F12 ile dilue edilmiş) ilave edilmiştir. Kuyucukları içeren plak 4 saat karanlıkta, etüvde inkübe edildikten sonra ortam uzaklaştırılmış ve kuyucuklara 100µL/kuyucuk izopropanol-HCl (0,04M HCl içeren saf izopropanol) eklenmiştir. Plak 10 dakika

oda sıcaklığında karanlıkta bekletildikten sonra 570 nm dalga boyunda ELISA okuyucusunda okutulmuştur (270).

Sitotoksosite testinde sonuçlar yüzde canlılık olarak hesaplanmıştır. Kontrol kuyucuklarının absorbansı %100 olarak kabul edilmiş ve test kuyucuklarının yüzde canlılıkları hesaplanmıştır (Formül 3.14). Kontrol kuyucuklarına doku iskelesi ile muamele edilmiş ortam ilave edilmemiş, hücreler sadece hücre kültür ortamı ile muamele edilmiştir.

$$\text{Hücre Canlılığı (\%)} = \text{Optik dansite 570 (numune)} / \text{Optik dansite 570 (kontrol)} \times 100 \quad (3.14)$$

3.2.6.5.2. Proliferasyon Testi

Hücre proliferasyon testi için, 96 kuyucuklu plaklara yerleştirilen 2x5 mm ebatlarındaki doku iskelelerinin üzerine 15×10^3 hücre/ml olacak şekilde kornea epitel hücreleri ekilmiş ve 1, 5 ve 10 gün süreyle 37 °C’ de inkübe edilmiştir. Sırasıyla 1, 5 ve 10. günün sonunda doku iskeleleri PBS ile yıkanmış ve sonra üzerlerine 100 µL taze ortam ve 13 µL MTT solüsyonu ilave edilmiştir. Plak 4 saat karanlıkta, etüvde inkübe edildikten sonra plaktaki ortam uzaklaştırılmış ve kuyucuklara 100µL/kuyucuk olacak şekilde izopropanol-HCl (0,04M HCl içeren saf izopropanol) ilave edilmiştir. Plak 10 dakika oda ısısında karanlıkta bekletildikten sonra 570 nm dalga boyunda ELISA okuyucusunda okutulmuştur (271,272).

3.2.7. Bulguların İstatistiksel Değerlendirilmesi

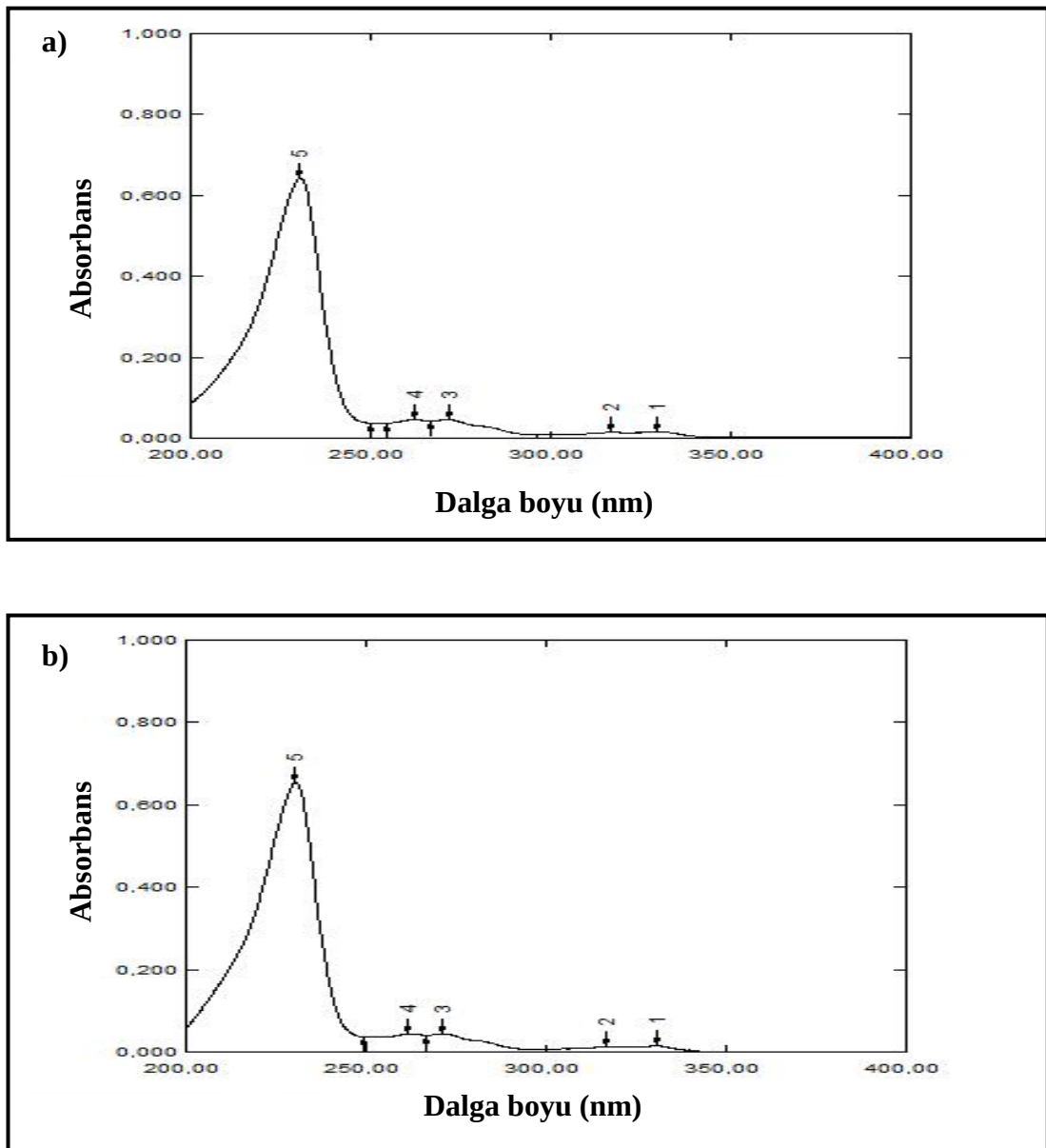
İn vitro karakterizasyon, in vitro salım ve hücre kültürü deneylerinden elde edilen bulguların istatistiksel değerlendirilmesi için “Mann Whitney U” testi kullanılmıştır. $p < 0.05$ değeri istatistiksel olarak anlamlı fark olarak kabul edilmiştir.

4. BULGULAR

4.1. NS' un Fizikokimyasal Özelliklerinin İncelenmesi

4.1.1. UV Spektrumu

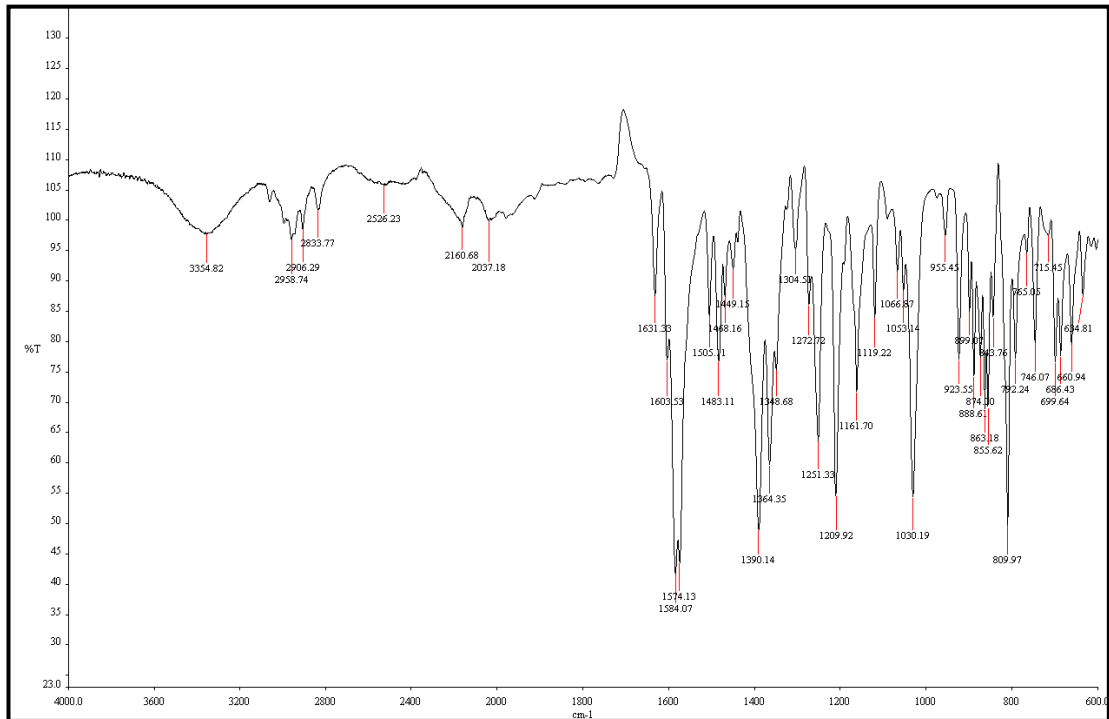
NS' un distile su veya yapay gözyaşı (SLF) içinde hazırlanan çözeltilerinin UV spektrumu Bölüm 3.2.1.1' de belirtildiği şekilde alınmıştır. Bu çözücüler içerisinde NS' a ait maksimum absorbandsın gözleendiği dalga boyu 230 nm olup UV spektrumu Şekil 4.1' de gösterilmiştir.



Şekil 4.1. NS' un a) distile su, b) SLF çözeltisi içindeki UV spektrumu.

4.1.2. FT-IR Spektrumu

NS' un Bölüm 3.2.1.2' de belirtildiği şekilde çekilen FT-IR spektrumu Şekil 4.2' de gösterilmektedir. FT-IR spektrumunda sırasıyla yapıya özgü O-H gerilim ($3600-3200\text{ cm}^{-1}$), C-H gerilim ($2960-2850\text{ cm}^{-1}$), C=O gerilim ($1760-1670\text{ cm}^{-1}$), C=C gerilim ($1600-1500\text{ cm}^{-1}$), C-O gerilim ($1260-1000\text{ cm}^{-1}$), aromatik halka yapısındaki C-H eğilim ($810-750\text{ cm}^{-1}$) ve CH=CH yapısındaki çifte bağ eğilim ($995-910\text{ cm}^{-1}$) absorpsiyon bandları saptanmıştır.



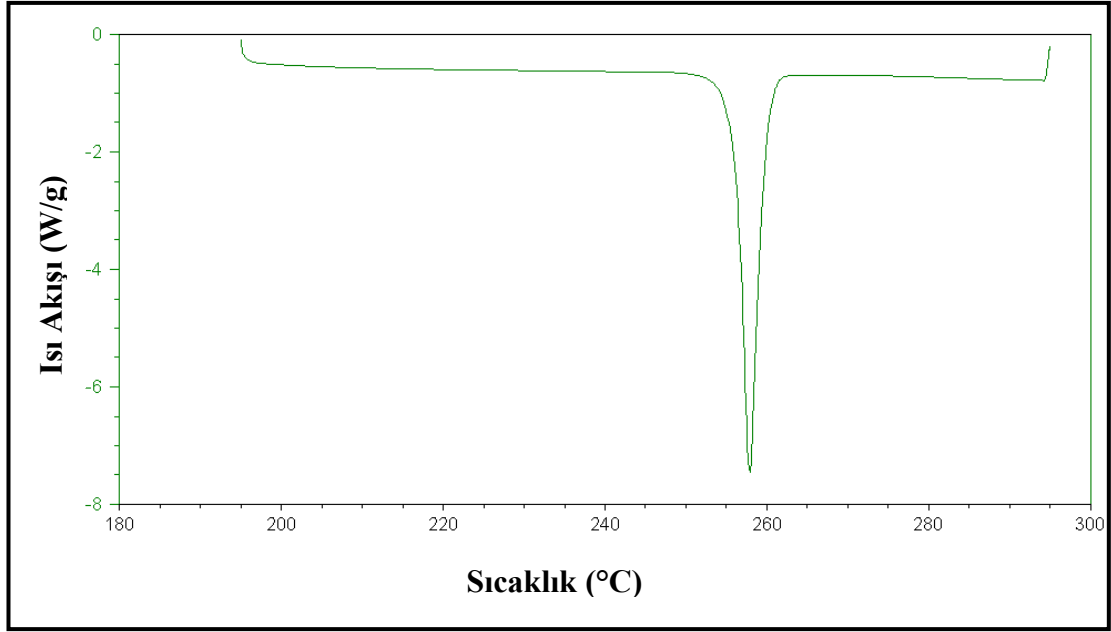
Şekil 4.2. NS' un FT-IR spektrumu.

4.1.3. Erime Derecesi Tayini

NS' un erime derecesi deneyleri Bölüm 3.2.1.3' de belirtildiği şekilde gerçekleştirilmiş ve erime derecesi $254\text{ }^{\circ}\text{C}$ olarak bulunmuştur.

4.1.4. Diferansiyel Taramalı Kalorimetre (DSC) Termogramı

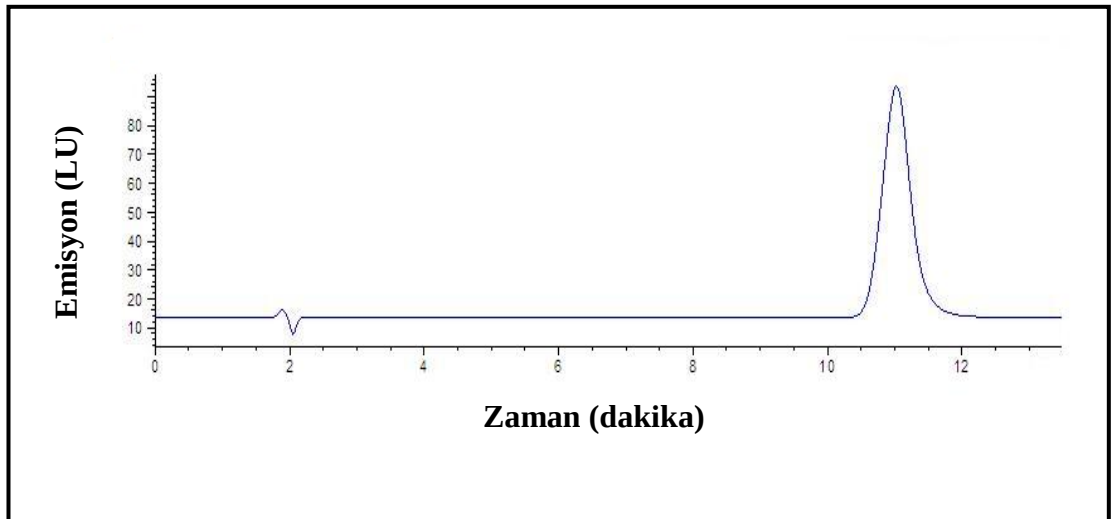
NS' un Bölüm 3.2.1.4' de belirtilen koşullarda gerçekleştirilen analizi sonucu elde edilen DSC termogramı Şekil 4.3' de gösterilmiştir. Termogramda da görüldüğü gibi NS $256\text{ }^{\circ}\text{C}$ ' de endotermik bir pik vermektedir.



Şekil 4.3. NS' un DSC termogramı.

4.2.NS' un Yüksek Basıncılı Sıvı Kromatografisi (HPLC) ile Miktar Tayini

NS' un HPLC ile miktar tayini Bölüm 3.2.2' de belirtilen koşullarda gerçekleştirilmiş ve NS' a ait aşağıdaki pik elde edilmiştir (Şekil 4.4). Kromatogramdan da görüldüğü gibi NS' a ait pik düzgün bir şekilde elde edilmiş ve alıkonma zamanı 10.89 dakika olarak bulunmuştur.



Şekil 4.4. NS' a ($5 \mu\text{g.mL}^{-1}$) ait HPLC kromatogramı.

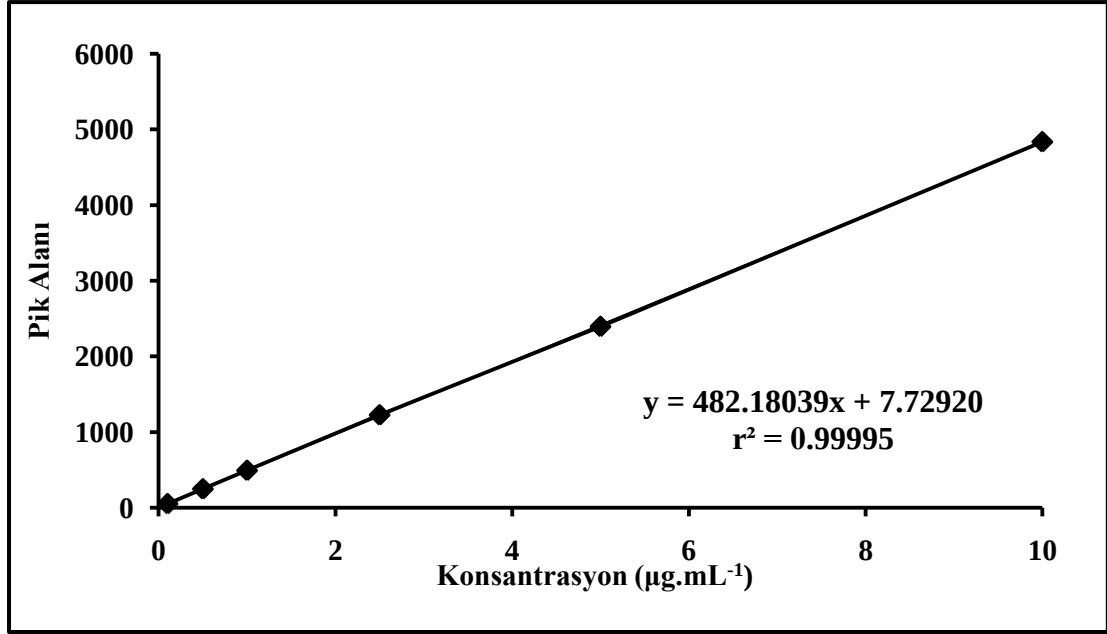
4.2.1. Kalibrasyon Doğrusu

NS' un kalibrasyon doğrusu Bölüm 3.2.2.1' de belirtildiği gibi hazırlanan ve her birinde 0.1, 0.5, 1, 2.5, 5, 10 $\mu\text{g.mL}^{-1}$ konsantrasyonda NS olan çözeltiler kullanılarak elde edilmiştir. Çalışmalar 6 seri üzerinden gerçekleştirilmiştir. Hazırlanan çözeltilerin HPLC kolonuna enjeksiyonundan sonra elde edilen pik alanları çözeltilerin konsantrasyonlarına karşı grafiğe geçirilerek kalibrasyon doğrularına ait denklemler lineer regresyon ile bulunmuştur. Her seri için elde edilen kalibrasyon doğrusuna ait eğimler karşılaştırılmıştır. Karşılaştırma sonucunda VK değeri % 0.1923 olarak bulunmuştur. NS' un HPLC ile miktar tayininde lineer regresyon verileri Tablo 4.1' de gösterilmekte olup kalibrasyon doğrusu ve denklemi ise Şekil 4.5' de yer almaktadır.

Tablo 4.1. NS' un HPLC ile miktar tayininde lineer regresyon verileri (n = 6).

Parametre	Sonuç
Konsantrasyon aralığı	0.1 $\mu\text{g.mL}^{-1}$ - 10 $\mu\text{g.mL}^{-1}$
Eğim ^a	482.18039 $\pm$ 0.92722
İntersept ^b	7.72920 $\pm$ 12.72304
Korelasyon katsayısı (r^2)	0.99995
Saptama sınırı	0.0103 $\mu\text{g.mL}^{-1}$
Miktar tayin sınırı	0.0343 $\mu\text{g.mL}^{-1}$

^a $\pm$ eğimin güven aralığı ($P = 0.05$), ^b $\pm$ interseptin güven aralığı ($P = 0.05$).



Şekil 4.5. NS' un kalibrasyon doğrusu ve denklemi.

4.2.2. Analitik Yöntem Validasyonu

4.2.2.1. Doğrusallık

Kalibrasyon doğruları Bölüm 3.2.2.2.1' de belirtildiği gibi hazırlanmıştır. Hazırlanan stok çözeltilerden (50 µg.mL⁻¹) hareketle yapılan seyreltmeler sonucunda 0.1, 0.5, 1, 2.5, 5, 10 µg.mL⁻¹ konsantrasyondaki standart çözeltilerin HPLC analizi yapılmıştır. Pik alanlarına karşılık gelen konsantrasyonlar hesaplanmış ve doğru denklemi elde edilmiştir. Tanımlayıcılık katsayısı $r^2 = 0.99995$ olarak bulunarak denklemin doğrusallığı gösterilmiştir (Şekil 4.5).

4.2.2.2. Doğruluk

NS' un miktar tayini için kullanılan yöntemin deney içi (gün içi; intra-assay) ve deneylerarası (günler arası; inter-assay) doğruluğunun değerlendirilmesi için yapılan deneyler Bölüm 3.2.2.2.2' de açıklandığı şekilde gerçekleştirilmiştir. Deney içi ve deneyler arası doğruluğun tespiti için yapılan deneyleri takiben Formül 3.1 kullanılarak doğruluk bulguları elde edilmiştir (Tablo 4.2).

Tablo 4.2. Deney içi ve deneyler arası doğruluk.

	İlave Edilen Kons. ($\mu\text{g.mL}^{-1}$)	Hesaplanan Kons. ($\mu\text{g.mL}^{-1}$)	Doğruluk ^a
Gün içi ^b	0,1	0,1001	0,1203
	1	1,0126	1,0256
	10	9,7037	-1,9625
Günler arası ^b	0,1	0,1008	0,8101
	1	0,9902	-0,9790
	10	9,7011	-1,9892

^a Bağlı hata (%)^b Gün içi ve günler arası tayinde her konsantrasyon için n = 6.

4.2.2.3. Kesinlik

4.2.2.3.1. Tekrarlanabilirlik

Bölüm 3.2.2.2.3' de açıklandığı gibi, kalibrasyon eğrisinde yer alan 3 farklı konsantrasyonda (düşük, orta, yüksek; 0.1, 1, 10 $\mu\text{g.mL}^{-1}$) standart çözeltiler hazırlanmış ve aynı çözeltilerin pik alanları HPLC ile 6 kez ayrı ayrı okutulup, hesaplanmıştır. Pik alanlarına karşılık gelen derişimler için VK değerleri hesaplanmıştır. VK' nın % 2' den küçük olması yöntemin tekrarlanabilirliğini göstermektedir (Tablo 4.3).

Tablo 4.3. Tekrarlanabilirlik sonuçları.

	Pik alanı	Konsantrasyon	X ± SS	VK (%)
0.1 µg.mL ⁻¹	57.4325	0.1031	0.1038 ± 0.0010	0.9482
	57.5786	0.1034		
	57.2354	0.1027		
	58.2754	0.1048		
	58.4238	0.1051		
	57.6890	0.1036		
1 µg.mL ⁻¹	491.8307	1.0040	0.9930 ± 0.0081	0.8133
	490.8596	1.0020		
	482.5620	0.9847		
	484.5692	0.9889		
	485.8956	0.9917		
	483.5326	0.9868		
10 µg.mL ⁻¹	4722.4731	9.7780	9.7456 ± 0.0176	0.1842
	4706.2695	9.7443		
	4701.0029	9.7334		
	4708.9590	9.7499		
	4697.4629	9.7261		
	4705.0239	9.7418		

4.2.2.3.2. Tekrar Elde Edilebilirlik

NS' un miktar tayini için kullanılan yöntemin deney içi (gün içi; intra-assay) ve deneylerarası (günler arası; inter-assay) kesinliğinin değerlendirilmesi için yapılan deneyler Bölüm 3.2.2.2.3' de açıklandığı gibi gerçekleştirilmiştir. Tekrar elde edilebilirliğin değerlendirilmesinde, pik alanlarına karşılık gelen konsantrasyonlar için varyasyon katsayısı değerleri hesaplanmıştır. VK' nın % 2' den küçük olması yöntemin tekrar elde edilebilirliğini göstermektedir (Tablo 4.4).

Tablo 4.4. Gün içi ve günler arası kesinlik.

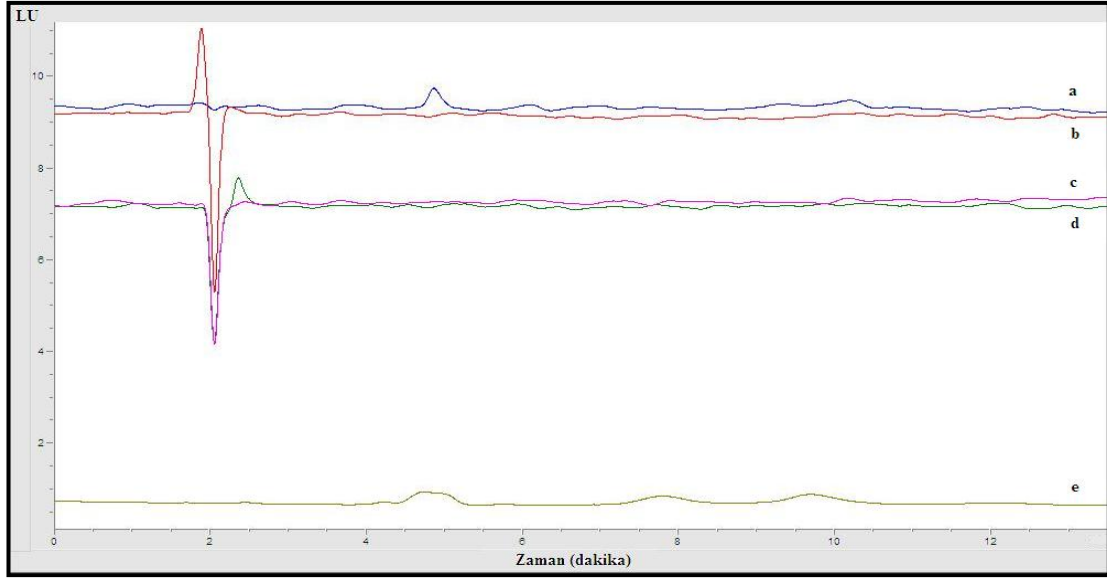
	İlave Edilen Kons. ($\mu\text{g.mL}^{-1}$)	Hesaplanan Kons. ($\mu\text{g.mL}^{-1}$)	Kesinlik ^a
Gün içi ^b	0.1	0.1001	1.1710
	1	1.0126	0.4738
	10	9.7037	0.4744
Günler arası ^b	0.1	0.1008	0.9130
	1	0.9902	1.7769
	10	9.7011	0.7523

^a Varyasyon katsayısı (%)^b Gün içi ve günler arası tayinde her konsantrasyon için n = 6.**4.2.2.4. Duyarlılık**

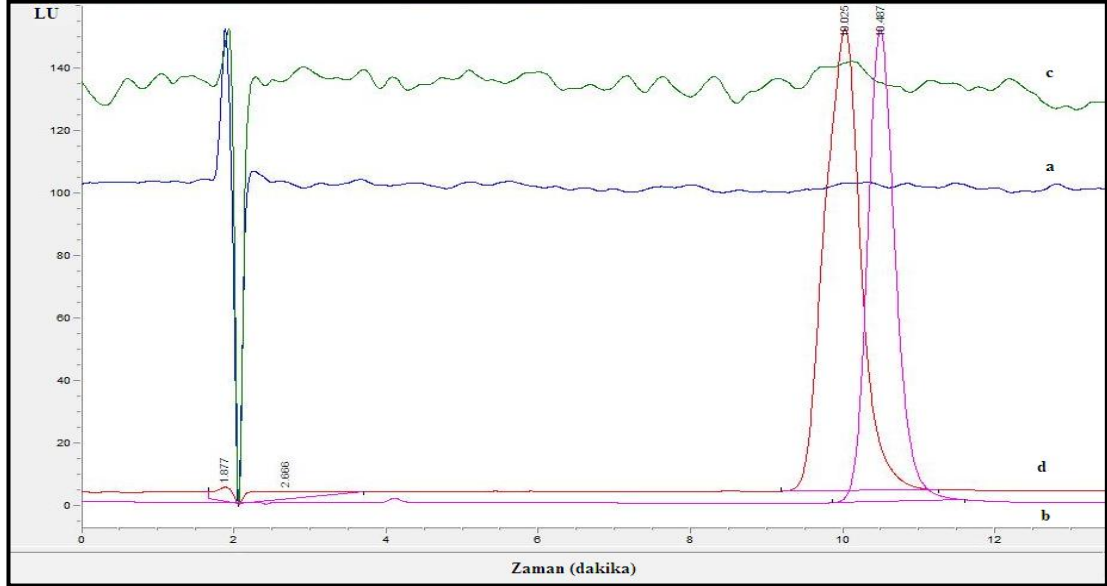
NS' un HPLC ile miktar tayininde kullanılan yöntemin duyarlılığı Bölüm 3.2.2.2.4' de belirtildiği şekilde gerçekleştirilmiş olup miktar tayin sınırı $0.0343 \mu\text{g.mL}^{-1}$ ve saptama sınırı $0.0103 \mu\text{g.mL}^{-1}$ olarak tespit edilmiştir (Tablo 4.1).

4.2.2.5. Özgünlük

Bölüm 3.2.2.2.5' de açıklandığı şekilde, hazırlanan doku iskelesi formülasyonlarında kullanılan yardımcı maddelerin etkin madde ile aynı kromatografik şartlarda pik verip vermediğinin belirlenmesi için HPLC kromatogramları alınmıştır (Şekil 4.6). Aynı amaçla, ilaç yükleme ve in vitro salım çalışmalarında etkin madde yüklü doku iskelelerine uygulanan işlemler boş doku iskelelerine de uygulanarak HPLC kromatogramları elde edilmiştir (Şekil 4.7, 4.8, 4.9, 4.10, 4.11, 4.12). Şekil 4.6' da doku iskelesi formülasyonlarında bulunan yardımcı maddelere ait pikler verilirken, Şekil 4.7, 4.8, 4.9, 4.10, 4.11 ve 4.12' de etkin madde içeren ve içermeyen formülasyonların ilaç yükleme ve salım çalışmalarında elde edilen pikleri karşılaştırılarak verilmiştir. Buna göre yöntemin NS' un doku iskelelerinden tayini için özgün bir yöntem olduğu söylenebilir.

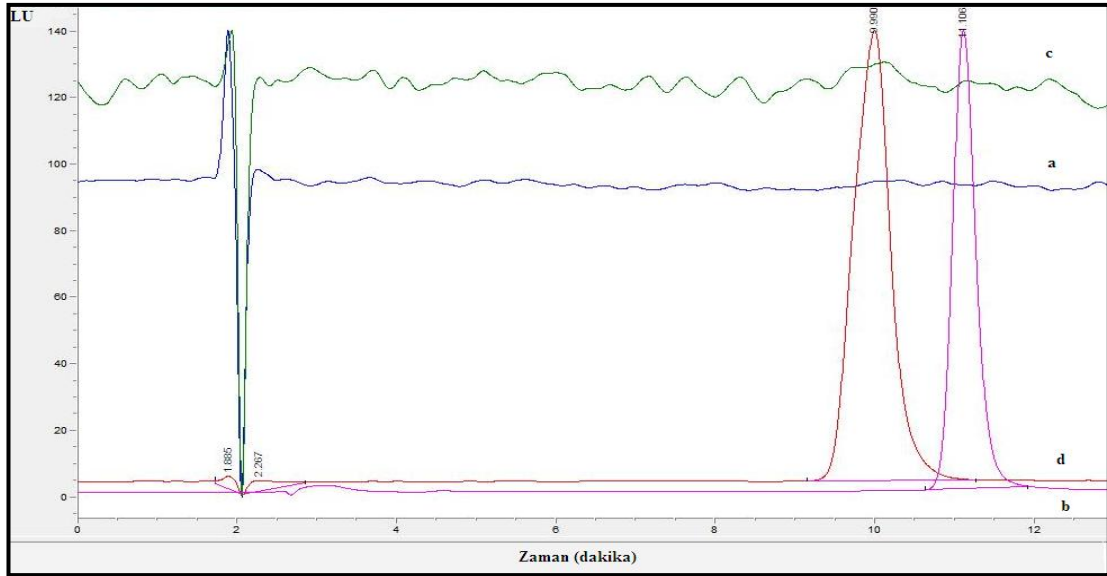


Şekil 4.6. Hazırlanan doku iskelesi formülasyonlarında kullanılan yardımcı maddelere ait HPLC kromatogramları (a: PLGA(50:50) (%16.6 (a/h)), b: SLF, c: poli-l-lizin (%0.003 (a/h)), d: kolajen (%0.001 (a/h)), e: PLGA(75:25) (%16.6 (a/h))).



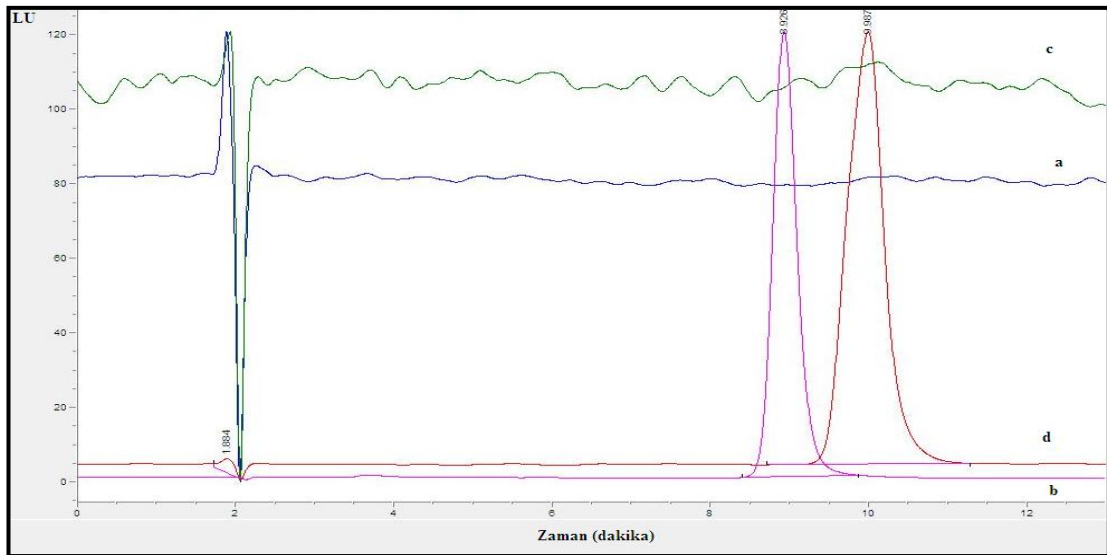
Şekil 4.7. Kaplanmamış PLGA (50:50) doku iskelelerinden elde edilen HPLC kromatogramları.

a) ve b) boş ve NS yüklü doku iskelelerinden ilaç yükleme çalışmaları sırasında, c) ve d) boş ve NS yüklü doku iskelelerinden in vitro salım çalışmaları sırasında elde edilen HPLC kromatogramları.



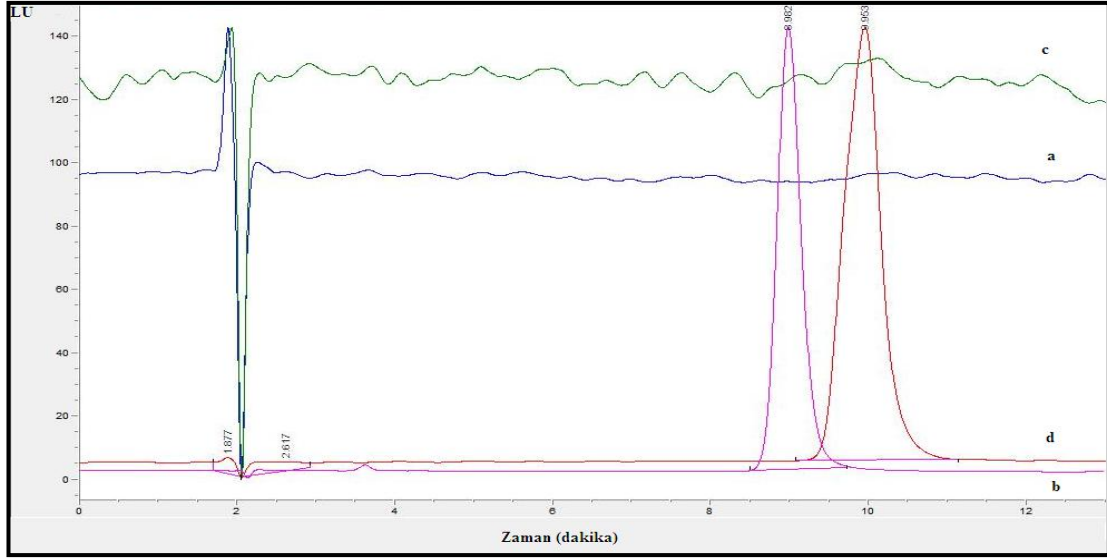
Şekil 4.8. Kolajen kaplı PLGA (50:50) doku iskelelerinden elde edilen HPLC kromatogramları.

a) ve b) boş ve NS yüklü doku iskelelerinden ilaç yükleme çalışmaları sırasında, c) ve d) boş ve NS yüklü doku iskelelerinden in vitro salım çalışmaları sırasında elde edilen HPLC kromatogramları.



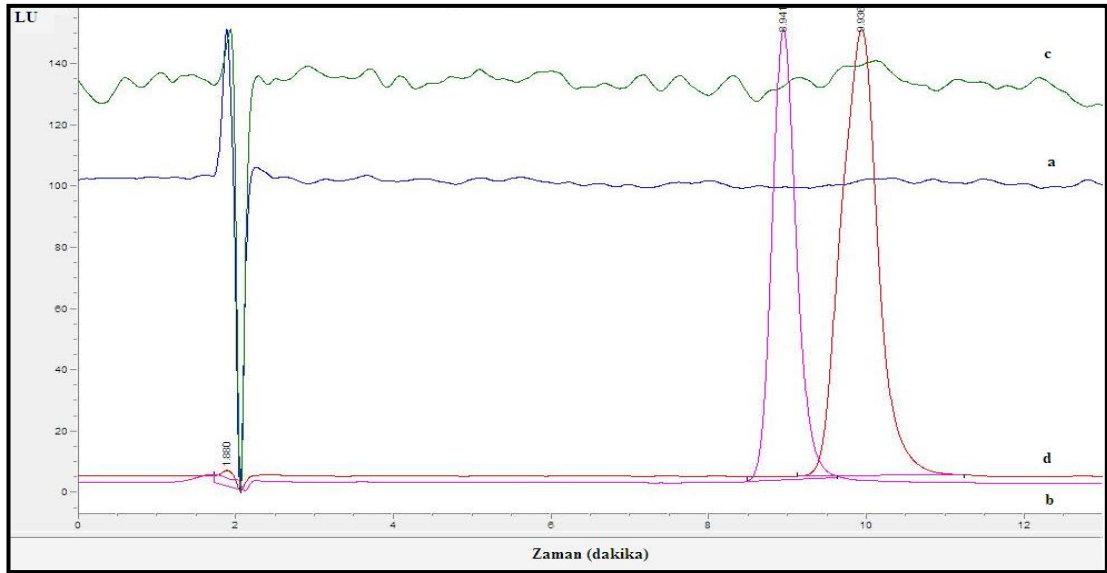
Şekil 4.9. Poli-l-lizin kaplı PLGA (50:50) doku iskelelerinden elde edilen HPLC kromatogramları.

a) ve b) boş ve NS yüklü doku iskelelerinden ilaç yükleme çalışmaları sırasında, c) ve d) boş ve NS yüklü doku iskelelerinden in vitro salım çalışmaları sırasında elde edilen HPLC kromatogramları.



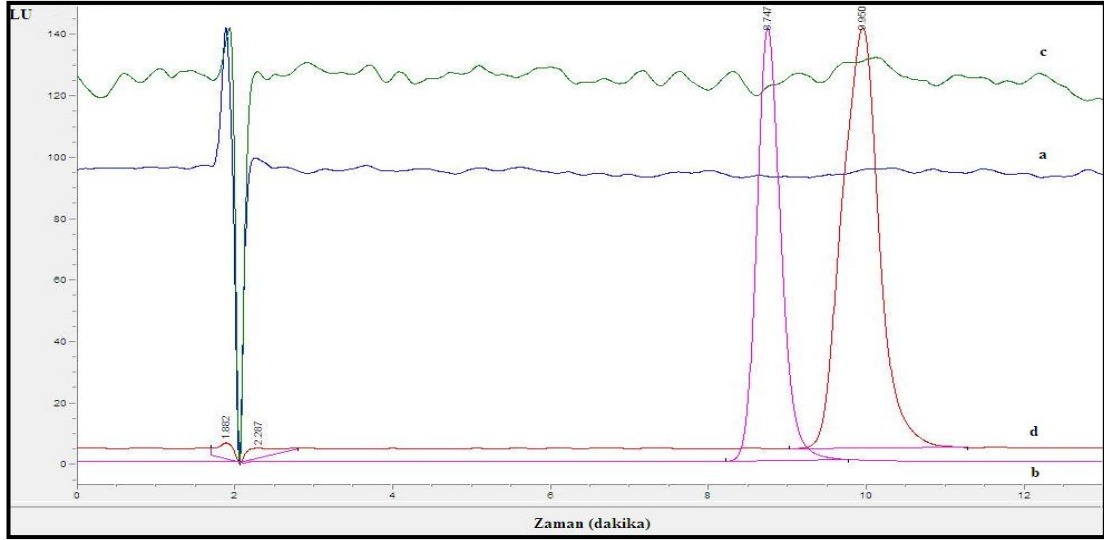
Şekil 4.10. Kaplanmamış PLGA (75:25) doku iskelelerinden elde edilen HPLC kromatogramları.

a) ve b) boş ve NS yüklü doku iskelelerinden ilaç yükleme çalışmaları sırasında,
c) ve d) boş ve NS yüklü doku iskelelerinden in vitro salım çalışmaları sırasında elde edilen HPLC kromatogramları.



Şekil 4.11. Kolajen kaplı PLGA (75:25) doku iskelelerinden elde edilen HPLC kromatogramları.

a) ve b) boş ve NS yüklü doku iskelelerinden ilaç yükleme çalışmaları sırasında,
c) ve d) boş ve NS yüklü doku iskelelerinden in vitro salım çalışmaları sırasında elde edilen HPLC kromatogramları.



Şekil 4.12. Poli-l-lizin kaplı PLGA (75:25) doku iskelelerinden elde edilen HPLC kromatogramları.

a) ve b) boş ve NS yüklü doku iskelelerinden ilaç yükleme çalışmaları sırasında, c) ve d) boş ve NS yüklü doku iskelelerinden in vitro salım çalışmaları sırasında elde edilen HPLC kromatogramları.

4.2.2.6. Stabilité

NS' un deney süresince stabil kaldığının gösterilmesi amacıyla hazırlanan 0.1 $\mu\text{g.mL}^{-1}$ ve 10 $\mu\text{g.mL}^{-1}$ konsantrasyondaki çözeltiler hemen, 6 saat ve 24 saat sonra analiz edilmiş ve elde edilen sonuçlar Tablo 4.5' de gösterilmiştir.

Tablo 4.5. Analitik yöntem validasyonunda NS' a ait stabilite sonuçları.

Ölçüm Zamanı (saat)	Konsantrasyon ($\mu\text{g.mL}^{-1}$)	Hesaplanan Konsantrasyon ($X \pm SS$)	Geri Kazanım (%)	VK (%)
0	0.1	0.1014 ± 0.0012	101.40	1.1494
6	0.1	0.1015 ± 0.0016	101.50	1.3733
24	0.1	0.1021 ± 0.0007	101.10	0.6789
0	10	10.0055 ± 0.0510	100.05	0.5097
6	10	10.0648 ± 0.0449	100.64	0.4461
24	10	10.0022 ± 0.0521	100.02	0.5208

4.3. Doku İskelelerinin İn Vitro Karakterizasyonu

4.3.1. Çap - Kalınlık Tayini

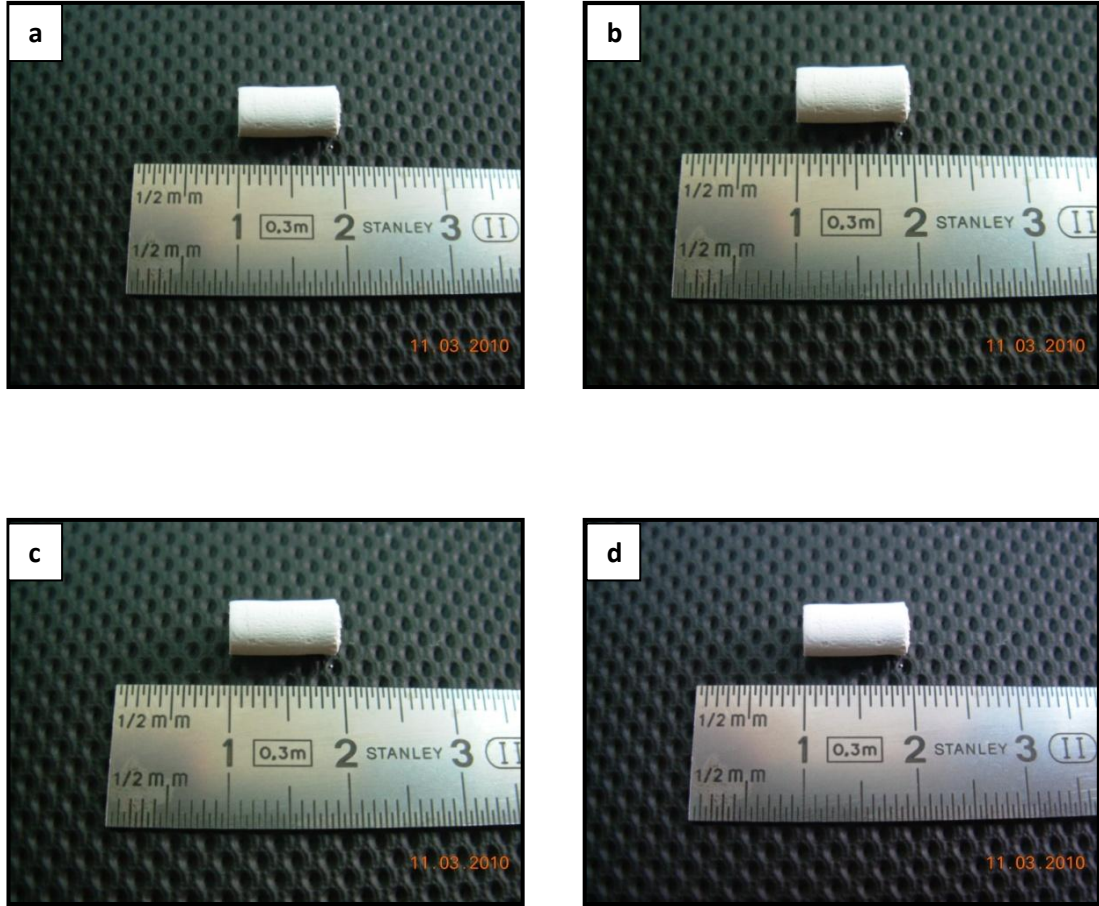
Bölüm 3.2.4.1’ de belirtildiği şekilde, PLGA (50:50) ve PLGA (75:25) doku iskelelerinin çap ve kalınlıkları kesim işleminden önce ve sonra gerçekleştirilmiş ve sonuçlar Tablo 4.6’ da verilmiştir.

Tablo 4.6. Hazırlanan doku iskelelerinin çap ve kalınlıkları (n = 12).

	Formülasyon	Çap (mm) (X ± SS)	Kalınlık (mm) (X ± SS)
Kesim İşleminden Önce	PLGA50-B	4.660 ± 0.0120	10.160 ± 0.0229
	PLGA50-NS	4.710 ± 0.0094	10.170 ± 0.0127
	PLGA75-B	4.650 ± 0.0128	10.160 ± 0.0143
	PLGA75-NS	4.740 ± 0.0102	10.160 ± 0.0143
Kesim İşleminden Sonra	PLGA50-B	4.660 ± 0.0120	1.940 ± 0.0136
	PLGA50-NS	4.710 ± 0.0094	1.990 ± 0.0122
	PLGA75-B	4.650 ± 0.0128	1.950 ± 0.0157
	PLGA75-NS	4.740 ± 0.0102	1.970 ± 0.0173

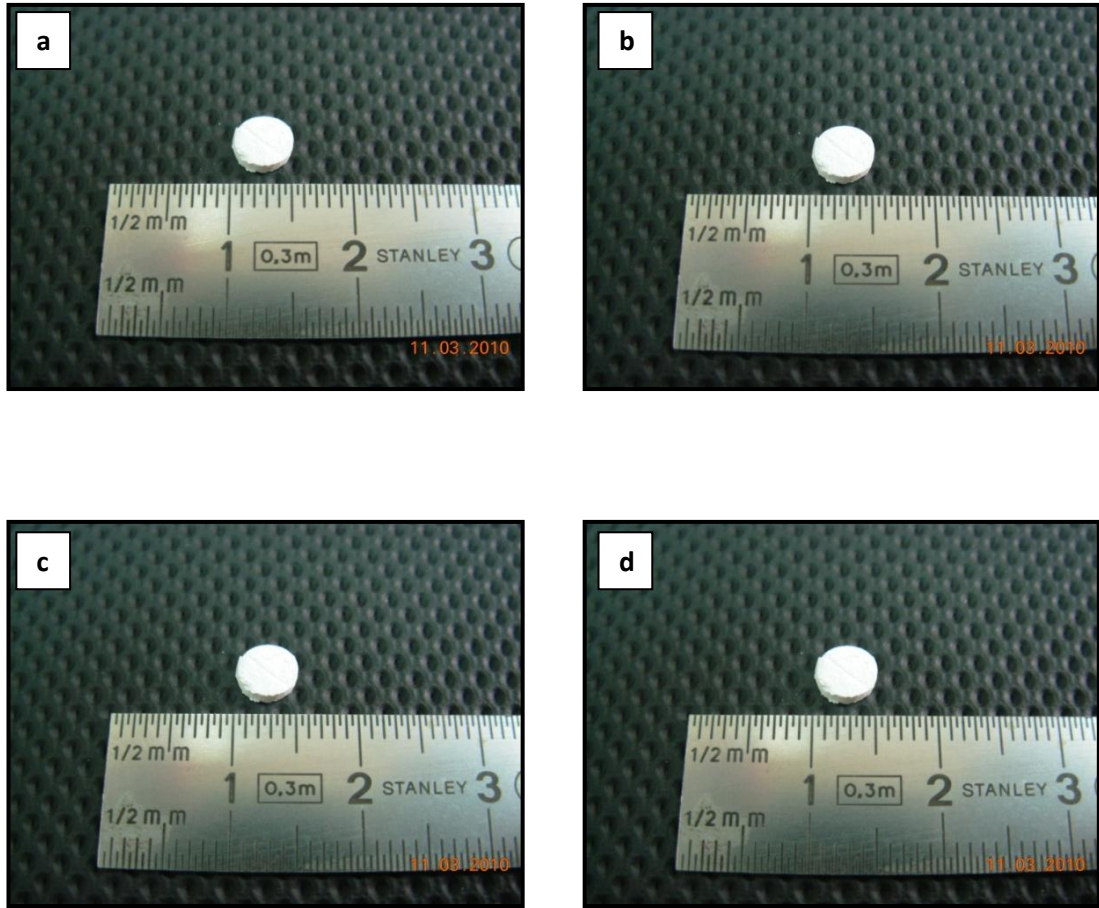
4.3.2. Morfolojik Özelliklerinin İncelenmesi

Doku iskelesi formülasyonlarının yüzey özelliklerinin incelenmesi için SEM ile görüntüleme tekniği kullanılırken, yapıların genel şekillerinin ve yüzey görüntülerinin değerlendirilmesinde dijital fotoğraf makinesi ile çekilen fotoğraflardan yararlanılmıştır. Bölüm 3.2.4.2’ de verilen formülasyon çalışmalarında anlatıldığı şekilde hazırlanan doku iskelelerinin kesim öncesi ve kesim sonrası dijital fotoğraf makinesi ile çekilen fotoğrafları Şekil 4.13 ve 4.14’ de verilmiştir.



Şekil 4.13. PLGA (50:50) ve PLGA (75:25) polimerleri ile hazırlanan doku iskelesi formülasyonlarının kesim öncesi görüntüleri.

- a) Etkin madde içermeyen PLGA (50:50) doku iskelesi,
- b) Etkin madde içermeyen PLGA (75:25) doku iskelesi,
- c) NS içeren PLGA (50:50) doku iskelesi,
- d) NS içeren PLGA (75:25) doku iskelesi.



Şekil 4.14. PLGA (50:50) ve PLGA (75:25) polimerleri ile hazırlanan doku iskelesi formülasyonlarının kesim sonrası görüntüleri.

- a) Etkin madde içermeyen PLGA (50:50) doku iskelesi,
- b) Etkin madde içermeyen PLGA (75:25) doku iskelesi,
- c) NS içeren PLGA (50:50) doku iskelesi,
- d) NS içeren PLGA (75:25) doku iskelesi.

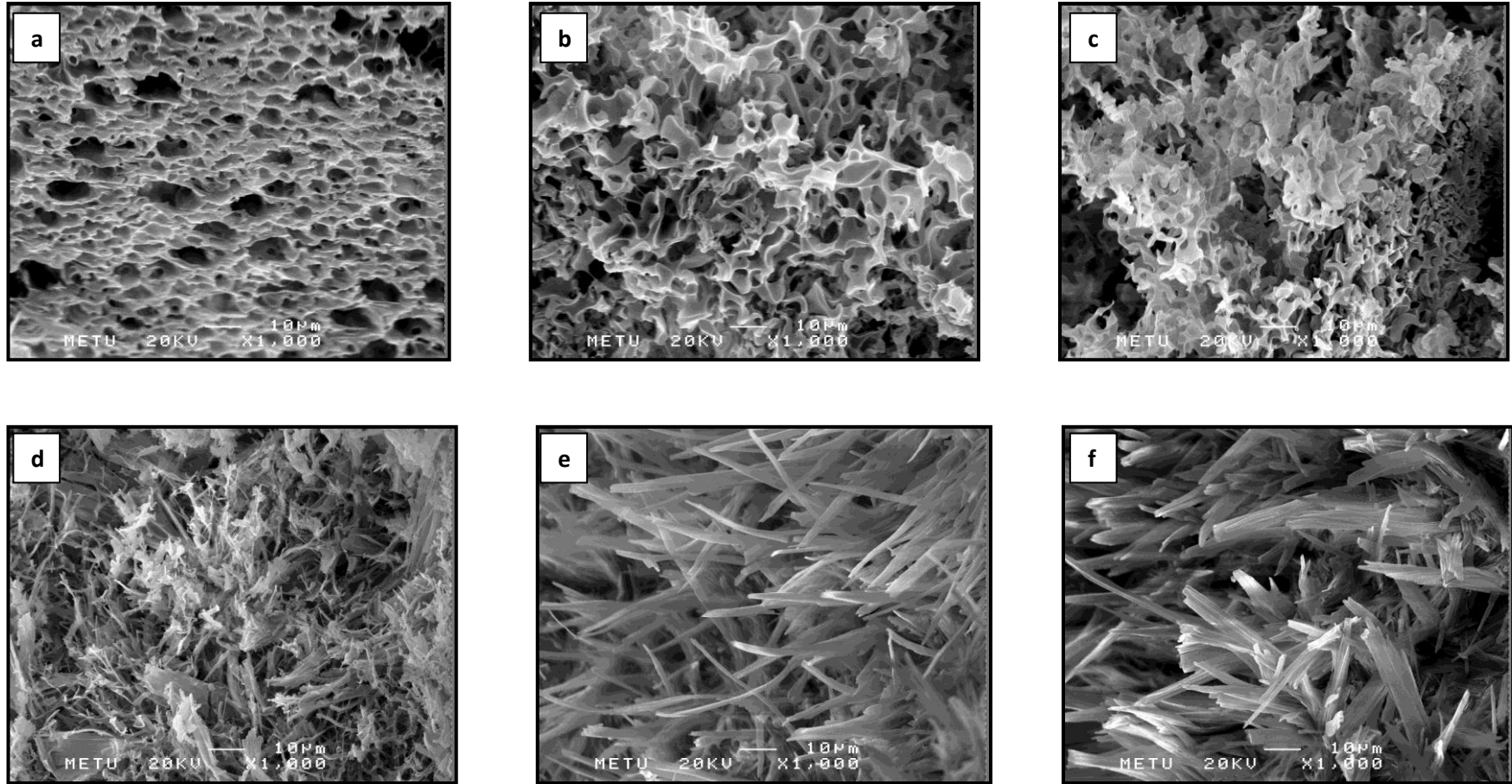
Fotoğraflardan da görüldüğü gibi hem PLGA (50:50), hem de PLGA (75:25) polimerleri ile hazırlanan doku iskelelerinin kesilmeden önce genel şekillerine bakıldığında düzgün silindirik yapı gösterdikleri görülmektedir. Yine aynı polimerlerle hazırlanan doku iskelelerinin NS yüklü olarak hazırlanmaları sonucunda da genel şekillerinde herhangi bir farklılığın olmadığı belirlenmiştir (Şekil 4.13).

PLGA (50:50) ve PLGA (75:25) polimerleri ile hazırlanan doku iskelelerinin kesim sonrası genel şekillerine bakıldığında düzgün, ince, silindirik bir yapı

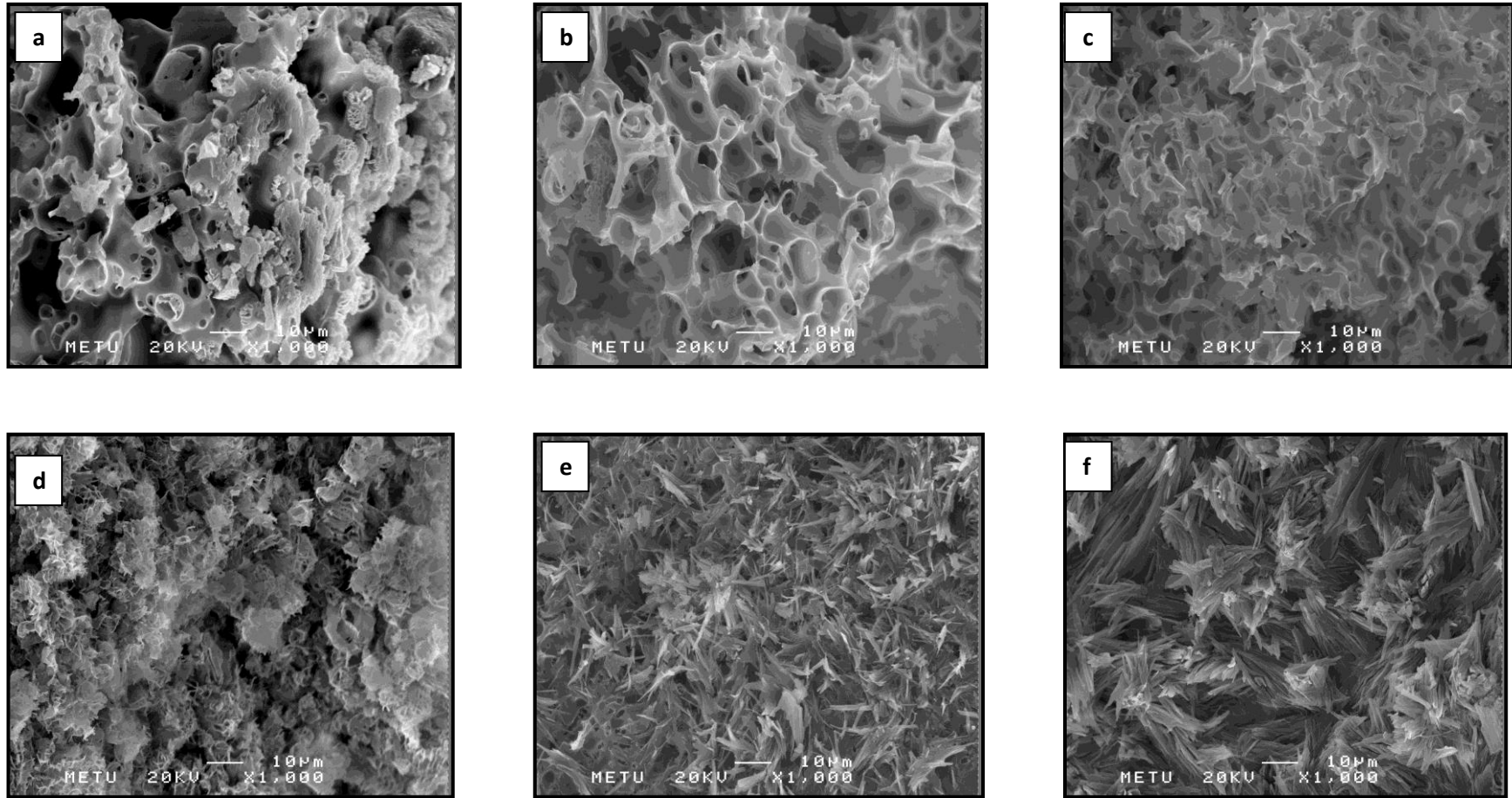
gösterdikleri ve NS yüklenmesinden sonra da bu yapının değişmediği tespit edilmiştir (Şekil 4.14).

Şekil 4.15 ve 4.16' da PLGA (50:50) ve PLGA (75:25) polimerleri ile hazırlanan doku iskelesi formülasyonlarının SEM fotoğrafları yer almaktadır. PLGA (50:50) polimeri ile hazırlanan doku iskelelerinin SEM fotoğrafları incelendiğinde, etkin madde içermeyen PLGA (50:50) doku iskelesinin poröz yapıya sahip olduğu, yapıdaki porların birbirine bağlı şekilde bulunduğu görülmektedir (Şekil 4.15a). Aynı formülasyonun kolajen veya poli-l-lizin ile kaplanmasından sonra çekilen SEM fotoğraflarında, yapıdaki poröz özelliğin bir miktar azaldığı ve daha yoğun bir yapının meydana geldiği görülmektedir (Şekil 4.15b-c). Etkin madde (NS) içeren PLGA (50:50) doku iskelesi formülasyonlarında ise formülasyona eklenen etkin maddenin etkisi ile poröz yapının bir miktar azaldığı ve lifsi yapıların meydana geldiği görülmektedir (Şekil 4.15d). Kolajen ve poli-l-lizin ile kaplanmış, NS içeren PLGA (50:50) doku iskelelerinde de poröz yapının lifsi yapıya dönüştüğü görülmektedir (Şekil 4.15e-f).

PLGA (75:25) polimeri ile hazırlanan doku iskelelerinde PLGA (50:50) doku iskelelerine göre poröz yapının azaldığı ve daha yoğun yapıların meydana geldiği görülmektedir. Şekil 4.16a' da etkin madde içermeyen PLGA (75:25) doku iskelesinin poröz yapıya sahip olduğu, yapıdaki porların birbirine bağlı şekilde bulunduğu görülmektedir. Aynı formülasyon kolajen veya poli-l-lizin ile kaplandığında poröz özelliğin bir miktar azaldığı ve yapının yoğunlaştığı görülmektedir (Şekil 4.16b-c). Etkin madde (NS) içeren PLGA (75:25) doku iskelesi formülasyonlarında ise formülasyona eklenen NS' un etkisi ile porların daha da azaldığı ve yapının daha yoğun hale geldiği görülmektedir (Şekil. 4.16d). Kolajen ve poli-l-lizin ile kaplanmış, NS içeren PLGA (75:25) doku iskelelerinde poröz özelliğin azaldığı, yapının yoğunlaştığı ve lifsi yapıların meydana geldiği görülmektedir (Şekil 4.16e-f).



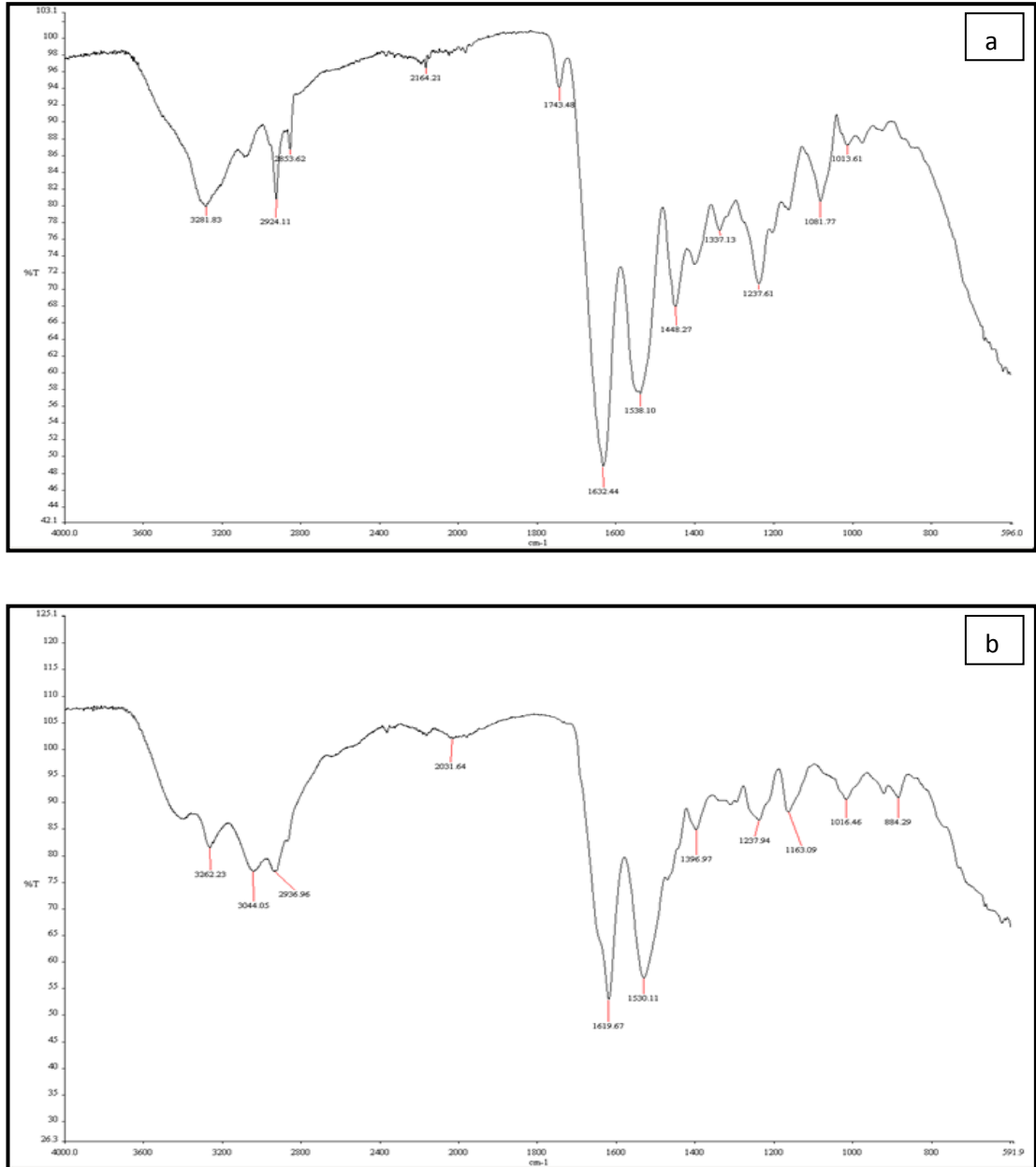
Şekil 4.15. PLGA (50:50) polimeri ile hazırlanan doku iskelesi formülasyonlarına ait SEM fotoğrafları, a) PLGA50-B, b) PLGA50-B-K, c) PLGA50-B-L, d) PLGA50-NS, e) PLGA50-NS-K, f) PLGA50-NS-L.



Şekil 4.16. PLGA (75:25) polimeri ile hazırlanan doku iskelesi formülasyonlarına ait SEM fotoğrafları,
a) PLGA75-B, b) PLGA75-B-K, c) PLGA75-B-L, d) PLGA75-NS, e) PLGA75-NS-K, f) PLGA75-NS-L

4.3.3. FT-IR Spektrumlarının İncelenmesi

Hazırlanan doku iskelesi formülasyonlarının kolajen ve poli-l-lizin ile kaplama etkinliğinin değerlendirilmesi amacıyla, tüm formülasyonların ve saf halde kolajen ve poli-l-lizinin Bölüm 3.2.4.3’ de belirtildiği şekilde çekilen FT-IR spektrumları Şekil 4.17, 4.18, 4.19, 4.20 ve 4.21’ de verilmiştir.



Şekil 4.17. a) Kolajen b) Poli-l-lizinin FT-IR spektrumu.

Saf kolajene ait FT-IR spektrumu incelendiğinde (Şekil 4.17a) kolajene özgü O-H gerilim ($3600-3200\text{ cm}^{-1}$), N-H gerilim ($3500-3300\text{ cm}^{-1}$), C-H gerilim ($2960-2850\text{ cm}^{-1}$), C=O gerilim ($1760-1670\text{ cm}^{-1}$), N-H eğilim ($1650-1580\text{ cm}^{-1}$) ve C-O gerilim ($1260-1000\text{ cm}^{-1}$) absorpsiyon bandları görülmektedir. Saf poli-l-lizine ait FT-IR spektrumu incelendiğinde (Şekil 4.17b) poli-l-lizine özgü O-H gerilim ($3600-3200\text{ cm}^{-1}$), N-H gerilim ($3500-3300\text{ cm}^{-1}$), C-H gerilim ($2960-2850\text{ cm}^{-1}$), C=O gerilim ($1760-1670\text{ cm}^{-1}$) ve N-H eğilim ($1650-1580\text{ cm}^{-1}$) absorpsiyon bandları görülmektedir.

Kaplama yapılmamış, etkin madde içermeyen PLGA50-B formülasyonuna ait FT-IR spektrumu incelendiğinde (Şekil 4.18a), PLGA (50:50)' ye özgü C-H gerilim ($2960-2850\text{ cm}^{-1}$), C=O gerilim ($1760-1670\text{ cm}^{-1}$), C-O gerilim ($1260-1000\text{ cm}^{-1}$) absorpsiyon bandları görülmektedir. Kolajen kaplı olan PLGA50-B-K formülasyonunun spektrumunda (Şekil 4.18b) PLGA (50:50)' ye özgü olan C-H gerilim ($2960-2850\text{ cm}^{-1}$), C=O gerilim ($1760-1670\text{ cm}^{-1}$), C-O gerilim ($1260-1000\text{ cm}^{-1}$) absorpsiyon bandlarının yanında, kolajenin yapısında bulunan O-H gerilim ($3600-3200\text{ cm}^{-1}$) ve N-H eğilim ($1650-1580\text{ cm}^{-1}$) absorpsiyon bandları görülmektedir. Poli-l-lizin ile kaplı PLGA50-B-L formülasyonunun spektrumunda (Şekil 4.18c) PLGA (50:50)' ye özgü C-H gerilim ($2960-2850\text{ cm}^{-1}$), C=O gerilim ($1760-1670\text{ cm}^{-1}$), C-O gerilim ($1260-1000\text{ cm}^{-1}$) absorpsiyon bandlarının yanında, poli-l-lizinin yapısında bulunan N-H gerilim ($3500-3300\text{ cm}^{-1}$) absorpsiyon bandı görülmektedir.

Şekil 4.19a' da kaplama yapılmamış, etkin madde içeren PLGA50-NS formülasyonuna ait FT-IR spektrumu görülmektedir. Spektrum incelendiğinde, PLGA (50:50)' ye özgü C-H gerilim ($2960-2850\text{ cm}^{-1}$), C=O gerilim ($1760-1670\text{ cm}^{-1}$), C-O gerilim ($1260-1000\text{ cm}^{-1}$) ve NS' a özgü O-H gerilim ($3600-3200\text{ cm}^{-1}$), C=C gerilim ($1600-1500\text{ cm}^{-1}$), aromatik halka yapısındaki C-H eğilim ($810-750\text{ cm}^{-1}$) ve CH=CH yapısındaki çifte bağ eğilim ($995-910\text{ cm}^{-1}$) absorpsiyon bandları görülmektedir. Kolajen ile kaplı, etkin madde içeren PLGA50-NS-K formülasyonunun spektrumunda (Şekil 4.19b) PLGA (50:50)' ye özgü C-H gerilim ($2960-2850\text{ cm}^{-1}$), C=O gerilim ($1760-1670\text{ cm}^{-1}$), C-O gerilim ($1260-1000\text{ cm}^{-1}$), NS' a özgü O-H gerilim ($3600-3200\text{ cm}^{-1}$), C=C gerilim ($1600-1500\text{ cm}^{-1}$), aromatik halka yapısındaki C-H eğilim ($810-750\text{ cm}^{-1}$) ve CH=CH yapısındaki çifte bağ

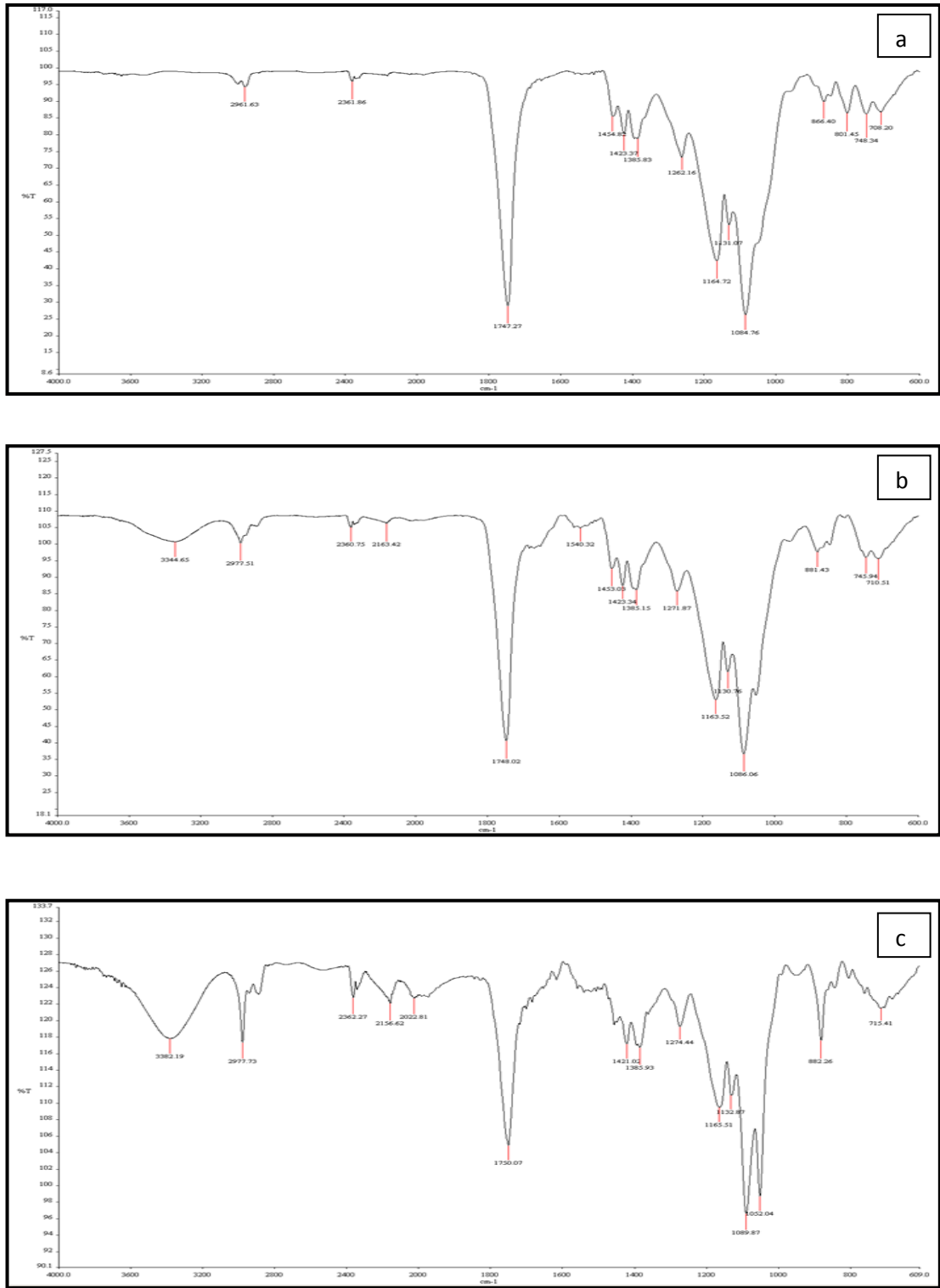
eğilim ($995-910\text{ cm}^{-1}$) absorpsiyon bandlarının yanında, kolajene özgü O-H gerilim ($3600-3200\text{ cm}^{-1}$), N-H gerilim ($3500-3300\text{ cm}^{-1}$) ve N-H eğilim ($1650-1580\text{ cm}^{-1}$) absorpsiyon bandları görülmektedir. Ayrıca poli-l-lizin ile kaplı, etkin madde içeren PLGA50-NS-L formülasyonunun spektrumunda (Şekil 4.19c) PLGA (50:50)' ye özgü C-H gerilim ($2960-2850\text{ cm}^{-1}$), C=O gerilim ($1760-1670\text{ cm}^{-1}$), C-O gerilim ($1260-1000\text{ cm}^{-1}$), NS' a özgü O-H gerilim ($3600-3200\text{ cm}^{-1}$), C=C gerilim ($1600-1500\text{ cm}^{-1}$), aromatik halka yapısındaki C-H eğilim ($810-750\text{ cm}^{-1}$) ve CH=CH yapısındaki çifte bağ eğilim ($995-910\text{ cm}^{-1}$) absorpsiyon bandlarının yanında, poli-l-lizine özgü N-H gerilim ($3500-3300\text{ cm}^{-1}$) ve N-H eğilim ($1650-1580\text{ cm}^{-1}$) absorpsiyon bandları görülmektedir.

Kaplama yapılmamış, etkin madde içermeyen PLGA75-B formülasyonuna ait FT-IR spektrumu incelendiğinde (Şekil 4.20a), PLGA (75:25)' e özgü C-H gerilim ($2960-2850\text{ cm}^{-1}$), C=O gerilim ($1760-1670\text{ cm}^{-1}$), C-O gerilim ($1260-1000\text{ cm}^{-1}$) absorpsiyon bandları görülmektedir. Kolajen kaplı PLGA75-B-K formülasyonunun spektrumunda PLGA (75:25)' e özgü olan C-H gerilim ($2960-2850\text{ cm}^{-1}$), C=O gerilim ($1760-1670\text{ cm}^{-1}$), C-O gerilim ($1260-1000\text{ cm}^{-1}$) absorpsiyon bandlarının yanında, kolajenin yapısında bulunan O-H gerilim ($3600-3200\text{ cm}^{-1}$) absorpsiyon bandı görülmektedir (Şekil 4.20b). Ayrıca poli-l-lizin ile kaplı PLGA75-B-L formülasyonunun spektrumunda PLGA (75:25)' e özgü C-H gerilim ($2960-2850\text{ cm}^{-1}$), C=O gerilim ($1760-1670\text{ cm}^{-1}$), C-O gerilim ($1260-1000\text{ cm}^{-1}$) absorpsiyon bandlarının yanında, poli-l-lizinin yapısında bulunan N-H gerilim ($3500-3300\text{ cm}^{-1}$) absorpsiyon bandı görülmektedir (Şekil 4.20c).

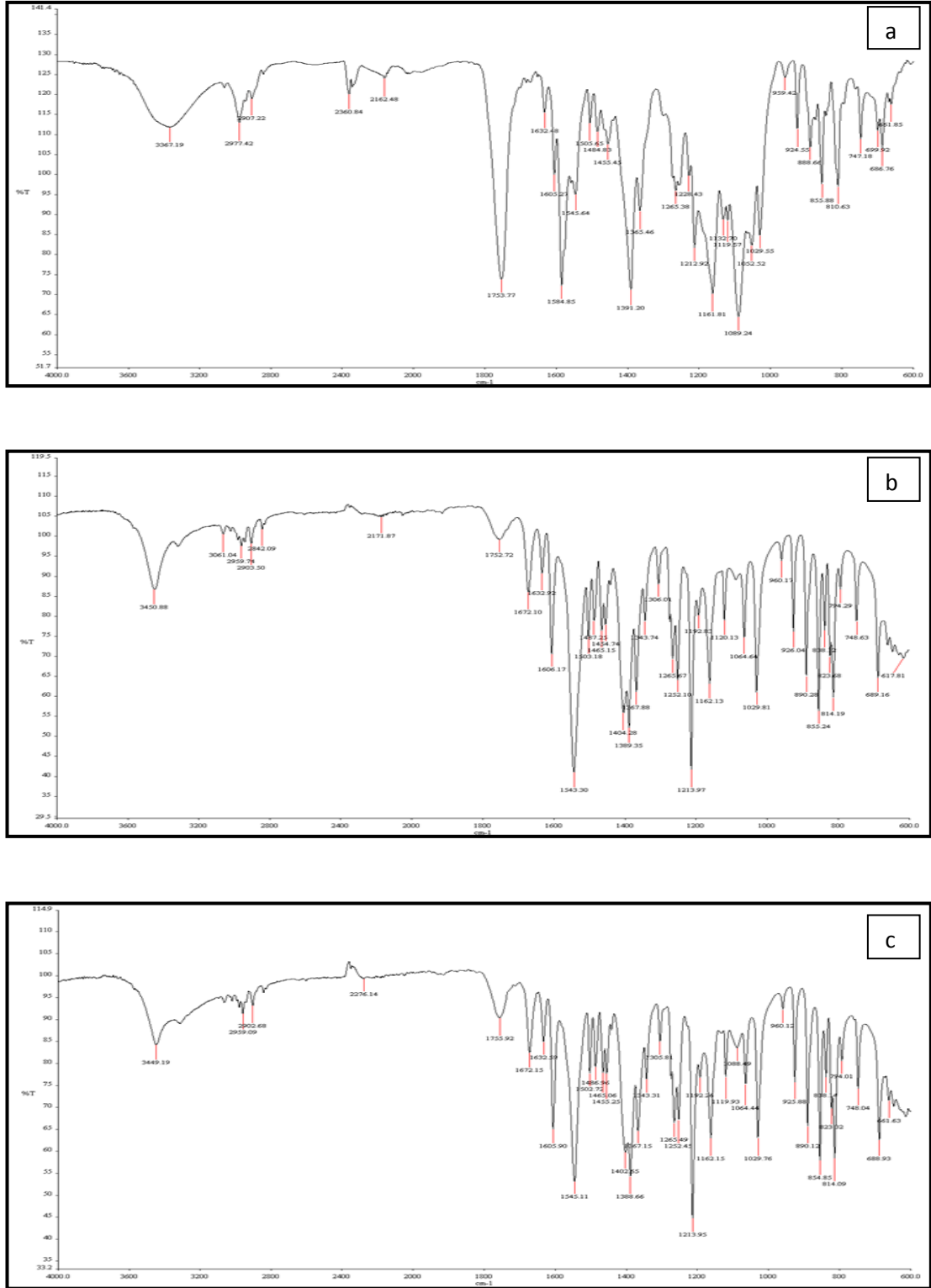
Kaplama yapılmamış, etkin madde içeren PLGA75-NS formülasyonuna ait FT-IR spektrumu incelendiğinde (Şekil 4.21a), PLGA (75:25)' e özgü C-H gerilim ($2960-2850\text{ cm}^{-1}$), C=O gerilim ($1760-1670\text{ cm}^{-1}$), C-O gerilim ($1260-1000\text{ cm}^{-1}$) ve NS' a özgü C=C gerilim ($1600-1500\text{ cm}^{-1}$), aromatik halka yapısındaki C-H eğilim ($810-750\text{ cm}^{-1}$) ve CH=CH yapısındaki çifte bağ eğilim ($995-910\text{ cm}^{-1}$) absorpsiyon bandları görülmektedir. Kolajen ile kaplı, etkin madde içeren PLGA75-NS-K formülasyonunun spektrumunda PLGA (75:25)' e özgü C-H gerilim ($2960-2850\text{ cm}^{-1}$), C=O gerilim ($1760-1670\text{ cm}^{-1}$), C-O gerilim ($1260-1000\text{ cm}^{-1}$), NS' a özgü C=C gerilim ($1600-1500\text{ cm}^{-1}$), aromatik halka yapısındaki C-H eğilim ($810-750\text{ cm}^{-1}$) ve CH=CH yapısındaki çifte bağ eğilim ($995-910\text{ cm}^{-1}$) absorpsiyon bandlarının

yanında, kolajene özgü O-H gerilim ($3600-3200\text{ cm}^{-1}$), N-H gerilim ($3500-3300\text{ cm}^{-1}$) absorpsiyon bandları görülmektedir (Şekil 4.21b). Poli-l-lizin ile kaplı, etkin madde içeren PLGA75-NS-L formülasyonunun spektrumunda PLGA (75:25)' e özgü C-H gerilim ($2960-2850\text{ cm}^{-1}$), C=O gerilim ($1760-1670\text{ cm}^{-1}$), C-O gerilim ($1260-1000\text{ cm}^{-1}$), NS' a özgü O-H gerilim ($3600-3200\text{ cm}^{-1}$), C=C gerilim ($1600-1500\text{ cm}^{-1}$), aromatik halka yapısındaki C-H eğilim ($810-750\text{ cm}^{-1}$) ve CH=CH yapısındaki çifte bağ eğilim ($995-910\text{ cm}^{-1}$) absorpsiyon bandlarının yanında, poli-l-lizine özgü N-H gerilim ($3500-3300\text{ cm}^{-1}$) ve N-H eğilim ($1650-1580\text{ cm}^{-1}$) absorpsiyon bandları görülmektedir (Şekil 4.21c).

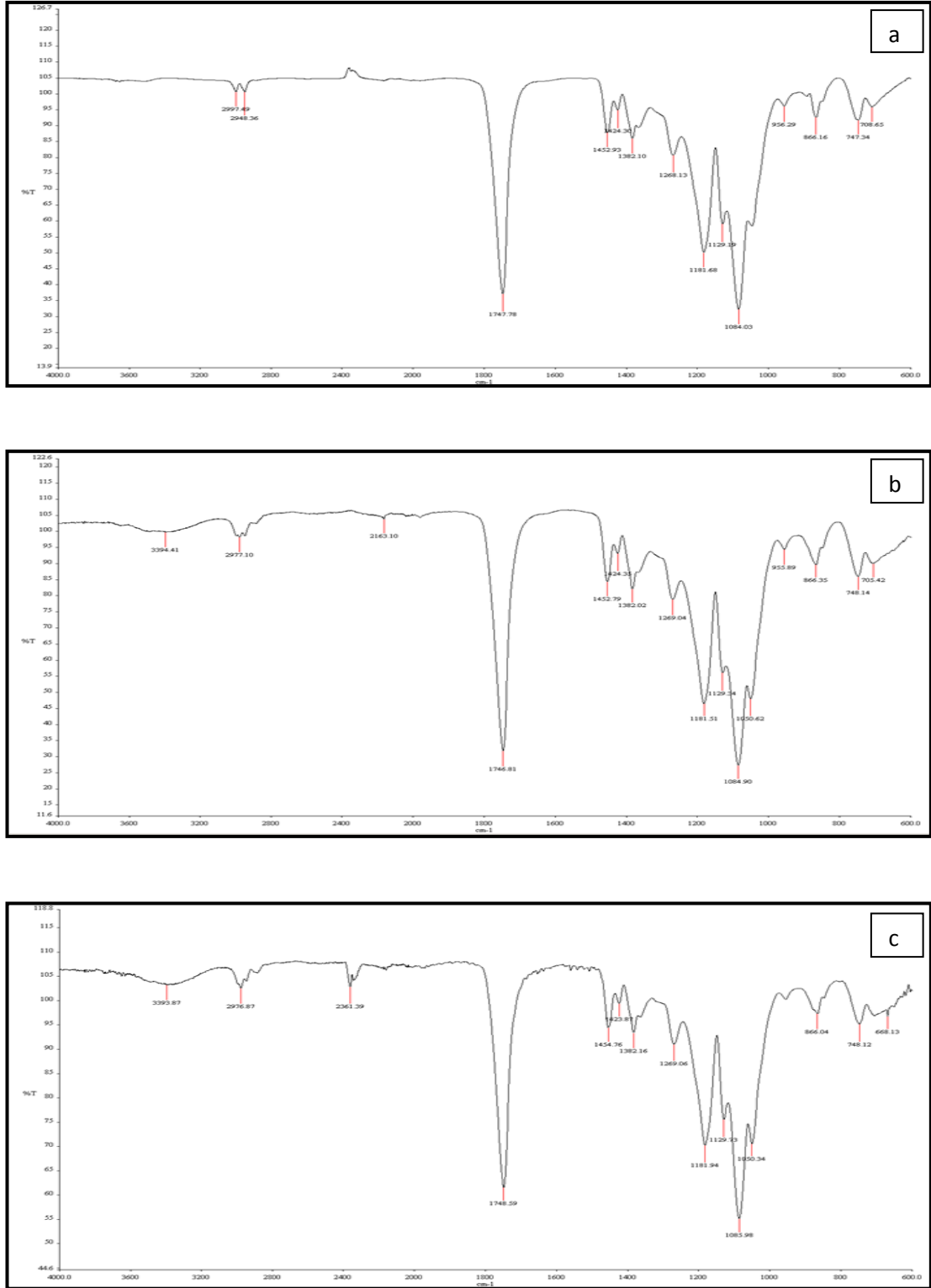
Tüm formülasyonlara ait FT-IR spektrumları incelendiğinde, kaplama yapılan formülasyonlarda kolajen veya poli-l-lizine ait karakteristik bandların varolduğu görülmektedir. Bu durum formülasyonların kolajen veya poli-l-lizin ile etkin bir şekilde kaplandığını göstermektedir.



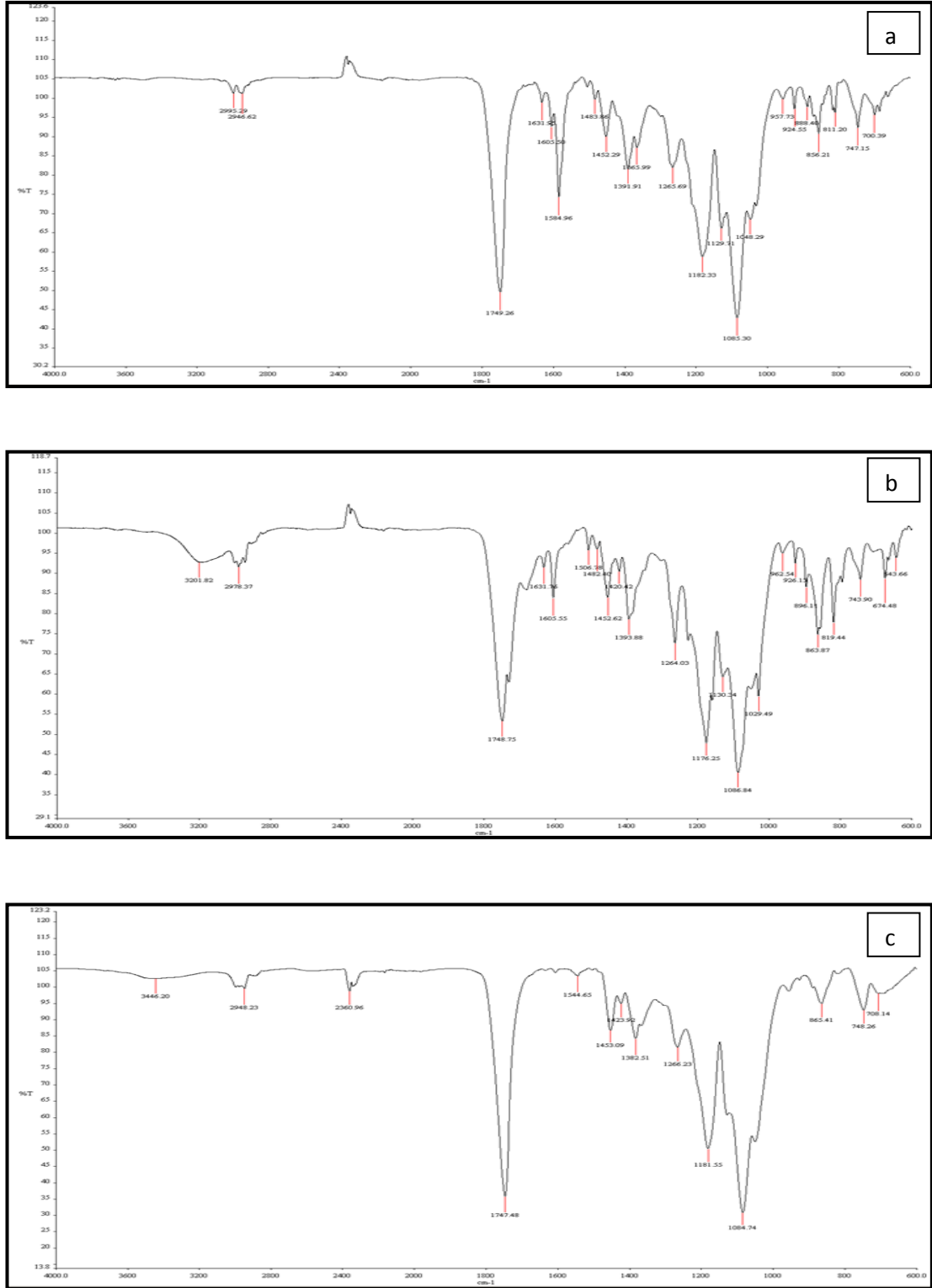
Şekil 4.18. Etkin madde içermeyen PLGA (50:50) doku iskelesi formülasyonlarının FT-IR spektrumu, a) PLGA50-B, b)PLGA50-B-K, c) PLGA50-B-L.



Şekil 4.19. Etkin madde (NS) içeren PLGA (50:50) doku iskelesi formülasyonlarının FT-IR spektrumu, a) PLGA50-NS, b)PLGA50-NS-K, c) PLGA50-NS-L.



Şekil 4.20. Etkin madde içermeyen PLGA (75:25) doku iskelesi formülasyonlarının FT-IR spektrumu, a) PLGA75-B, b)PLGA75-B-K, c) PLGA75-B-L.



Şekil 4.21. Etkin madde (NS) içeren PLGA (75:25) doku iskelesi formülasyonlarının FT-IR spektrumu, a) PLGA75-NS, b)PLGA75-NS-K, c) PLGA75-NS-L.

4.3.4. Porozite Ölçümleri

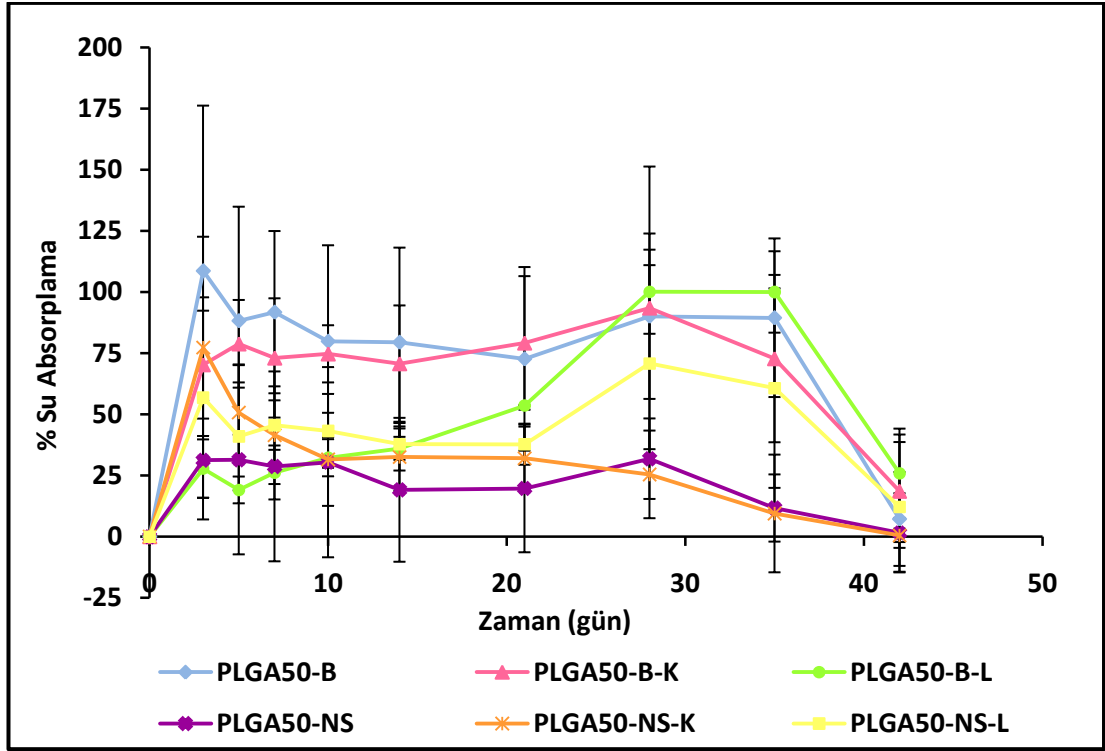
Bölüm 3.2.4.4' de belirtildiği şekilde, PLGA (50:50) ve PLGA (75:25) polimerleri kullanılarak hazırlanan tüm doku iskelesi formülasyonlarının porozite ölçümleri gerçekleştirilmiş ve sonuçlar Tablo 4.7' de verilmiştir. Elde edilen sonuçlar incelendiğinde, tüm doku iskelesi formülasyonlarında bulunan poların makropor yapısında olduğu ve sonuçların SEM fotoğraflarıyla uyumlu olduğu bulunmuştur.

Tablo 4.7. Hazırlanan doku iskelelerine ait porozite sonuçları (n = 3).

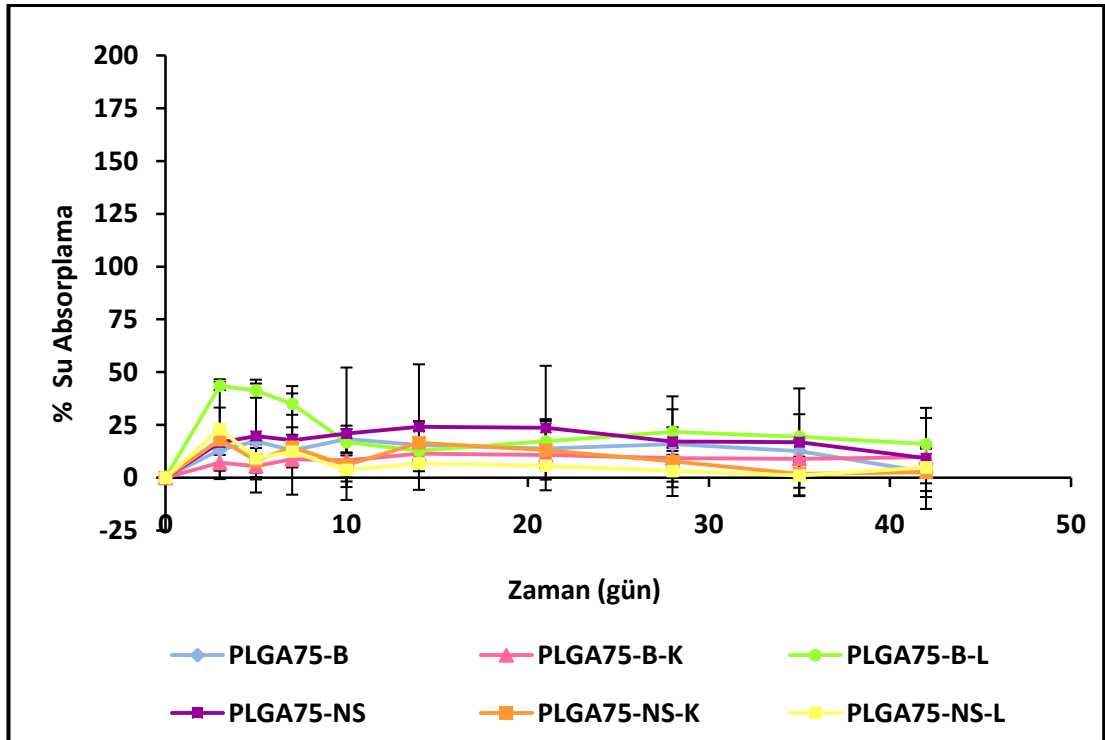
Polimer	Formülasyon	Por Çapı ($X \pm SS$) (μm)
PLGA (50:50)	PLGA50-B	173.3690 ± 17.3591
	PLGA50-B-K	168.7460 ± 21.0172
	PLGA50-B-L	169.5397 ± 20.6625
	PLGA50-NS	164.2080 ± 11.9701
	PLGA50-NS-K	163.8317 ± 11.8590
	PLGA50-NS-L	164.1207 ± 12.0731
PLGA (75:25)	PLGA75-B	168.3013 ± 20.4199
	PLGA75-B-K	168.7307 ± 20.9597
	PLGA75-B-L	169.4650 ± 20.5752
	PLGA75-NS	163.9377 ± 11.7365
	PLGA75-NS-K	163.3027 ± 11.7909
	PLGA75-NS-L	163.8907 ± 11.9714

4.3.5. Su Absorplama Özelliklerinin İncelenmesi

PLGA (50:50) ve PLGA (75:25) doku iskelelerinin su absorplama özelliklerinin incelenmesi için, bu polimerler kullanılarak hazırlanan bütün doku iskelesi formülasyonları in vitro salım ortamı olan SLF çözeltisi içinde inkübe edilmişlerdir. Bölüm 3.2.4.5' de anlatıldığı şekilde belirli zaman aralıklarında ortamdan alınarak tartıldığında, başlangıçtaki ağırlıkları esas alınarak saptanan ağırlık değişimleri, % olarak zamana karşı grafiğe geçirilmiştir. Şekil 4.22 ve 4.23' de doku iskelelerinin su absorplama grafikleri görülmektedir.



Şekil 4.22. PLGA (50:50) doku iskelelerinin su absorplama profilleri (n = 3).

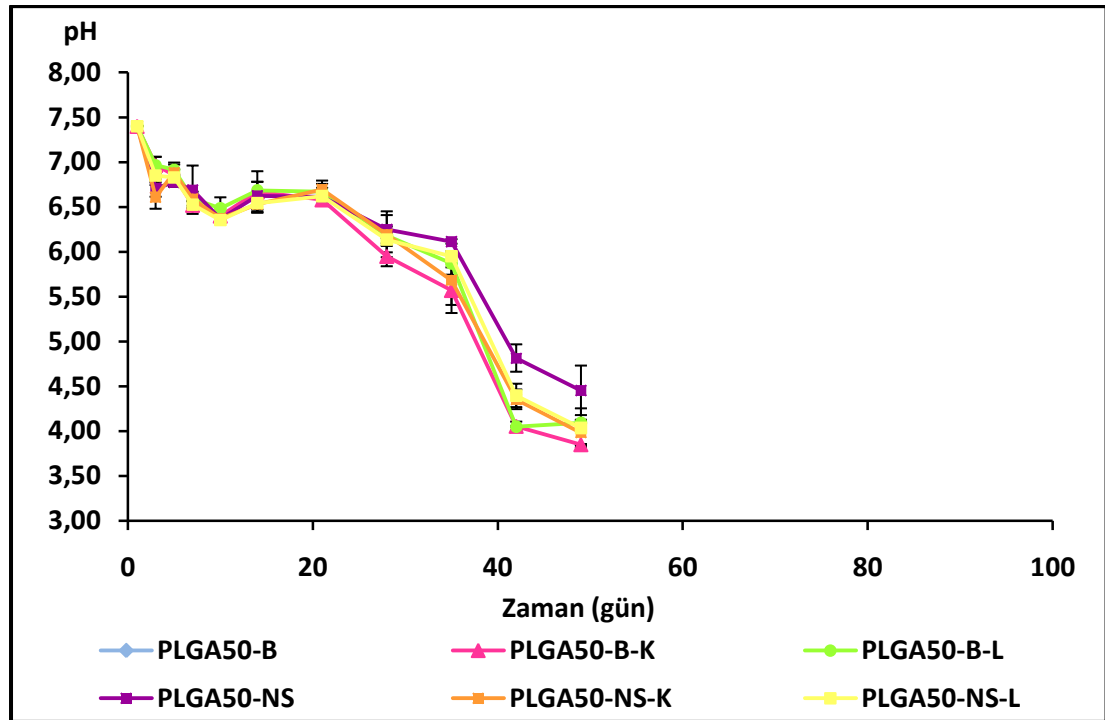


Şekil 4.23. PLGA (75:25) doku iskelelerinin su absorplama profilleri (n = 3).

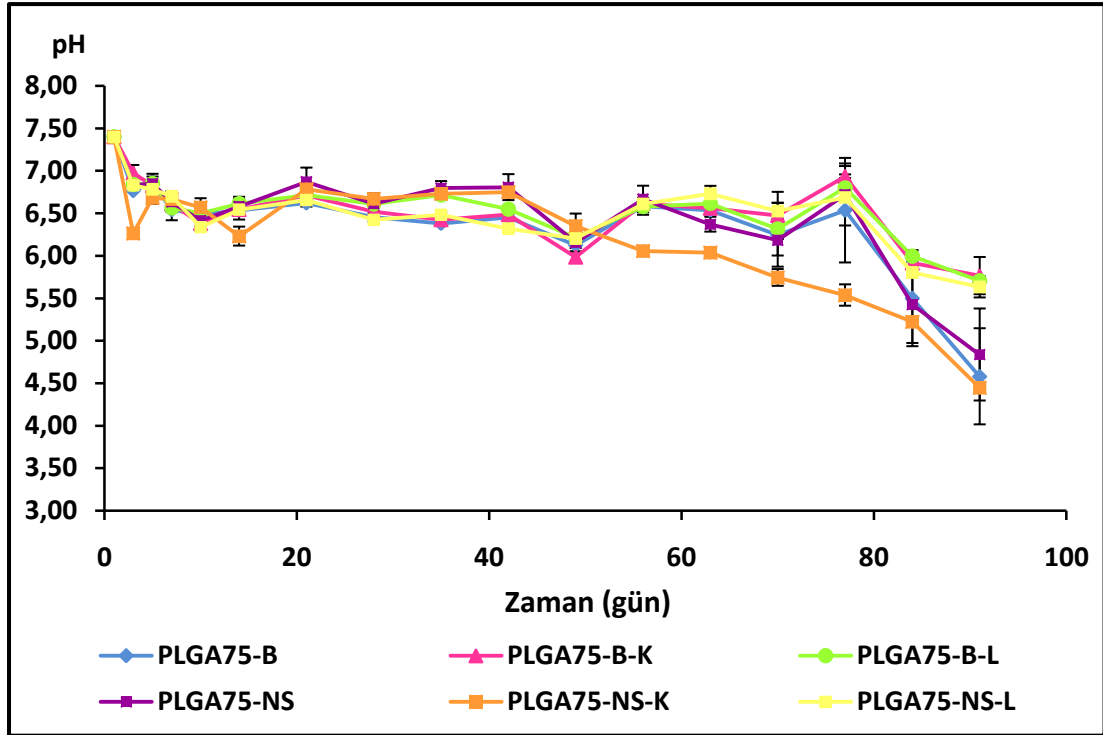
Şekil 4.22 ve 4.23’ de görüldüğü gibi başlangıçta (3. gün) tüm PLGA (50:50) ve PLGA (75:25) doku iskelesi formülasyonları için su absorplama değerleri yüksek olup, bu değerler 42. günün sonunda minimum değerlere ulaşmıştır. PLGA (50:50) polimerinin hidrofilik yapısı nedeniyle, bu polimer kullanılarak hazırlanan tüm formülasyonların su absorplama değerleri PLGA (75:25) polimerinin kullanıldığı formülasyonlara göre her zaman noktası için daha yüksek bulunmuştur ($p < 0.05$).

4.3.6. İn Vitro Degradasyon

Doku iskelelerinin in vitro degradasyon özelliklerinin incelenmesi için, hazırlanan tüm doku iskelesi formülasyonları in vitro salım ortamı olan SLF çözeltisi içinde inkübe edilmişlerdir. Bölüm 3.2.4.6’ da anlatıldığı şekilde belirli zaman aralıklarında doku iskelelerinin içinde bulunduğu inkübasyon çözeltisinin pH’ ısı ölçülerek zamana karşı grafiğe geçirilmiştir. Şekil 4.24 ve 4.25’ de doku iskelelerinin in vitro degradasyon grafikleri görülmektedir.



Şekil 4.24. PLGA (50:50) doku iskelelerinin in vitro degradasyon profilleri.



Şekil 4.25. PLGA (75:25) doku iskelelerinin in vitro degradasyon profilleri.

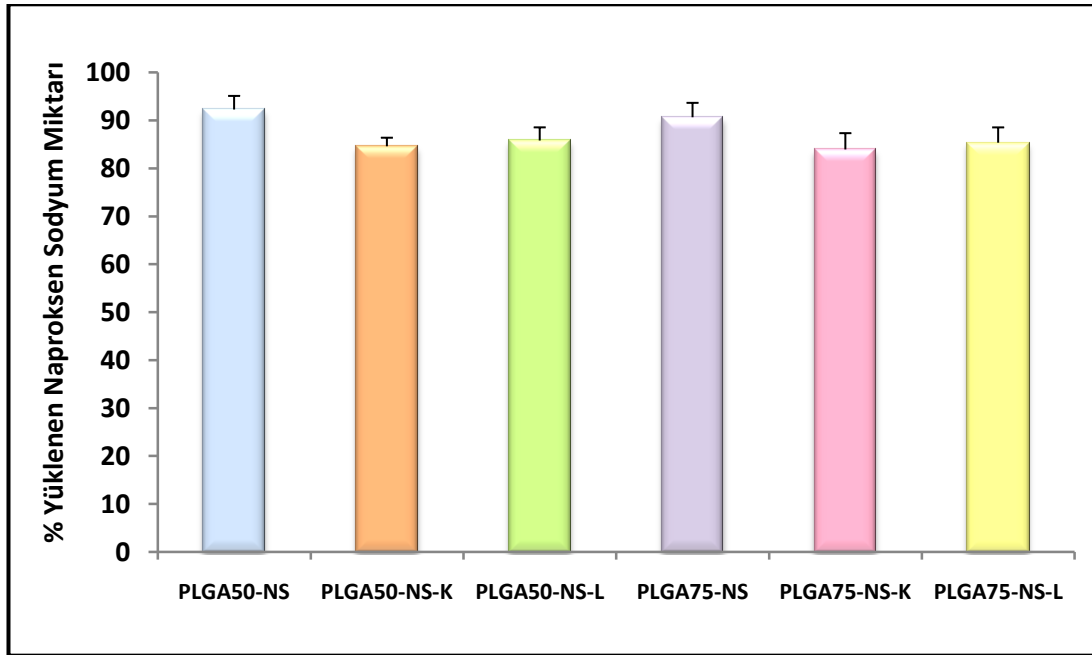
Şekil 4.24 ve 4.25’ de görüldüğü gibi başlangıçta (3. gün) PLGA (50:50) ve PLGA (75:25) doku iskelesi formülasyonlarının bulunduğu inkübasyon çözeltisinin pH değerleri 6.5-7.5 arasında bulunmuştur. PLGA (50:50) polimerinin kullanıldığı formülasyonlar için 21. gün, PLGA (75:25) polimerinin kullanıldığı formülasyonlar için ise 77. güne kadar pH değerlerinde çok fazla bir değişim olmamış, bu günlerden sonra pH’ nın belirgin bir şekilde düşmeye başladığı ve PLGA (50:50) formülasyonları için 49. gün ve PLGA (75:25) formülasyonları için 91. günde pH değerlerinin minimuma ulaştığı görülmüştür. Formülasyonlara eklenen etkin maddenin (NS) veya kaplama ajanlarının (kolajen, poli-l-lizin) pH değerleri üzerinde herhangi bir etkisi olmamıştır ($p > 0.05$).

4.3.7. Doku İskelelerine Yüklenen NS Miktarının Belirlenmesi

PLGA (50:50) ve PLGA (75:25) polimerleri ile hazırlanan doku iskelelerine yüklenen NS miktarının belirlenmesi, Bölüm 3.2.4.7’ de açıklandığı şekilde yapılmış ve sonuçlar yükleme etkinliği (%) olarak Tablo 4.8 ve Şekil 4.26’ da verilmiştir.

Tablo 4.8. NS içeren doku iskelesi formülasyonlarına ilişkin yükleme etkinliği sonuçları (n = 3, $\bar{X} \pm SS$).

Formülasyon	Yükleme Etkinliği (%)
PLGA50-NS	92.2849 $\pm$ 2.8420
PLGA50-NS-K	84.6201 $\pm$ 1.7882
PLGA50-NS-L	85.8228 $\pm$ 2.7439
PLGA75-NS	90.6720 $\pm$ 3.0033
PLGA75-NS-K	83.9591 $\pm$ 3.4006
PLGA75-NS-L	85.2667 $\pm$ 3.1946

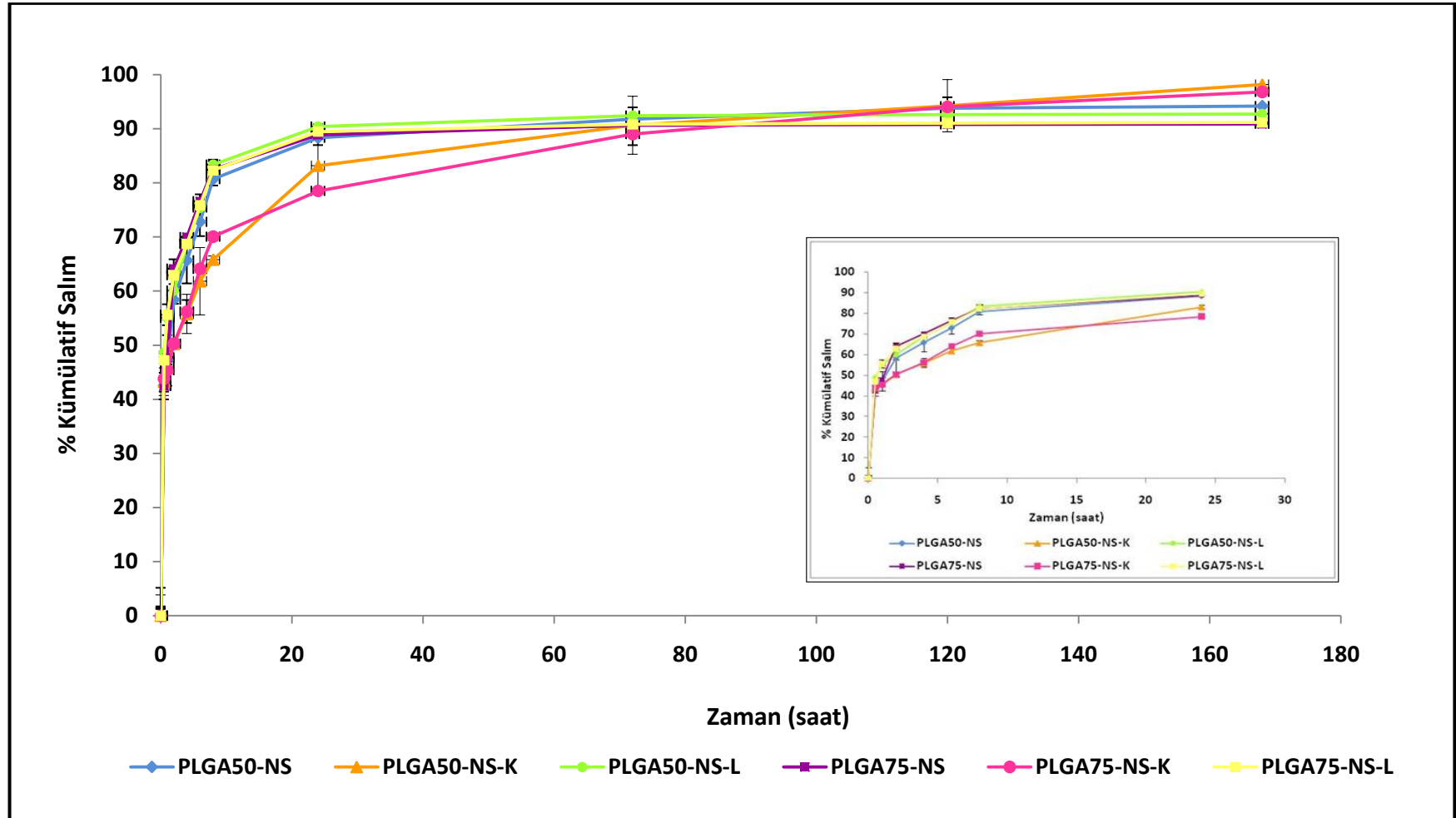


Şekil 4.26. NS içeren doku iskelesi formülasyonlarına ilişkin yükleme etkinliği sonuçları (n = 6).

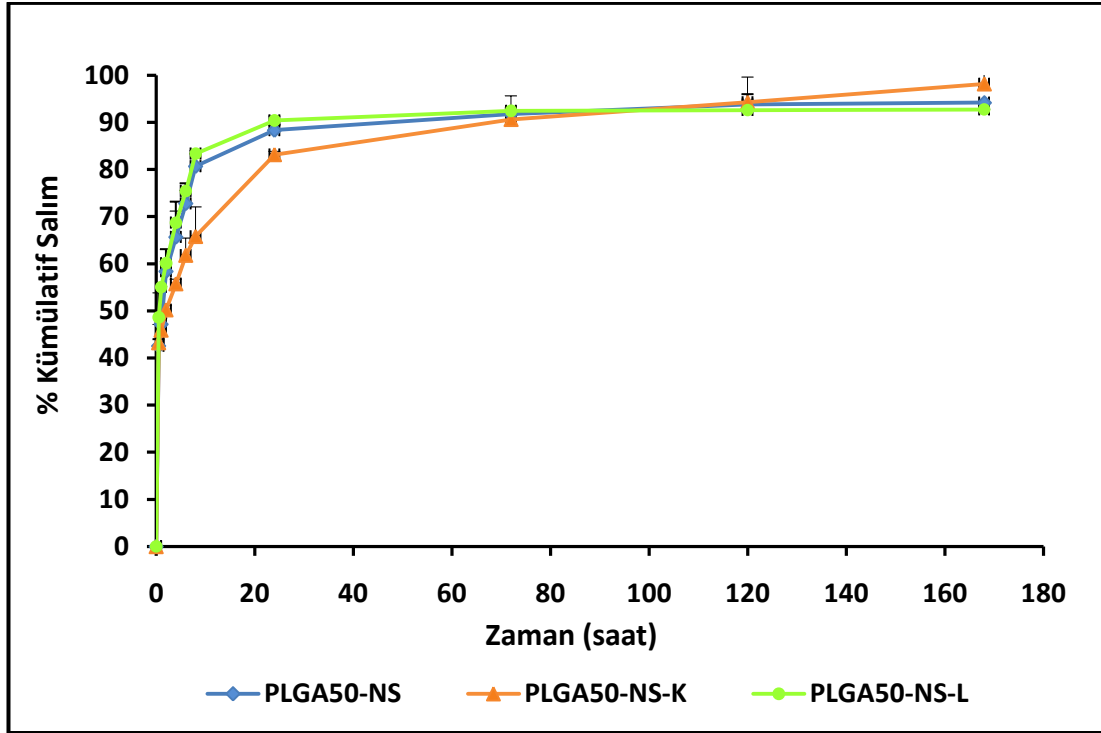
4.4. İn Vitro Salım Deneyleri

PLGA (50:50) ve PLGA (75:25) polimerleri ile hazırlanan doku iskelelerine ait salım profilleri Şekil 4.27, 4.28, 4.29, 4.30, 4.31 ve 4.32’ de verilmiştir. Verilen profillerde büyük grafikte toplu, küçük grafikte ise ilk 24 saat sonucunda elde edilen veriler daha genişletilmiş şekilde gösterilmektedir. Salım çalışması 7 gün boyunca

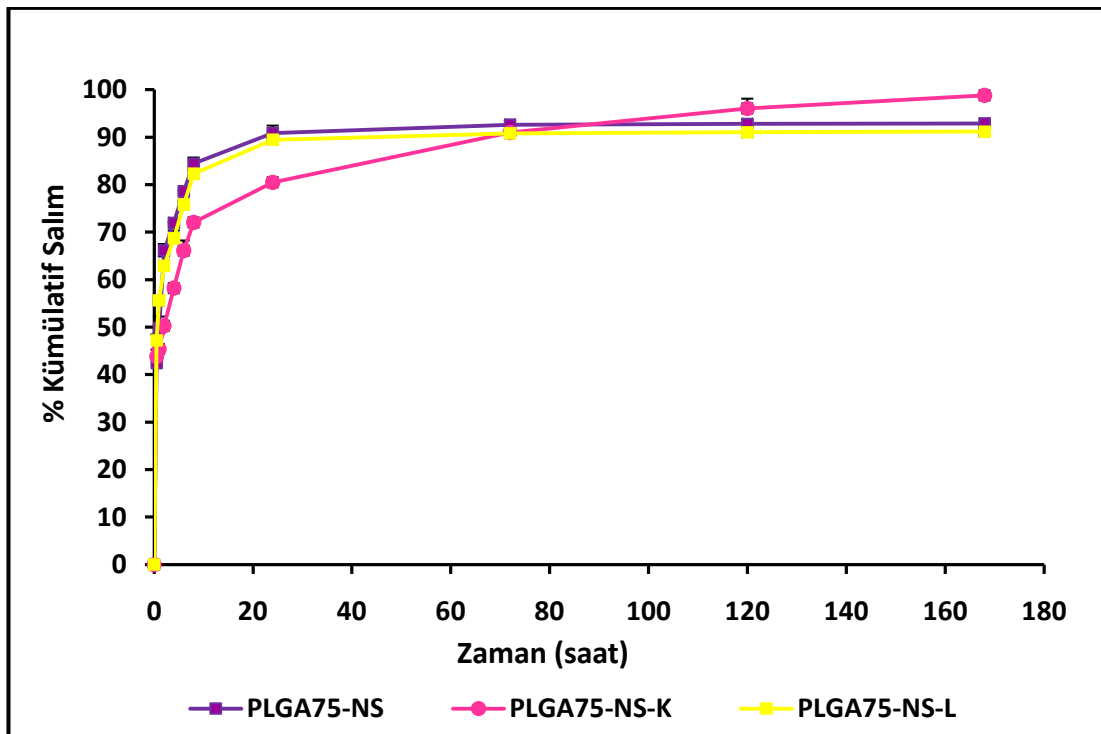
sürmüş ve 7. günün sonunda NS' un % 90-98' i salınmıştır. Salım profili bifazik olup, başlangıç “burst release” patlama salımını takiben daha yavaş bir salım elde edilmiştir.



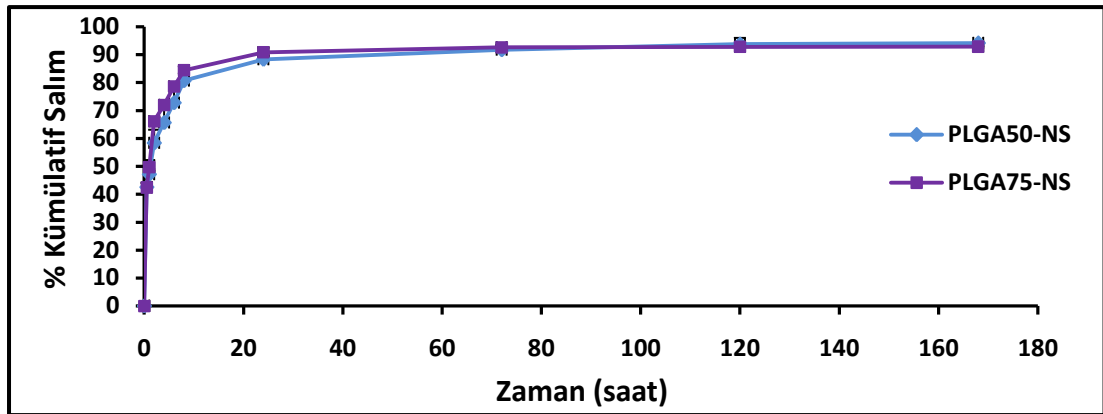
Şekil 4.27. PLGA (50:50) ve PLGA (75:25) doku iskelelerinden NS' un in vitro salım profili (n = 6).



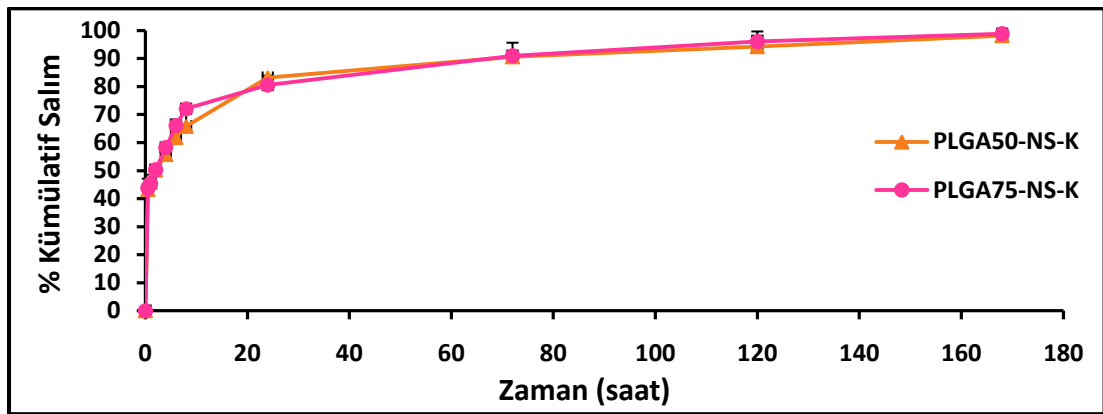
Şekil 4.28. PLGA (50:50) doku iskelelerinden NS' un salım profili (n = 6).



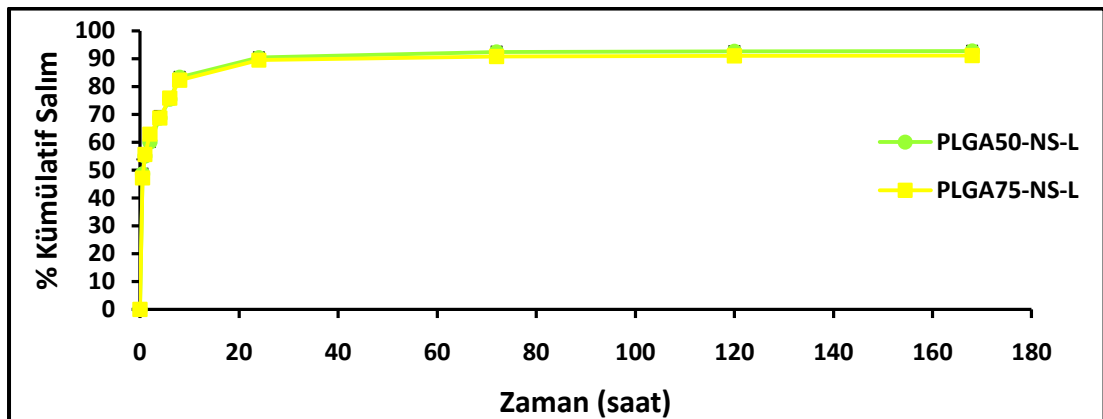
Şekil 4.29. PLGA (75:25) doku iskelelerinden NS' un salım profili (n = 6).



Şekil 4.30. Kaplama yapılmamış PLGA (50:50) ve PLGA (75:25) doku iskelelerinden NS' un salım profili (n = 6).



Şekil 4.31. Kolajen kaplı PLGA (50:50) ve PLGA (75:25) doku iskelelerinden NS' un salım profili (n = 6).



Şekil 4.32. Poli-l-lizin kaplı PLGA (50:50) ve PLGA (75:25) doku iskelelerinden NS' un salım profili (n = 6).

PLGA (50:50) ve PLGA (75:25) polimerleri ile hazırlanan doku iskelelerine ait in vitro salım çalışmalarından elde edilen verilere ait sonuçlar sıfırncı derece, birinci derece, Higuchi, RRSBW ve Hixon-Crowell eşitlikleri uyum iyiliği yöntemine göre değerlendirilmiş olup sonuçlar Tablo 4.9 ve 4.10’ da gösterilmiştir. Buna göre tüm doku iskelelerinden NS’ un salımı RRSBW salım kinetiğine uymaktadır.

Tablo 4.9. PLGA (50:50) doku iskelesi formülasyonlarının salım kinetiklerinin değerlendirilmesi.

Formülasyon		Salım Hızı (m)	Salım Miktarı (n)	r ²
PLGA50-NS	Sıfırncı Derece	0.2209 ± 0.0258	58.2286 ± 2.0519	0.5296
	Birinci Derece	0.0083 ± 0.0018	3.6624 ± 0.0736	0.6711
	Higuchi	3.4326 ± 0.4524	50.8147 ± 1.9742	0.7062
	RRSBW	0.2553 ± 0.0462	0.4556 ± 0.0901	0.9322
	Hixon-Crowell	0,0081 ± 0,0014	1.2237 ± 0.0718	0.6236
PLGA50-NS-K	Sıfırncı Derece	0.2209 ± 0.1571	55.1382 ± 0.5381	0.5933
	Birinci Derece	0.0122 ± 0.0132	3.7800 ± 0.0021	0.7328
	Higuchi	3.3448 ± 2.3063	48.1413 ± 5.1685	0.7666
	RRSBW	0.2573 ± 0.1925	0.5104 ± 0.2048	0.9413
	Hixon-Crowell	0.0098 ± 0.0093	1.1135 ± 0.0062	0.6867
PLGA50-NS-L	Sıfırncı Derece	0.1746 ± 0.0433	64.7047 ± 3.6679	0.5005
	Birinci Derece	0.0076 ± 0.0033	3.4870 ± 0.1128	0.6100
	Higuchi	2.7445 ± 0.6940	58.6935 ± 4.4382	0.6846
	RRSBW	0.2093 ± 0.0623	0.2114 ± 0.1424	0.9328
	Hixon-Crowell	0.0070 ± 0.0025	1.4145 ± 0.1149	0.5743

Sıfırncı derece: Salım hızı (m) (saat⁻¹), Birinci derece: Salım hızı (m) (saat⁻¹), Higuchi: Salım hızı (m) (saat^{-1/2}), Hixon-Crowell: Salım hızı (m) (saat⁻¹), RRSBW: Salım hızı (m) (saat⁻¹).

Tablo 4.10. PLGA (75:25) doku iskelesi formülasyonlarının salım kinetiklerinin değerlendirilmesi.

Formülasyon		Salım Hızı (m)	Salım Miktarı (n)	r ²
PLGA75-NS	Sıfırıncı Derece	0.1722 ± 0.0297	62.4012 ± 6.4757	0.4701
	Birinci Derece	0.0064 ± 0.0014	3.5514 ± 0.1853	0.5700
	Higuchi	2.7249 ± 0.4639	56.3867 ± 7.0523	0.6526
	RRSBW	0.2048 ± 0.0369	0.2804 ± 0.2001	0.9126
	Hixon-Crowell	0.0063 ± 0.0011	1.3457 ± 0.1992	0.5372
PLGA75-NS-K	Sıfırıncı Derece	0.3356 ± 0.0916	56.4583 ± 2.7313	0.7271
	Birinci Derece	0.0172 ± 0.0047	3.7789 ± 0.1017	0.9244
	Higuchi	4.5642 ± 0.7473	47.7738 ± 3.3107	0.8816
	RRSBW	0.3066 ± 0.0161	0.4933 ± 0.0562	0.9769
	Hixon-Crowell	0.0147 ± 0.0040	1.1292 ± 0.0967	0.8696
PLGA75-NS-L	Sıfırıncı Derece	0.1650 ± 0.0193	62.3216 ± 3.5911	0.4950
	Birinci Derece	0.0061 ± 0.0016	3.5710 ± 0.1137	0.5840
	Higuchi	2.5961 ± 0.3187	56.6305 ± 3.4207	0.6792
	RRSBW	0.1909 ± 0.0298	0.2602 ± 0.0893	0.9236
	Hixon-Crowell	0.0060 ± 0.0012	1.3306 ± 0.1177	0.5553

Sıfırıncı derece: Salım hızı (m) (saat⁻¹), Birinci derece: Salım hızı (m) (saat⁻¹), Higuchi: Salım hızı (m) (saat^{-1/2}), Hixon-Crowell: Salım hızı (m) (saat⁻¹), RRSBW: Salım hızı (m) (saat⁻¹).

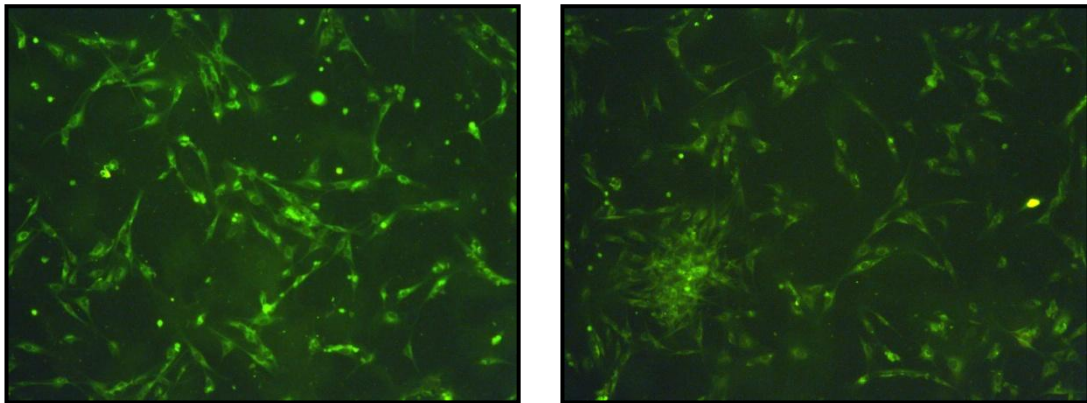
f_2 benzerlik faktörü kullanılarak yapılan hesaplamalarda PLGA50-NS-K ve PLGA50-NS-L doku iskelesi formülasyonlarının referans formülasyon olan PLGA50-NS' den farklı olmadığı ($f_2 > 50$) görülmüştür. PLGA50-NS-K ve PLGA50-NS-L için $f_2 = 53.325$ ve $f_2 = 68,073$ olarak bulunmuştur. Yine PLGA75-NS-K ve PLGA75-NS-L doku iskelesi formülasyonlarının da referans formülasyon olan PLGA75-NS' den farklı olmadığı ($f_2 > 50$) görülmüştür. PLGA75-NS-K ve PLGA75-NS-L için $f_2 = 50.332$ ve $f_2 = 71.656$ olarak bulunmuştur. PLGA50-NS ile

PLGA75-NS formülasyonları karşılaştırıldığında $f_2 = 74.013$, PLGA50-NS-K ile PLGA75-NS-K karşılaştırıldığında $f_2 = 82.773$, PLGA50-NS-L ile PLGA75-NS-L karşılaştırıldığında $f_2 = 89.363$ olarak bulunmuştur. Buna göre PLGA (50:50) kullanılarak hazırlanan formülasyonların PLGA (75:25) kullanılarak hazırlanan formülasyonlarla benzer olduğu söylenebilir ($f_2 > 50$).

4.5. Hücre Kültürü Çalışmaları

4.5.1. İzole Edilen Hücrelerin İmmünohistokimyasal İncelenmesi

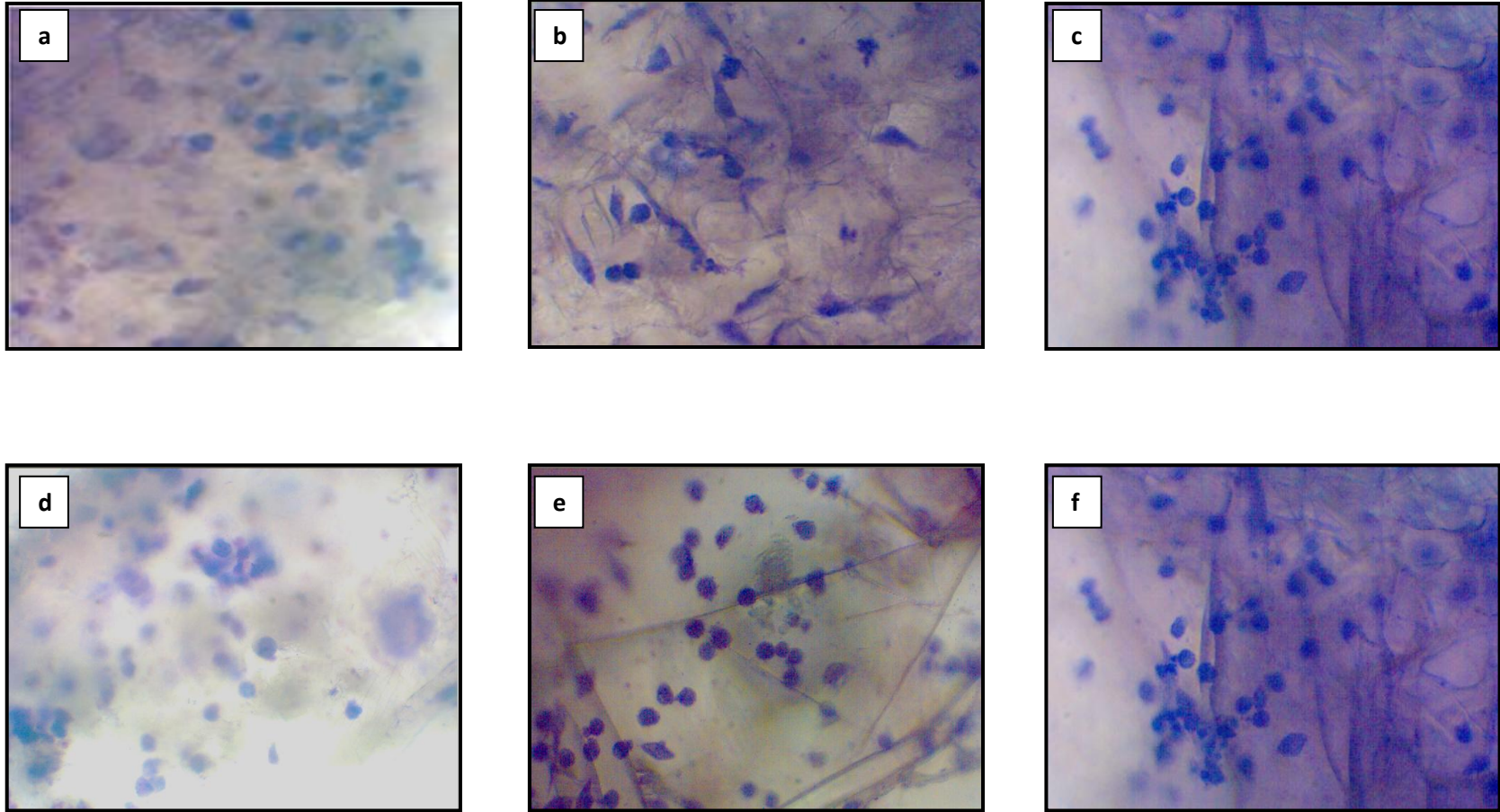
Tavşan korneasından izole edilen epitel hücrelerin tanımlanması için gerekli çalışmalar Bölüm 3.2.6.2' de belirtildiği şekilde yapılmış ve floresan mikroskop fotoğrafları Şekil 4.33' de verilmiştir. Verilen fotoğraflarda kornea epitel hücrelerine spesifik FITC konjuge keratin 14 ile boyanmış hücreler (membranları) yeşil renkte görülmektedir.



Şekil 4.33. FITC ile konjuge edilmiş keratin 14 ile boyanmış kornea epitel hücreleri.

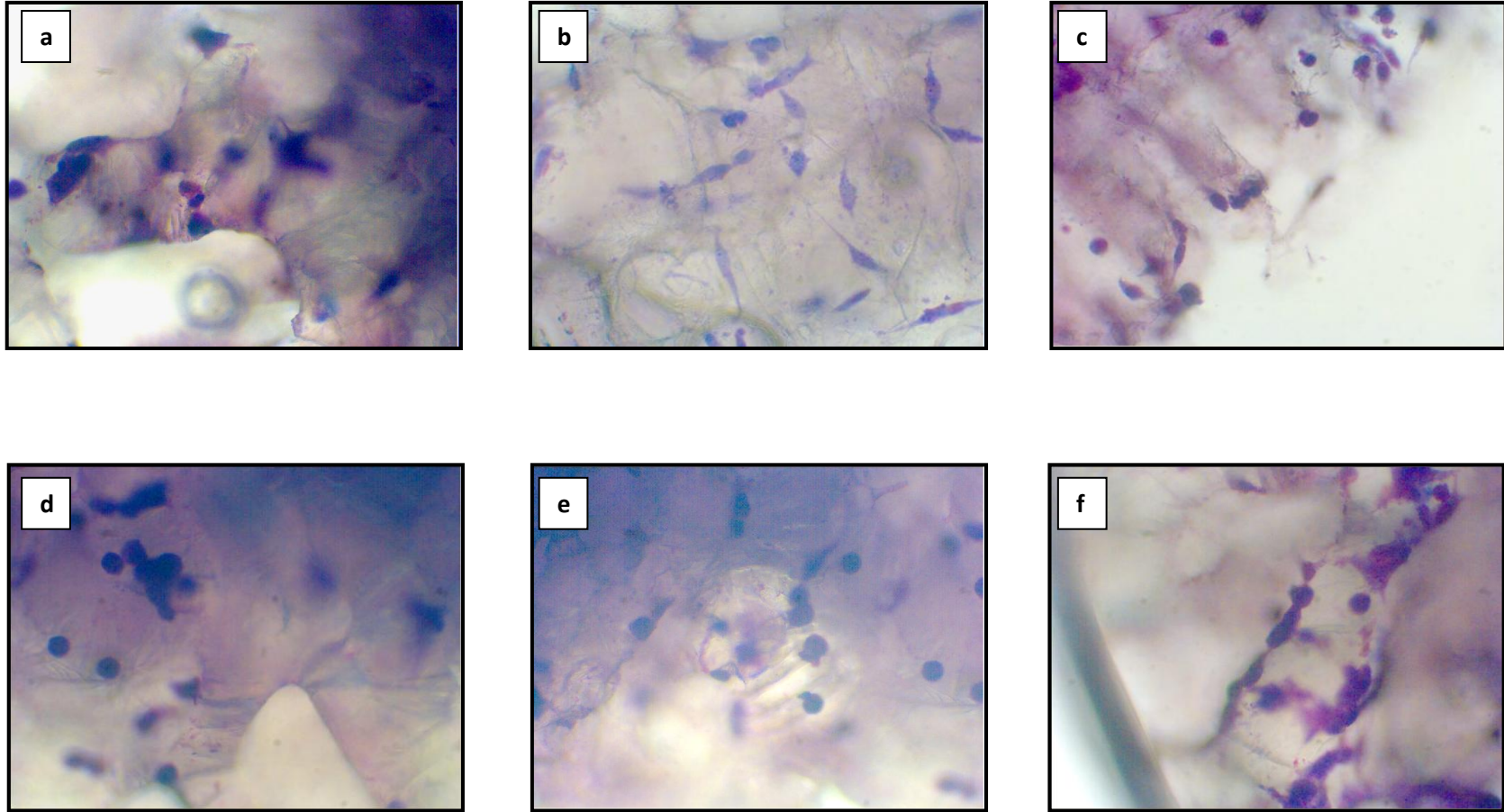
4.5.2. Hücre Adezyonunun Mikroskopik Olarak İncelenmesi

Hazırlanan doku iskelelerine hücre adezyonunun incelenmesi için gerekli çalışmalar Bölüm 3.2.6.3' de belirtildiği şekilde yapılmış ve optik mikroskop fotoğrafları Şekil 4.34 ve Şekil 4.35' de verilmiştir. Verilen fotoğraflarda PLGA (50:50) ve PLGA (75:25) doku iskelesi formülasyonları üzerine adhere olan kornea epitel hücreleri mor renkte görülmektedir.



Şekil 4.34. Kornea epitel hücrelerini içeren PLGA (50:50) doku iskelesi formülasyonlarına ait optik mikroskop fotoğrafları,

a) PLGA50-B, b) PLGA50-B-K, c) PLGA50-B-L, d) PLGA50-NS, e) PLGA50-NS-K, f) PLGA50-NS-L.

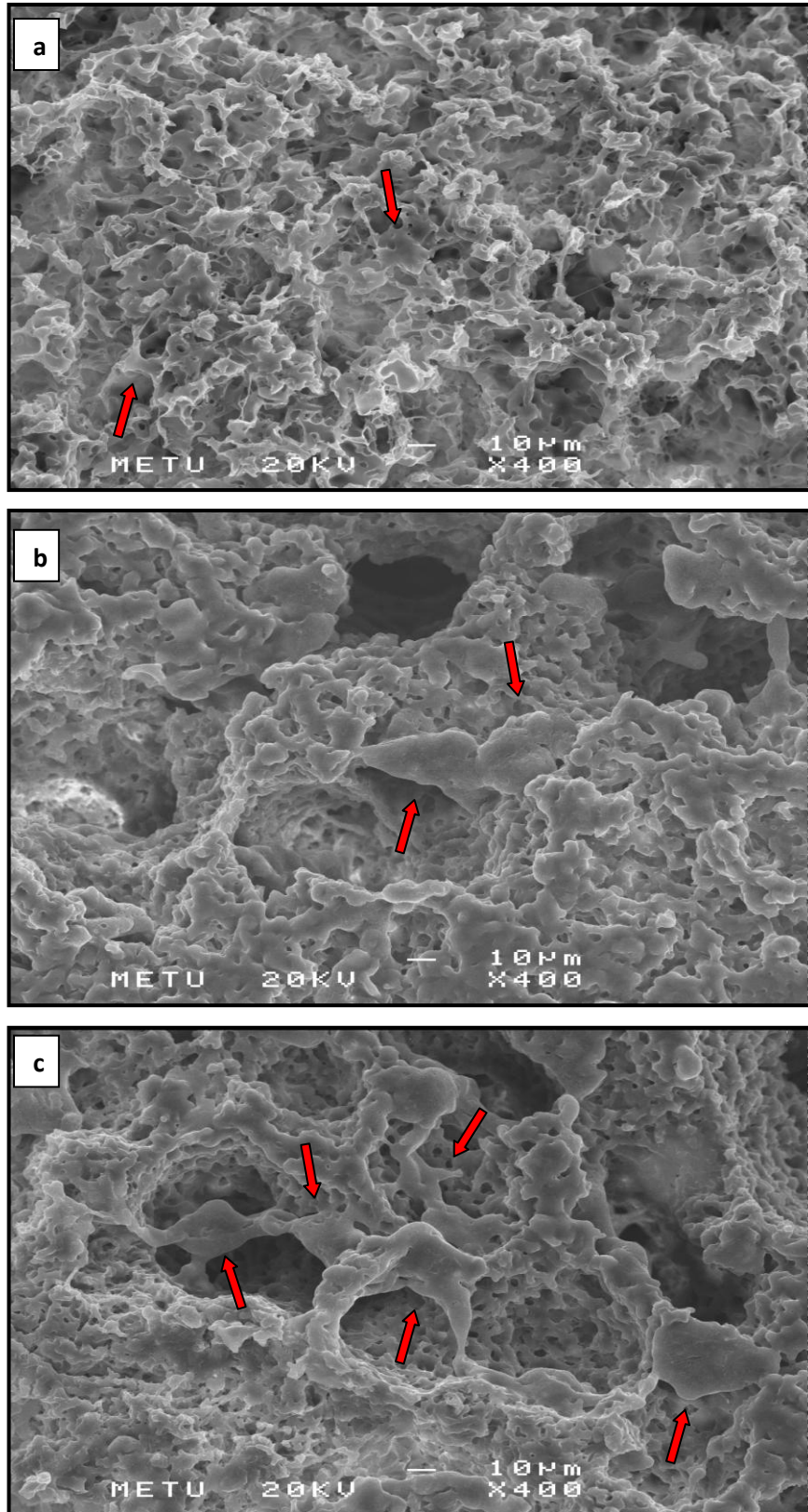


Şekil 4.35. Kornea epitel hücrelerini içeren PLGA (75:25) doku iskelesi formülasyonlarına ait optik mikroskop fotoğrafları,

a) PLGA75-B, b) PLGA75-B-K, c) PLGA75-B-L, d) PLGA75-NS, e) PLGA75-NS-K, f) PLGA75-NS-L.

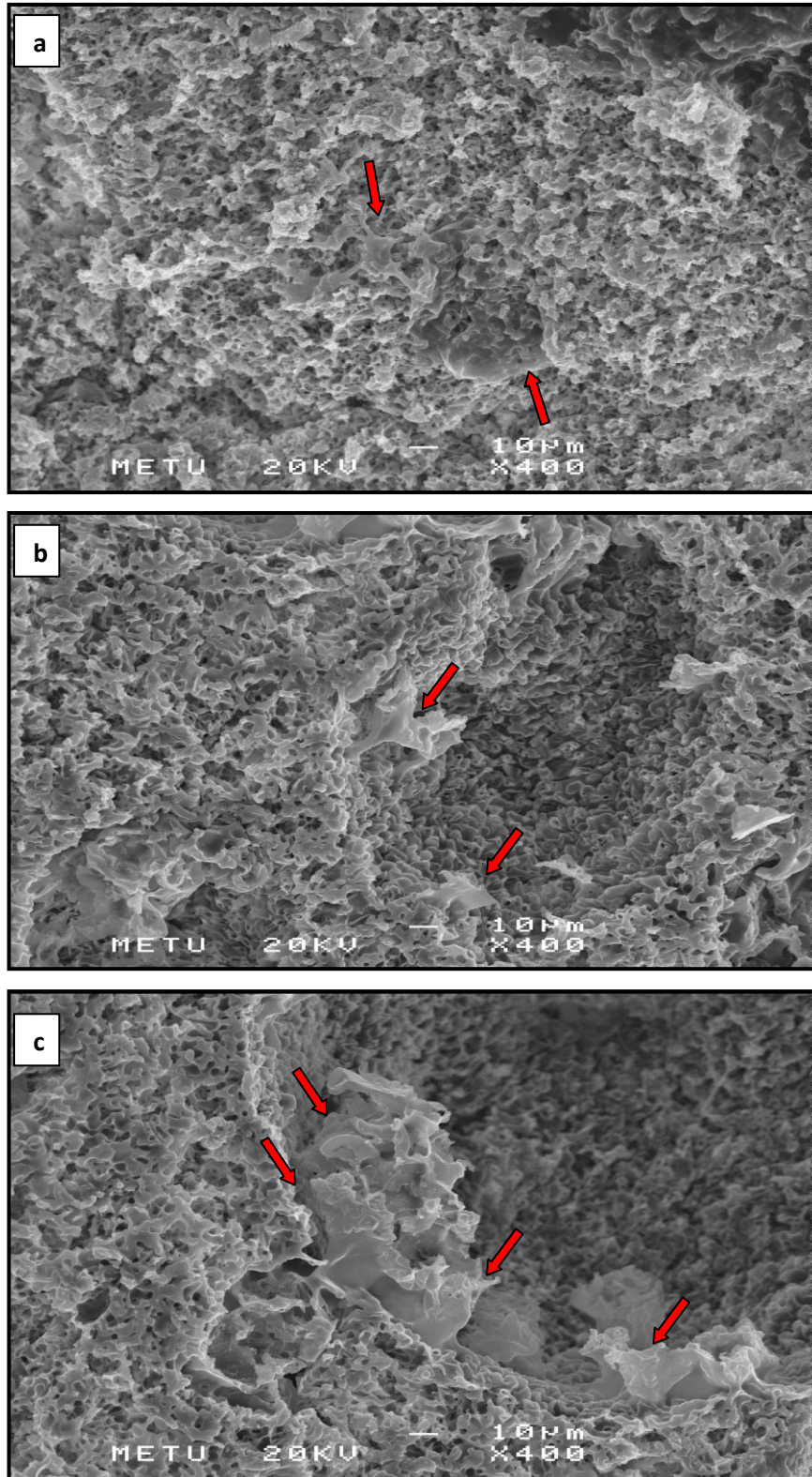
4.5.3. Hücre Morfolojisinin İncelenmesi

PLGA (50:50) ve PLGA (75:25) doku iskelesi formülasyonlarına ekilen hücrelerin morfolojisinin gözlemlenebilmesi için doku iskelelerinin hücre ekiminden 3 gün sonra SEM fotoğrafları çekilmiş ve bu fotoğraflar Şekil 4.36, 4.37, 4.38 ve 4.39’ da verilmiştir. Fotoğraflarda doku iskeleleri üzerine lokalize olmuş hücreler ok işareti ile gösterilmiştir.



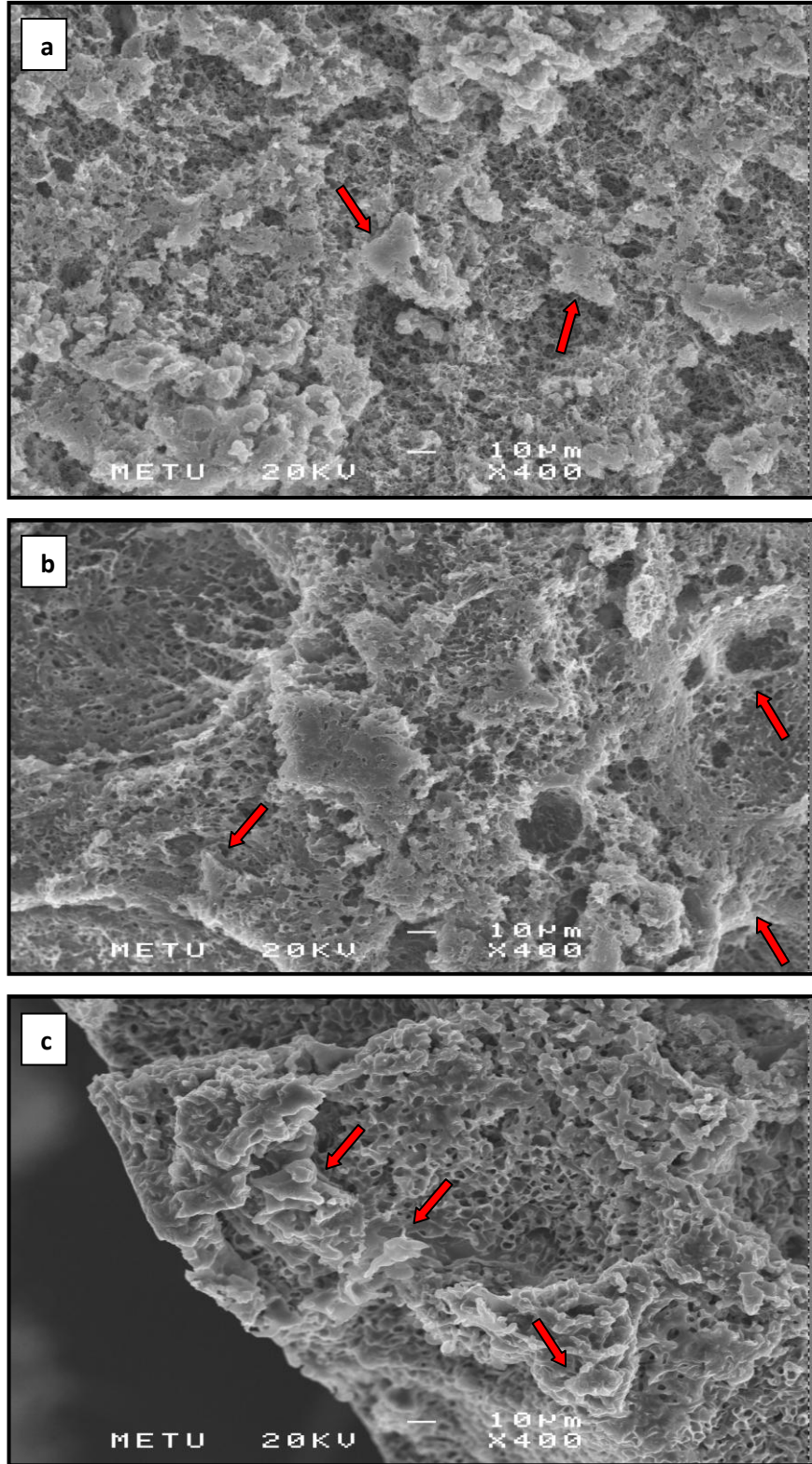
Şekil 4.36. Etkin madde içermeyen PLGA (50:50) doku iskelesi formülasyonlarına hücre adezyonu,

a) PLGA50-B, b) PLGA50-B-K, c) PLGA50-B-L.



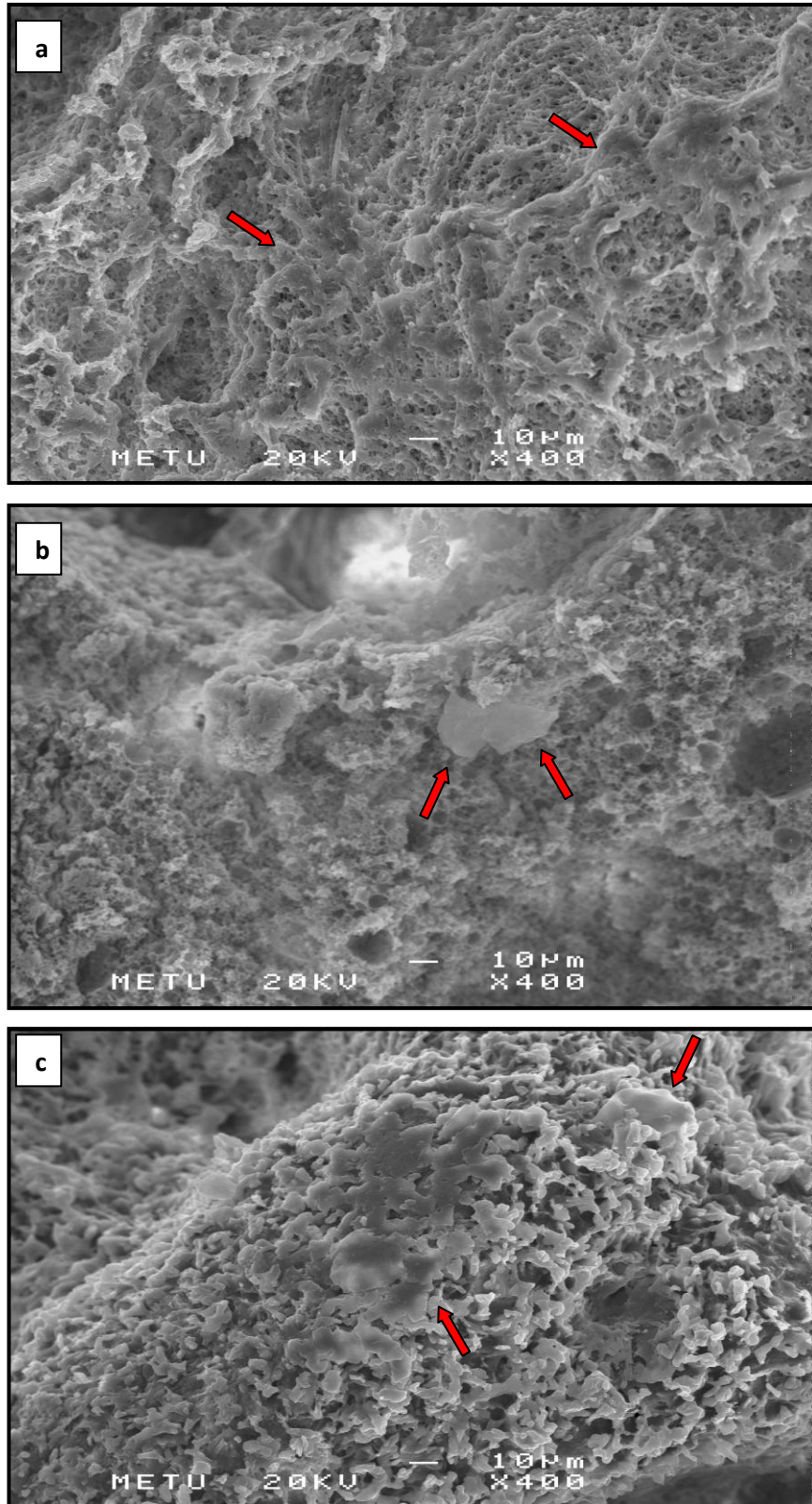
Şekil 4.37. NS içeren PLGA (50:50) doku iskelesi formülasyonlarına hücre adezyonu,

a) PLGA50-NS, b) PLGA50-NS-K, c) PLGA50-NS-L.



Şekil 4.38. Etkin madde içermeyen PLGA (75:25) doku iskelesi formülasyonlarına hücre adezyonu,

a) PLGA75-B, b) PLGA75-B-K, c) PLGA75-B-L.



Şekil 4.39. NS içeren PLGA (75:25) doku iskelesi formülasyonlarına hücre adezyonu,

a) PLGA75-NS, b) PLGA75-NS-K, c) PLGA75-NS-L.

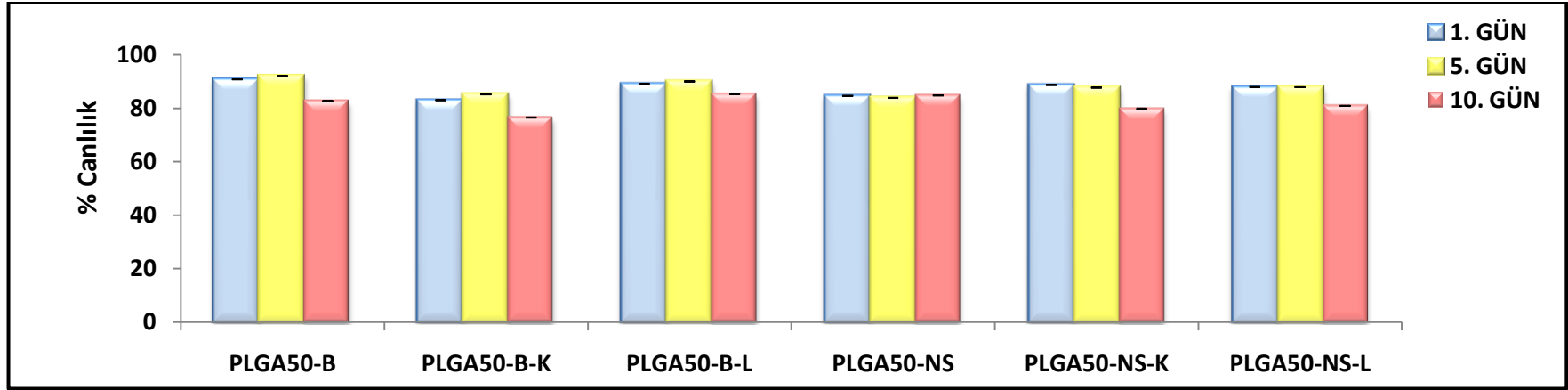
4.5.4. İn Vitro Biyouyumluluk Testleri

4.5.4.1. Sitotoksisite Testi

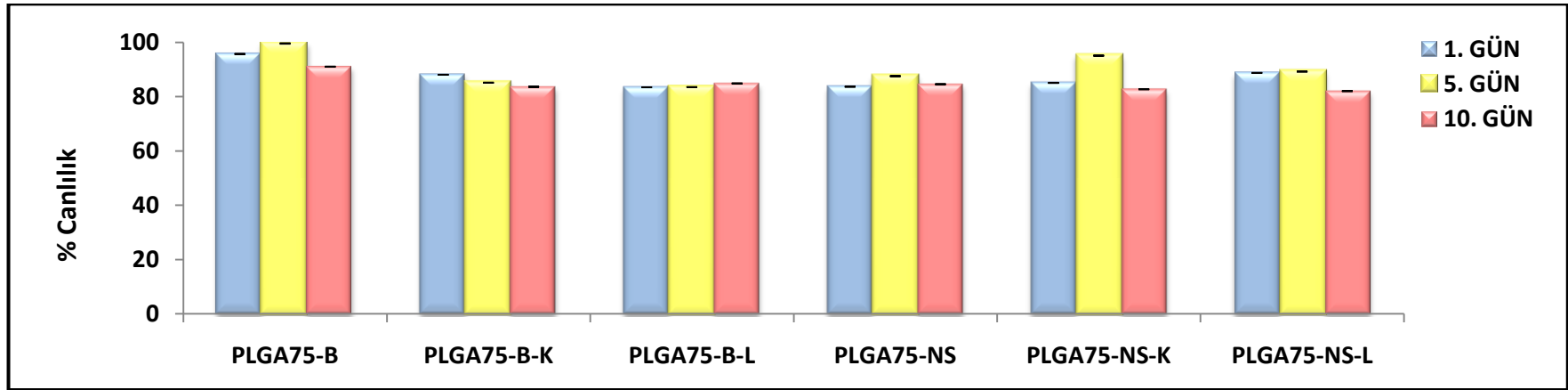
Kornea epitel hücreleriyle inkübasyonun ardından doku iskelesi formülasyonlarının sitotoksik etkilerinin değerlendirilmesi Bölüm 3.2.6.5.1’ de açıklandığı gibi MTT yöntemi kullanılarak gerçekleştirilmiştir. Hücrelerin boş ve NS içeren, kolajen veya poli-l-lizin kaplı veya kaplama işlemi yapılmamış doku iskeleleri ile 1, 5 ve 10 gün süreyle inkübasyon sonrası hayatta kalma yüzdeleri sırasıyla Tablo 4.11, Şekil 4.40 ve Şekil 4.41’ de gösterilmiştir. Buna göre tüm doku iskelesi formülasyonlarının kornea epitel hücreleri üzerinde sitotoksik etkisinin olmadığı tespit edilmiştir.

Tablo 4.11. Kornea epitel hücrelerinin doku iskelesi formülasyonları ile 1, 5 ve 10 gün inkübasyonu sonrasında hayatta kalma yüzdeleri (n = 3).

Formülasyon	% Canlılık		
	1. Gün	5. Gün	10. Gün
PLGA50-B	90.7813 ± 0.0064	92.0180 ± 0.0069	82.6869 ± 0.0629
PLGA50-B-K	83.0242 ± 0.0106	85.1602 ± 0.0417	76.5037 ± 0.0757
PLGA50-B-L	89.1512 ± 0.0339	89.9944 ± 0.0389	85.3288 ± 0.0594
PLGA75-B	95.6717 ± 0.0311	99.5503 ± 0.1011	91.0062 ± 0.0304
PLGA75-B-K	88.0270 ± 0.0113	85.1040 ± 0.0481	83.5863 ± 0.0573
PLGA75-B-L	83.4177 ± 0.0085	83.4739 ± 0.0488	84.8229 ± 0.0530
PLGA50-NS	84.5981 ± 0.0474	83.8673 ± 0.0552	84.7667 ± 0.0735
PLGA50-NS-K	88.7015 ± 0.0042	87.6897 ± 0.0325	79.7639 ± 0.1506
PLGA50-NS-L	87.9146 ± 0.0042	87.8583 ± 0.0177	80.8881 ± 0.0460
PLGA75-NS	83.6425 ± 0.0750	87.5211 ± 0.0757	84.5419 ± 0.0127
PLGA75-NS-K	85.0478 ± 0.0488	95.0534 ± 0.0431	82.6869 ± 0.0431
PLGA75-NS-L	88.7015 ± 0.0325	89.2074 ± 0.0177	82.0124 ± 0.0276



Şekil 4.40. Kornea epitel hücrelerinin PLGA (50:50) doku iskeleleri ile inkübasyonu sonrasında hayatta kalma yüzdeleri (n = 3).

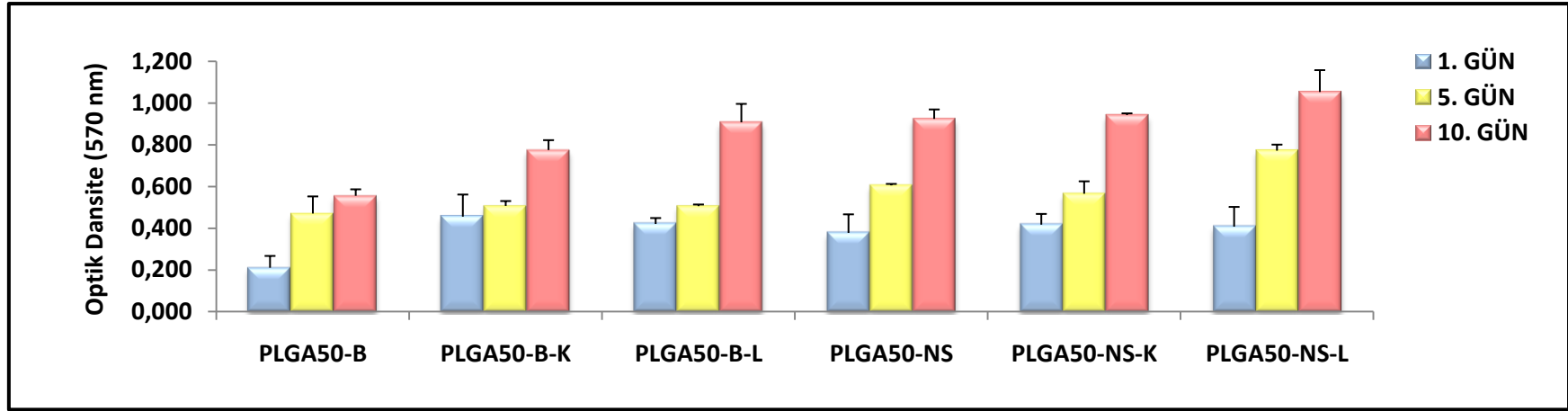


Şekil 4.41. Kornea epitel hücrelerinin PLGA (75:25) doku iskeleleri ile inkübasyonu sonrasında hayatta kalma yüzdeleri (n = 3).

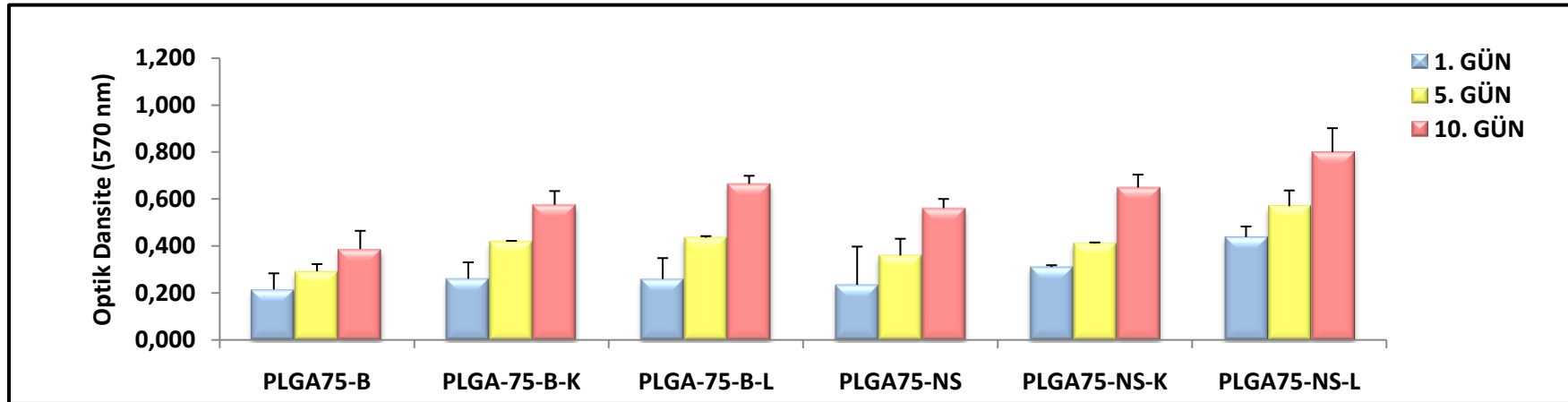
4.5.4.2. Proliferasyon Testi

Kornea epitel hücreleriyle inkübasyonun ardından doku iskelesi formülasyonlarının hücrelerin proliferasyonu üzerine etkilerinin değerlendirilmesi Bölüm 3.2.6.5.2' de açıklandığı gibi MTT yöntemi kullanılarak gerçekleştirilmiştir. Boş ve NS içeren, kolajen veya poli-l-lizin kaplı veya kaplama işlemi yapılmamış doku iskelelerinin 1, 5 ve 10 gün süreyle kornea epitelyum hücreleri ile inkübasyonu sonrasında elde edilen optik dansite sonuçları Şekil 4.42 ve Şekil 4.43' de verilmiştir.

NS içeren ve içermeyen tüm doku iskelesi formülasyonları kullanılarak yapılan proliferasyon çalışmalarında inkübasyon süresi arttıkça doku iskeleleri üzerine tutunan hücre yoğunluğunun arttığı tespit edilmiştir ($p < 0.05$). PLGA (50:50) polimeri kullanılarak hazırlanan doku iskelelerinde hücre tutunmasının PLGA (75:25) polimeri kullanılarak hazırlanan doku iskelelerine göre daha fazla olduğu belirlenmiştir ($p < 0.05$).



Şekil 4.42. Kornea epitel hücrelerinin PLGA (50:50) doku iskeleleri ile inkübasyonu sonrasında proliferasyon sonuçları (n = 3).



Şekil 4.43. Kornea epitel hücrelerinin PLGA (75:25) doku iskeleleri ile inkübasyonu sonrasında proliferasyon sonuçları (n = 3).

5. TARTIŞMA

Travma veya çeşitli hastalıklar nedeniyle meydana gelen organ yetmezlikleri ve kayıpları insan ölümlerinin başlıca nedenleri arasındadır. Bu ciddi problemin aşılmasında ilk olarak transplant cerrahisi (organ nakli) düşünülmekteyse de donör sayısındaki yetersizlik, doku uyumsuzluğu ve immün cevabın baskılanmasını takiben meydana gelebilen bakteriyel infeksiyonlar, kanser oluşumu ve virüs infeksiyonları gibi istenmeyen etkiler bu uygulamayı sınırlamaktadır. ABD “Organ Procurement and Transplantation Network” verilerine göre 2010 Mart ayı itibariyle bu ülkede organ bağışı bekleyen 106550 kişi olduğu ve 2009 yılında sadece 14631 donör bulunabildiği bildirilmiştir (273). Türkiye’de 2007 yılında 44000 kişinin organ nakli için sırada beklediği, her yıl ortalama bu listeye 8000 kişinin eklendiği ve 2006 yılında 7000 kişinin organ nakli beklerken hayatını kaybettiği bildirilmektedir (274). Bu nedenle, son yıllarda organ yetmezliklerinin tedavisinde rekonstrüktif cerrahi ve doku rejenerasyonu tüm dünyada büyük önem kazanmıştır. Son yıllarda bu konuda oldukça yoğun bir şekilde bilimsel araştırmalar yapılmış ve tüm dünyada 500 milyar USD’ lık bir hacme sahip ve büyük bir ivme ile her yıl büyüyen (yılda ortalama % 20) bir doku/hücre tedavisi/rejeneratif tedavi pazarı oluşmuştur. Doku rejenerasyonu tedavisinde temel olarak doku mühendisliği yaklaşımlarından yararlanılmaktadır. Doku mühendisliğinde genel olarak biyopolimer, hücre ve biyosinyal bileşenleri (yapışma ve büyüme faktörleri) tek başlarına veya birlikte kullanılarak hasarlı dokunun tamiri gerçekleştirilmektedir (275).

Vücut dokuları hücre ve hücreyi çevreleyen matriks materyalinden (ekstrasellüler matriks) meydana gelmiştir. Matriks materyalinin başlıca görevi hücrelerin yaşaması için oksijen ve besin sağlanmasının yanında proliferasyon ve farklılaşmaları için uygun ortamı oluşturmaktır (276). Doku mühendisliği ile organ ve dokuların tamirinde sağlıklı veya genetiği değiştirilmiş hücreler yanında bu ortamın sağlanması için bir matriks materyali (destek materyal = doku iskelesi) gerekmektedir. Destek materyali olarak, mekanik dayanıklılıkları ve fizikokimyasal özelliklerinin kolayca kontrol altında tutulabilmesi nedeniyle sıklıkla sentetik veya doğal polimerler kullanılmaktadır. Polimerik doku iskeleleri tek başına veya biyomimetik özelliklerini artırmak amacıyla kolajen ve amniyotik membran gibi endojen matriks maddeleri ile kombine halde hazırlanarak (“smart scaffolds”,

“biomimetic scaffolds”) kullanılabilirler. Doku iskeleleri, taşıdıkları hücrelerin korunmasını, lokalize olmasını, lokalize olduğu yerde proliferasyonunu ve farklılaşmasını sağladıklarından doku rejenerasyonu tedavisinin etkinliği ve başarısı için hayati önem taşımaktadırlar (277).

Korneal lezyonlar, korneada meydana gelen hastalıklar veya termal/kimyasal yanık gibi etmenler sonucunda ortaya çıkan hasarlardır. Korneanın yüzeyi sürekli olarak bazal limbal epitelde bulunan kök hücreler tarafından üretilen yeni epitel hücreleri ile yenilendiğinden yüzeysel epitelde meydana gelen hafif bir hasar klasik tedavi desteği ile iyileşebilir. Ancak korneada meydana gelen hasar, “Stevens-Johnson” sendromu, toksik epidermal nekroz ve derin termal/kimyasal yanık olgusu olan hastalarda olduğu gibi geniş bir alanı etkilemişse, korneanın fonksiyonunu tekrar kazanabilmesi için kornea transplantasyonu gereklidir. Dünyadaki körlük vakalarının % 8-25' i korneal hasarlar sonucunda meydana gelmekte ve korneal körlük, dünyada 10 milyon hastayı etkilemektedir (278). Yukarıda da belirtildiği üzere, transplantasyon işleminde donör bulma ile ilgili problemler ve işlemin dezavantajları nedeniyle ciddi kısıtlamalar olması, kornea hasarlarının da doku rejenerasyonu ile tedavi edilmesi gerekliliğini ortaya çıkarmaktadır (279).

Korneada meydana gelen ciddi hasarlar şiddetli inflamasyona neden olmaktadır. Hasar gerçekleşikten sonra, yabancı maddeleri ve hasarlı dokuyu uzaklaştırmak için kısa sürede bir immün cevap meydana gelmektedir. Daha sonra inflamasyon hücrelerinin aktivasyonu sonucu salgılanan prostaglandinler, tromboksanlar, lökotrienler, vazoaaktif aminler ve sitokinler vb. gibi kimyasal mediyatörler tarafından bu cevabın şiddeti artırılmaktadır (17). İmmün cevap sonucu ortaya çıkan prostaglandinlerin etkisiyle intraoküler basınç yükselmekte, iris düz kaslarının kasılmasıyla miyozis oluşmakta ve vasküler permeabilite artmaktadır. Bunların sonucunda, aköz hümörde protein konsantrasyonunun artması böylelikle damarsız olan korneada damarlanma ve takiben skar oluşumu, görmede bulanıklık ve tedavinin yapılmadığı durumlarda körlük ortaya çıkmaktadır. Korneal inflamasyonun tedavisinde antiinflamatuvar ilaçlar kullanılmaktadır. Bu ilaçların topikal kullanımı, yüksek lokal ilaç konsantrasyonu sağlamaları ve sistemik yan etkilere neden olmamaları nedeniyle en çok tercih edilen yoldur. Bu durumda uygulanmak üzere antiinflamatuvar ilaçlar arasında düşünülen ilk grup steroidler olsa da steroidlerin

intraoküler basıncı daha da artırmaları, kataraktı ilerletmeleri ve stromal erimeye bağlı olarak korneada delinmelere neden olmaları gibi yan etkileri tedavi edici özelliklerinin önüne geçmektedir (18). Aralarında naproksen sodyum gibi aril propiyonik asit türevlerinin de olduğu non-steroidal antiinflamatuvar ilaçların topikal olarak korneal inflamasyonun tedavisinde etkin ve güvenilir oldukları, hatta bu grup ilaçların kornea epitel hücrelerine bakteri adezyonunu engelledikleri bilinmektedir (19).

Doku mühendisliği kavramının 1990' lı yıllarda ortaya çıkmasına rağmen bu konuda elde edilen sonuçların ümit verici olması, mükemmel doku uyumu ve terapötik etkinlik sağlanması, pek çok bilim dalının birarada çalışmasına ve inovatif yaklaşımların geliştirilmesine neden olmaktadır. Özellikle son yıllarda klasik doku mühendisliği ile ilaç taşıyıcı sistemlerin bir arada kullanılması yönünde görüşler vardır (276,277). Ancak literatürde bu konudaki çalışma sayısı oldukça azdır. Yapılan literatür taramalarında oftalmik alanda kullanılmak üzere küçük molekülü ilaç içeren bir destek materyaline rastlanamamıştır. Yukarıda da belirtildiği üzere ciddi kornea hasarlarında şiddetli inflamasyon riskinin olduğu bilinmektedir (17). Bu tez kapsamında kornea hasarlarının rejenerasyonunda yeni bir yaklaşım getirmek ve klinikte karşılaşılan problemlere çözüm bulmak amacıyla tıp (oftalmoloji, histoloji, genetik), eczacılık ve kimya bilim dallarının görüşleri/önerileri bir araya getirilerek çok fonksiyonlu bir doku iskelesi formülasyonu geliştirilmesi amaçlanmıştır. Hazırlanan akıllı doku iskelesi formülasyonunun; a) içerdiği antiinflamatuvar ilaç (NS) nedeniyle ortamdaki inflamasyonu gidermesi, b) içerdiği epitel hücreleri nedeniyle hasar görmüş bölgeye sağlıklı hücrelerin aktarılması ile kornea tamirinin gerçekleştirilmesi, c) içerdiği biyogeçimli ve biyoparçalanır polimer (PLGA) ve kaplamada kullanılan kolajen veya poli-l-lizin ile mekanik dayanıklılığın ve biyomimetik özelliğin bir arada sağlanması öngörülmektedir.

Yukarıda belirtilen bilgilerin ışığı altında bu çalışmanın amacı, ciddi hasar görmüş kornea dokusunun rejenerasyonunda ümit vaad edici sistemler olan polimerik doku iskelelerinin tasarlanarak antiinflamatuvar ilaç yüklü olarak hazırlanması ve karakterizasyonlarının yapılmasıdır. Böylece hasarlı bölgede hücre aktarımı ile yeni doku oluşumu sağlanırken, kullanılan antiinflamatuvar etkin madde yardımıyla da meydana gelen inflamasyonun tedavisinin gerçekleştirilmesi

öngörülmektedir. Bu amaçla öncelikle PLGA polimeri kullanılarak, antiinflamatuvar bir ilaç olan naproksen sodyum yüklü doku iskeleleri hazırlanmış ve bu doku iskelelerine biyomimetik özellik kazandırılması için kolajen veya poli-l-lizin ile kaplanmıştır. Formülasyon çalışmaları tamamlandıktan sonra hazırlanan doku iskeleleri üzerinde in vitro karakterizasyon çalışmaları yapılmış ve karakterizasyon çalışmalarının ardından formülasyonların salım özellikleri değerlendirilmiştir. En son olarak, hazırlanan doku iskelelerinin hücre kültür çalışmaları yapılarak formülasyonların kornea epitel hücreleri üzerindeki sitotoksik etkileri ve proliferasyon özellikleri incelenmiştir.

Bu bölümde tez çalışmaları boyunca sürdürülen deneysel çalışmaların ve bu çalışmalardan elde edilen bulguların değerlendirilmesi yapılacak ve sonuçlar literatür verileriyle karşılaştırılarak tartışılacaktır. Tartışılan konunun daha iyi anlaşılabilmesi için bulgular kısmında verilen sıralama izlenerek, öncelikle etkin madde üzerinde yapılan çalışmalar ve analitik yöntem validasyonu ile ilgili bulgular incelenecektir. Daha sonra doku iskelesi formülasyonuna etki eden parametreler, doku iskelesi hazırlanmasında kullanılan işlemler değerlendirilecektir. Tartışmanın son kısmında hazırlanan doku iskelelerinin çap ve kalınlıkları, morfolojik özellikleri, FT-IR spektrumları, porozite ölçümleri, şişme ve su absorplama özellikleri, in vitro degradasyon, ilaç yükleme etkinliği, in vitro salım deneyleri ve hücre kültür çalışmalarına ait bulgular irdelenecektir.

5.1. NS' un Fizikokimyasal Özellikleri ile İlgili Çalışmalar

Formülasyon çalışmalarından önce NS' un fizikokimyasal özellikleri incelenmiş ve sonuçlar literatür verileri ile karşılaştırılmıştır.

NS' un UV spektrumları incelendiğinde distile su ve yapay gözyaşı (SLF) içinde maksimum absorpsiyon değerleri 230 nm de elde edilmiş (Şekil 4.1) ve elde edilen bulgunun literatür ile uyum içinde olduğu saptanmıştır (280).

NS' un FT-IR spektrumu incelendiğinde (Şekil 4.2) yapıya özgü absorpsiyon bandları görülmüş ve elde edilen spektrumun literatür ile uyum içinde olduğu belirlenmiştir (215).

NS' un erime derecesi literatürde 252-256 °C arasında verilmiş olup (271), bu çalışmada da 254 °C olarak saptanmıştır. Erime derecesiyle ilgili aynı bulgu DSC termogramıyla da desteklenmiştir (Şekil 4.3) (281).

Yukarıda belirtildiği şekilde etkin maddeye ait fizikokimyasal özellikler saptandıktan ve literatür ile uyumlu olduğu tespit edildikten sonra miktar tayini çalışmaları gerçekleştirilmiş ve analitik yöntem validasyonu yapılmıştır.

5.2. Analitik Yöntem Validasyonu

Miktar tayini ve analitik yöntem validasyonu çalışmaları HPLC kullanılarak gerçekleştirilmiştir. NS' ait kromatogram Şekil 4.4' de verilmiştir. Kromatogramdan da görüldüğü gibi NS' a ait pik düzgün bir şekilde elde edilmiş olup, alıkonma zamanı 10.89 dakika olarak bulunmuştur.

Doğrusallık çalışmalarında çalışma aralığı olarak $0.1-10 \mu\text{g.mL}^{-1}$ arası konsantrasyonlar seçilmiştir. Deney bulguları incelendiğinde, belirtilen konsantrasyon aralığında, konsantrasyon ile elde edilen pik alanı arasında doğrusal ilişki saptanmış olup, regresyon analizi bulguları Tablo 4.1 ve Şekil 4.5' de verilmiştir. Deney 6 kez tekrar edilerek her seri için elde edilen kalibrasyon doğrularına ait eğimler karşılaştırılmış ve VK değeri % 0.1923 olarak bulunmuştur. Shabir ve arkadaşlarının FDA, USP ve ICH' in validasyon kılavuzlarında yer alan gerekliliklerin benzerlik ve farklılıklarını incelendiği çalışmada (241), VK' nın % 2' den daha küçük olması gerektiği bildirilmiştir. Buna göre elde edilen VK bulguları literatürle uyumludur. Kalibrasyon doğrusuna ait korelasyon katsayısı ise 0.99995 olarak bulunmuştur.

Gün içi ve günler arası doğruluk % relatif hata ile belirtilmiş olup, gün içi için bu değerler % -1.9625 ile % 1.0256, günler arası için % -1.9892 ile % 0.8101 arasında değişmektedir (Tablo 4.2.). Validasyon çalışmalarında % relatif hata değerlerinin % 2' den daha küçük olması gerektiği bildirildiğinden (241), hesaplanan % relatif hata değerlerinin % 2' nin altında olması ile kullanılan analitik yöntemin deney içi ve deneyler arası doğruluğu gösterilmiştir.

Kesinlik çalışmaları 3 farklı konsantrasyon (düşük, orta, yüksek; $0.1, 1, 10 \mu\text{g.mL}^{-1}$) üzerinden gerçekleştirilmiş olup, tekrarlanabilirlik ve tekrar elde edilebilirlik olarak ayrı ayrı değerlendirilmiştir. Tekrarlanabilirlik VK ile belirtilmiş olup, bu değerler % 0.1842 ile % 0.9482 arasında değişmektedir (Tablo 4.3). Gün içi ve günler arası tekrar elde edilebilirlik VK ile belirtilmiş olup, gün içi için bu değerler % 0.4738 ile % 1.1710, günler arası için % 0.7523 ile % 1.7769 arasında değişmektedir (Tablo 4.4.). Hesaplanan VK değerlerinin % 2' nin altında olması ile

analitik yöntemin tekrarlanabilirliği ve deney içi ve deneyler arası tekrar elde edilebilirliği gösterilmiştir (241).

Yöntem duyarlılığı için kabul edilebilir doğruluk ve kesinlikte ölçülebilen konsantrasyon $0.0343 \mu\text{g.mL}^{-1}$ olup, saptama sınırı $0.0103 \mu\text{g.mL}^{-1}$ dir. Bu veriler seçilen analitik yöntemin çalışmamızın amacına uygun duyarlılığa sahip olduğunu göstermiştir.

Yöntemin özgünlüğü için yapılan çalışmalarda doku iskelesi formülasyonlarında kullanılan yardımcı maddelerin NS ile aynı şartlarda pik verip vermedikleri incelenmiştir. Kullanılan yardımcı maddelere ait pikler ve ilaç yükleme ve salım deneyleri sırasında alınan örnekler üzerinde yapılan değerlendirmelerde NS' a ait alıkonma süresinde herhangi bir pik görülmemiştir (Şekil 4.6, 4.7, 4.8, 4.9, 4.10, 4.11, 4.12).

Stabilite bulguları değerlendirildiğinde 2 farklı konsantrasyonda hazırlanan NS çözeltilerinin hazırlanır hazırlanmaz ve hazırlandıktan 6 ve 24 saat sonra HPLC ile analizi sonucunda elde edilen konsantrasyonlar karşılaştırılmış, VK değerleri % 2' nin altında ve % geri kazanım değerleri % 98 - 102 arasında bulunarak NS' un analiz sırasında dayanıklı kaldığı gösterilmiştir (Tablo 4.5) (241).

Yöntemin doğrusalılık, doğruluk, kesinlik, duyarlılık, özgünlük ve stabilite bulguları tümüyle değerlendirildiğinde, bu yöntemin analitik amaçla validasyonunun yapıldığı ve geçerli bir yöntem olduğu görülmektedir.

5.3. Doku İskelelerinin Formülasyon Çalışmaları

Bu bölümde formülasyon çalışmaları, doku iskelelerinin yapısını oluşturan polimer tipinin, üretim yönteminin, yardımcı maddelerin ve etkin maddenin seçimi açısından tartışılmıştır. Çalışmada öncelikle yapılan geniş kapsamlı ön formülasyon çalışmaları ile sonraki aşamalarda hazırlanacak doku iskelesi preparatlarının formülasyon parametreleri olarak üretim yöntemi, polimer tipi, polimer konsantrasyonu, etkin madde ve yardımcı maddelerin tespiti, etkin madde konsantrasyonunun seçimi için gereken değerlendirmeler yapılmıştır.

Ciddi hasar görmüş korneada meydana gelen inflamasyonun tedavisi için NS' un % 0.2 (a/h) konsantrasyonda, topikal damla formunda, günde 3-4 kez ve inflamasyonun şiddetine göre bir haftadan birkaç aya kadar kullanılmasıyla klinikte

başarılı sonuçlar alındığı bildirilmiştir (19,234). Bu bilgilerin ışığında antiinflamatuvar etkin madde olarak naproksen sodyum seçilmiştir.

PLGA polimerinin FDA onaylı, biyoparçalanır, mekanik olarak dayanıklı olması, in vivo parçalanma süresinin kopolimer oranlarıyla kontrol edilebilmesi (63-66) ve oküler alanda pek çok başarılı uygulamalarının olması (51,243-245) nedeniyle PLGA, doku iskelelerinin hazırlanmasında matriks polimeri olarak seçilmiştir. Buna ilaveten, PLGA kopolimerinin içerdiği monomerlerden PLA oranındaki artış, kopolimerin hidrofobik, düşük su absorplama ve şişme özelliğine sahip olmasına ve biyolojik olarak parçalanma süresinin uzun olmasına yol açmaktadır. PGA ise kopolimerin yapısında yer alan hidrofilik monomerdur ve PGA oranında yapılacak artış ile çabuk parçalanan, su absorplama oranı ve suda çözünürlüğü yüksek olan kopolimerler elde edilmektedir (63,64). Doku iskelesi formülasyonlarının hazırlanmasında polimer olarak PLGA'ın etkin madde salım ve parçalanma hızları göreceli olarak karşılaştırıldığında, parçalanması daha hızlı olan PLGA (50:50) ve parçalanması daha yavaş olan PLGA (75:25) kopolimer oranları seçilmiştir (254,282). Böylelikle PLGA kopolimer oranının formülasyon karakteristikleri ve hücre ile etkileşimi üzerine etkilerinin karşılaştırılması planlanmıştır.

Literatürde belirtilen doku iskelesi hazırlama yöntemleri incelendiğinde, NS'ın sudaki çözünürlüğünün yüksek olması ve araştırma laboratuvarımızın teknik altyapısı göz önünde bulundurularak emülsiyon dondurarak kurutma yöntemi seçilmiştir (167,168).

Doku iskelesine yüklenen hücrelerin etkin bir biçimde tedaviyi sağlayabilmeleri, hasarlı bölgede meydana gelmiş olan hücresel eksikliği doldurarak hücre replasmanını ve periferdeki hücreler ile etkileşerek bütün bir doku oluşumunu sağlamalarına bağlıdır. Bu etkinliğin sağlanmasında hücrelerin bir destek materyali üzerinde tutunarak birbirleri ile etkileşmeleri, daha sonra da perifer hücreler ile etkileşerek dokunun oluşumu, tedavinin esasını oluşturmaktadır (283,284). Hücrelerin birbirleri ile etkileşmesi için kullanılan ortam doğal ortama ne kadar çok benzer ise başarı oranı o kadar yüksek olur. Dolayısıyla yapılan literatür taramalarında, kolajen ve poli-L-lizinin hücre adezyonunu artırdığına dair bilgilerin bulunması sonucunda doku iskelesi formülasyonlarında bu maddelerin kullanılmasına karar verilmiştir (89,90,129,251,285,286). Mekanik olarak dayanıklı

PLGA doku iskeleleri, hücrelerin doğal ortamının taklit edilmesi amacıyla, doğal bir matriks olan kolajen ve hücre adezyonu üzerine olumlu etkisi olduğu bilinen poli-lizin ile kaplanmıştır.

5.4. Doku İskelelerinin İn Vitro Karakterizasyonu

5.4.1. Çap – Kalınlık Tayini

Doku iskelesi formülasyonlarının hazırlanması esnasında düzgün ve hasarsız bir şekilde kalıptan çıkarılabilmesi için belirli bir kalınlığın sağlanması gereklidir. Bunun için 1 cm uzunluğunda silindirik doku iskeleleri hazırlanıp daha sonra kesilmiştir. Hazırlanan doku iskelelerinin kesilmeden önce ve kesildikten sonra ölçülen çap ve kalınlıkları değerlendirildiğinde, kesim işleminden önce tüm formülasyonlarda çap değerleri 4.650 ile 4.740 mm, kalınlık değerleri 10.160 ile 10.170 mm arasında bulunmuştur. Kesim işleminden sonra tüm formülasyonlarda çap değerleri 4.650 ile 4.740 mm, kalınlık değerleri 1.940 ile 1.990 arasında bulunmuştur.

Oküler alanda kullanılmak üzere hazırlanan doku iskeleleri üzerine yapılan literatür taramasında, değişik kalınlık ve çap değerlerine sahip formülasyonlara rastlanmaktadır. Formülasyonların çap ve kalınlık değerleri korneada yara iyileşmesinin sağlanması açısından önemlidir (287,288). Torbet ve arkadaşları (50) yaptıkları bir çalışmada, kornea hasarlarında kullanılmak üzere tasarladıkları kolajen doku iskelelerini 0.5 mm çapında ve 1.3 mm kalınlığında olacak şekilde hazırlamışlardır. Chen ve arkadaşları (289), kornea hasarlarında kullanılmak üzere kitosan, kolajen ve sodyum hiyaluronattan oluşan doku iskelesi formülasyonları geliştirmişler ve bu formülasyonları 8 mm çapında, 2 mm kalınlığında olacak şekilde hazırlamışlardır. Ayrıca araştırmacılar, hazırladıkları doku iskelelerini tavşan gözünde 8 mm çapında olacak şekilde açtıkları korneal boşluğa implante etmişler ve 5 ay süreyle doku iskelelerinin yerleştirildikleri bölgede herhangi bir yan etkiye neden olmadan kalabildiklerini bildirmişlerdir. Bu tez çalışmasının başlangıcında, hazırlanacak doku iskelelerinin boyutları, literatür bilgileri, bu projede araştırmacı olarak görev alan oftalmoloji ve histoloji uzmanlarından alınan öneriler/klinik görüşler ve seçilen hazırlama yöntemi ile tekrarlanabilir sonuçların sağlandığı çap ve kalınlık değerleri göz önüne alınarak belirlenmiştir. Hazırlama işlemini takiben

yukarıda belirtilen çap ve kalınlık değerlerinin literatürle uyumlu olduğu tespit edilmiş ve oftalmoloji ve histoloji uzmanları preparatların bu tez çalışmasının devamında planlanan in vivo hayvan deneyleri için herhangi bir yan etkiye neden olmayacak ve doku oluşumunu sağlayabilecek uygun boyutlarda olduğunu bildirmişlerdir.

5.4.2. Morfolojik Özelliklerinin İncelenmesi

Doku iskelelerinin genel şekillerinin değerlendirilmesi, formülasyonların hazırlama ve kesim yöntemlerinin etkinlik ve tekrarlanabilirliğinin tespit edilmesinde büyük önem taşımaktadır. Çalışmamızda doku iskelelerinin genel yapıları dijital fotoğraf makinası ile değerlendirilmiştir.

Doku iskelelerinin yüzey ve iç/poröz yapı özellikleri, bu formülasyonlarda hücrelerin adezyon, beslenme, migrasyon ve çoğalmaları üzerinde çok büyük etkisi olan ve mekanik dayanıklılıklarını, in vivo parçalanmasını belirleyen önemli parametrelerdir. Buna ilaveten, etkin madde taşıyan doku iskelelerinde bu özellikler ilacın salım hızı ve kinetiğini de doğrudan etkilemektedir. Çalışmamızda doku iskelelerinin yüzey ve iç/poröz yapı özellikleri SEM ile değerlendirilmiştir.

Etkin madde içermeyen PLGA (50:50) ve PLGA (75:25) polimerleri ile hazırlanan doku iskelelerinin kesilmeden önce genel şekilleri incelendiğinde tam silindirik ve pürüzsüz yapı gösterdikleri görülmektedir. Yine aynı polimerlerle hazırlanan doku iskelelerinin NS yüklü olarak hazırlanmaları sonucunda da genel şekillerinde herhangi bir farklılığın olmadığı belirlenmiştir (Şekil 4.13). Bu durum gerek boş gerekse etkin madde içeren gruplarda formülasyon tasarımının ve hazırlama yönteminin istenen ve tekrarlanan özellikte sonuçlar verdiğini göstermektedir. Zira ön çalışmalar sırasında denenen bazı formülasyon parametreleri ve hazırlama yöntemleri ile tam silindirik yapı göstermeyen, tekrarlanabilir olmayan, hatta kalıptan çıkarılamayan preparatlarla da karşılaşmıştır.

Etkin madde içermeyen PLGA (50:50) ve PLGA (75:25) polimerleri ile hazırlanan doku iskelelerinin kesim sonrası genel şekilleri değerlendirildiğinde gereken incelikte ve tam silindirik bir yapı gösterdikleri ve NS yüklenmesinden sonra da bu yapının değişmediği tespit edilmiştir (Şekil 4.14). Bu durum etkin madde içeren ve içermeyen gruplarda formülasyonun kesim işlemine uygun mekanik dayanıklılık gösterdiği ve kesim yönteminin etkin ve tekrarlanabilir olduğunu

göstermektedir. Ön çalışmalar sırasında denenen bazı formülasyonlar kesim sırasında parçalanmış, denenen bazı kesim teknikleri (mikrotom, dondurarak kesme vb.) ile de kesim işlemi gerçekleştirilememiştir.

PLGA (50:50) ve PLGA (75:25) kullanılarak hazırlanan doku iskelesi formülasyonlarının SEM fotoğrafları incelendiğinde tüm formülasyonların poröz yapıya sahip olduğu görülmektedir. Literatürde de belirtildiği üzere bu durum, doku iskelelerinin sahip olduğu porların hücre yerleşimi için uygun bir ortam sağladığını ve doku onarımının sağlanabilmesi için gerekli olan besin ve karbondioksit alımını kolaylaştırabileceğini göstermektedir (290).

PLGA (50:50) polimeri ile hazırlanan ve etkin maddede içermeyen doku iskelelerinin poröz yapılarına ilaveten, yapıdaki porların birbirine bağlı şekilde (“inter-connected”) ve makropor yapısında olduğu görülmektedir (Şekil 4.15a). Literatürde doku iskelelerinin yapısındaki makroporların, hazırlanmaları esnasında kullanılan düşük dondurma sıcaklıkları ile daha fazla buz kristalinin oluşmasına bağlı olarak meydana geldiği bildirilmiştir (291). Aynı formülasyonun kolajen ve poli-l-lizin ile kaplanmasından sonra çekilen SEM fotoğraflarında, yapıdaki poröz özelliğin bir miktar azaldığı, daha yoğun bir yapının meydana geldiği ancak hala makropor yapısının varolduğu görülmektedir (Şekil 4.15b-c). Bu durum ileride bahsedilecek olan FT-IR sonuçlarına paralel bir biçimde kaplamanın etkin bir şekilde yapıldığını göstermektedir. Etkin madde (NS) içeren PLGA (50:50) doku iskelesi formülasyonlarında formülasyona eklenen etkin maddenin etkisi ile poröz yapının bir miktar azaldığı ve lifsi yapıların meydana geldiği görülmektedir (Şekil 4.15d). Bu duruma benzer olarak, Kim ve arkadaşları (192) yaptıkları çalışmada, kullandıkları hidrofilik askorbat-2-fosfatın hidrofobik PLGA doku iskelesindeki makroporları doldurmasıyla poröz yapının azalmasına neden olduğunu bildirmişlerdir. Kolajen ve poli-l-lizin ile kaplanmış, NS içeren PLGA (50:50) doku iskelelerinde de yine poröz yapının lifsi yapıya dönüştüğü ve boş doku iskelelerinde olduğu gibi kaplamanın etkin bir şekilde yapıldığı görülmektedir (Şekil 4.15e-f).

PLGA (75:25) polimeri ile hazırlanan doku iskelelerinde PLGA (50:50) doku iskelelerine göre poröz yapının azaldığı ve daha yoğun yapıların meydana geldiği görülmektedir (Şekil 4.16a-f). Thomson ve arkadaşları (292) yaptıkları bir çalışmada değişik kopolimer oranlarına sahip PLGA polimerlerini (PLA/PGA: 10:90, 25:75,

50:50, 75:25, 90:10) kullanarak retinal doku iskelesi formülasyonları geliştirmişler ve bu formülasyonların SEM fotoğraflarını çekerek ve porozite ölçümlerini yaparak por özelliklerini incelemişlerdir. Çalışmada, gerek porozite ölçümlerinde gerekse SEM fotoğraflarında PLGA kopolimerindeki PLA oranının artmasıyla poröz yapının azaldığı ve daha yoğun doku iskelesi formülasyonlarının olduğu bildirilmiştir. Tez çalışmamızda da etkin madde içermeyen PLGA (75:25) doku iskelesinin SEM fotoğrafı incelendiğinde (Şekil 4.16a) PLGA (50:50) doku iskelesine oranla daha az poröz yapıya sahip olduğu ancak yine de yapıdaki porların birbirine bağlı şekilde bulunduğu ve makropor yapısında olduğu görülmektedir. Aynı formülasyon kolajen ve poli-l-lizin ile kaplandığında poröz özelliğin bir miktar azaldığı ve yapının yoğunlaştığı görülmektedir (Şekil 4.16b-c). Etkin madde (NS) içeren PLGA (75:25) doku iskelesi formülasyonlarında ise PLGA (50:50) formülasyonlarına benzer şekilde formülasyona eklenen NS' un etkisi ile porların daha da azaldığı ve yapının daha yoğun hale geldiği görülmektedir (Şekil. 4.16d). Kolajen ve poli-l-lizin ile kaplanmış, NS içeren PLGA (75:25) doku iskelelerinde poröz özelliğin azaldığı, yapının yoğunlaştığı ve lifsi yapıların meydana geldiği görülmektedir (Şekil 4.16e-f).

Gerek PLGA (50:50) ile gerekse PLGA (75:25) ile hazırlanan doku iskelelerinde gözlenen yüzey ve iç/poroz yapı özellikleri farklılıklarının, formülasyonların su alımı, in vitro degradasyonu ve etkin madde salımı üzerine etkileri Bölüm 5.4.5, 5.4.6 ve 5.5' de tartışılacaktır.

5.4.3. FT-IR Spektrumlarının İncelenmesi

Hazırlanan doku iskelesi formülasyonlarının kolajen veya poli-l-lizin ile kaplama etkinliğinin değerlendirilmesi amacıyla saf halde NS, kolajen, poli-l-lizin ve formülasyonların FT-IR spektrumları çekilmiştir. Elde edilen spektrumlar değerlendirildiğinde, etkin madde içermeyen PLGA (50:50) ve PLGA (75:25) doku iskelelerinin kolajen veya poli-l-lizin ile kaplanmasından sonra, kolajen ile kaplama yapılan formülasyonlarda kaplama yapılmayan gruptan farklı olarak kolajenin kimyasal yapısına özgü O-H ve N-H absorpsiyon bandları (293), poli-l-lizin ile kaplama yapılan formülasyonlarda ise poli-l-lizinin kimyasal yapısına özgü N-H absorpsiyon bandları (294) görülmektedir. Bu durum formülasyonlara uygulanan kaplama işleminin etkin bir biçimde gerçekleştiğini göstermektedir.

Etkin madde (NS) yüklü PLGA (50:50) ve PLGA (75:25) doku iskelesi formülasyonlarının FT-IR spektrumları incelendiğinde, formülasyonların kolajen veya poli-l-lizin ile kaplanmasından sonra kaplama yapılmayan formülasyonlardan farklı olarak kolajenin ve poli-l-lizinin yapısına özgü N-H absorpsiyon bandları görülmektedir. NS' un saf halde çekilen spektrumunda yapıda O-H grubunun bulunması nedeniyle O-H absorpsiyon bandı var olduğundan, NS içeren formülasyonlarda O-H absorpsiyon bandının varlığı kolajen ile kaplamanın gerçekleştirildiğini göstermekte yetersiz kalmaktadır. Bu nedenle spektrumlarda görülen N-H absorpsiyon bandlarının varlığı hem kolajen hem de poli-l-lizin ile kaplamanın gerçekleştiğini göstermektedir.

Benzer şekilde literatürde doku iskelesi formülasyonlarında kaplama etkinliği FT-IR spektrumlarıyla değerlendirilmiştir. Huang ve arkadaşları (295) yaptıkları bir çalışmada PLGA ve kitosan polimerlerini kullanarak filmler hazırlamışlar ve bu filmleri laminin ile kapladıktan sonra kaplama etkinliğini FT-IR spektrumlarını çekerek göstermişlerdir. Yine bir başka çalışmada Zheng ve arkadaşları (129) hazırladıkları kitosan filmleri poli-l-lizin ile kaplamışlar ve değişik konsantrasyonlarda kullandıkları poli-l-lizin ile kaplama etkinliğini FT-IR spektrumlarını çekerek göstermişlerdir.

5.4.4. Porozite Ölçümleri

Doku iskelelerinin yüzey ve iç/poröz yapı özelliklerinin yanısıra porların büyüklüğü de formülasyonların mekanik dayanıklılığı, parçalanması, ilacın salım hızı ve kinetiği (etkin madde içermesi halinde) ve hücre ile etkileşimi (hücrelerin adezyon, beslenme, migrasyon ve çoğalmaları) üzerinde büyük etkiye sahiptir.

PLGA (50:50) ve PLGA (75:25) kullanılarak hazırlanan doku iskelesi formülasyonlarının porozite sonuçları incelendiğinde (Tablo 4.7) tüm formülasyonların por çapı değerlerinin 150-200 µm arasında olduğu görülmektedir. Literatürde 100 µm' den büyük porlar makropor olarak değerlendirilmektedir (296). Bu durumda doku iskelelerinin yapısında bulunan porların makropor yapısında olduğu söylenebilir (254,297). Aynı zamanda doku iskelelerinin SEM fotoğrafları incelendiğinde yapıda bulunan makroporların birbirleriyle bağlı şekilde bulunduğu görülmektedir (Şekil 4.15 ve 4.16). Literatürde por çapı değerlerinin 150-200 µm arasında olmasının yaklaşık 10 µm büyüklüğüne sahip hücrelerin doku iskelesi

üzerindeki yerleşimi ve etkileşimi üzerinde pozitif etki oluşturacağı bildirilmiştir (290). Lee ve arkadaşları (290) yaptıkları çalışmada, barındırdığı hücrelerin büyüklüğünden 15-20 kat daha büyük por çapına sahip doku iskelelerinde hücrelerin birbirleriyle ve periferdeki hücrelerle kolaylıkla etkileştiğini göstermiştir. Bir başka çalışmada, doku iskelelerinin implante edildikleri bölgede yapısında bulundurduğu boşluklar nedeniyle hücrelerin yerleşimine, hücre-polimer etkileşimlerine ve ekstrasellüler matriks rejenerasyonuna olanak sağladığı ve doku onarımını destekleyerek hasarlı bölgenin onarımını gerçekleştirdiği bildirilmiştir (154).

Tez çalışmamızda kullanılan doku iskelesi formülasyonlarının porozite sonuçları istatistiksel olarak incelendiğinde sonuçlar arasında anlamlı bir fark bulunmamakla birlikte ($p > 0,05$), etkin madde içermeyen, kaplama yapılmamış PLGA (50:50) doku iskelesi formülasyonunun etkin madde içermeyen kolajen veya poli-l-lizin ile kaplı PLGA (50:50) formülasyonuna göre daha büyük por çapı değerlerine sahip olduğu tespit edilmiştir. Yine etkin madde içermeyen PLGA (50:50) doku iskelesi ile NS yüklü PLGA (50:50) doku iskelesi karşılaştırıldığında boş doku iskelesi formülasyonunun daha büyük por açıklığına sahip olduğu belirlenmiştir. Bu durum yüklenen etkin madde ve formülasyona ilave edilen kaplama ajanlarının (kolajen, poli-l-lizin) doku iskelesi yapısındaki makroporları doldurması ve buna bağlı olarak por çapının küçülmesi ile açıklanabilir.

PLGA (75:25) doku iskelesi formülasyonlarında da benzer sonuçlarla karşılaşmıştır. PLGA (50:50) ve PLGA (75:25) formülasyonları tüm gruplar göz önünde bulundurularak karşılaştırıldığında, PLGA (50:50) kopolimeri ile hazırlanan formülasyonların por çaplarının PLGA (75:25) ile hazırlanan formülasyonlardan daha büyük olduğu tespit edilmiştir. Bu durum literatürde de belirtildiği şekilde, PLGA polimerinin yapısındaki PLA kopolimerinin oranının artmasıyla poröz yapının azalması ve daha yoğun doku iskelesi formülasyonlarının oluşması ile açıklanabilir (292).

PLGA (50:50) veya PLGA (75:25) ile hazırlanan doku iskelelerinde elde edilen por büyüklükleri arasındaki farklılıkların, formülasyonların su alımı, in vitro parçalanma, etkin madde salımı ve hücre ile etkileşimi üzerine etkileri Bölüm 5.4.5, 5.4.6, 5.5 ve 5.6.2' de tartışılacaktır.

5.4.5. Su Absorplama Özelliklerinin İncelenmesi

Doku iskelelerinin şişme ve su absorplama özelliklerinin incelenmesi, elde edilen formülasyonların karakterizasyonu sırasında pek çok özelliğinin açıklanmasına olanak sağlar. Hazırlanan doku iskelelerinin su absorplama kapasitesi, formülasyonun hidrofilik veya hidrofobik karakterini, formülasyon üzerinde hücre ekimi sırasında hücre süspansiyonunun dağılımını, formülasyondan ilacın salım özelliklerini ve formülasyonun implante edildiği bölgede oksijen ve besin transferi kapasitesini etkiler. Yüksek su absorplama kapasitesine sahip bir doku iskelesi formülasyonunun hidrofilisitesinin de yüksek olduğu, bu nedenle hücre ile etkileşiminin kuvvetli olacağı ve implantasyon bölgesinde kolaylıkla besin ve oksijen transferini sağlayarak hasarlı bölgede yeni doku oluşumunu gerçekleştirebileceği sonuçlarına varılabilir. Aynı zamanda elde edilen formülasyondan etkin maddenin salımında, ilacın difüzyon özelliklerinin yanında polimerik matriksin su absorplama kapasitesinin de önemli etkisi olacağından bu özelliğın incelenmesi gereklidir (297,298).

PLGA (50:50) ve PLGA (75:25) kullanılarak hazırlanan doku iskelesi formülasyonlarının şişme ve su absorplama özellikleri incelendiğinde, formülasyonlarda kullanılan PLGA'ın kopolimer oranına bağılı olarak, formülasyonların su absorplama özelliğinin de farklılık gösterdiği tespit edilmiştir. Bu durum kopolimer oranına bağılı olarak polimerin hidrofilik veya hidrofobik özelliğinin değışmesinden kaynaklanmaktadır (252,289). Hidrofilik yapısı nedeniyle, PLGA (50:50) polimeri kullanılarak hazırlanan tüm formülasyonların su absorplama değeri PLGA (50:50)'ye göre daha yüksek oranda PLA içerdüğinden, daha hidrofobik olan PLGA (75:25) polimerinin kullanıldığı formülasyonlara göre, her zaman noktası için daha yüksek bulunmuştur ($p < 0,05$) (Şekil 4.22, 4.23). Maksimum su absorplama değeri PLGA (50:50) formülasyonları için % 130 ve PLGA (75:25) formülasyonları için % 45 olarak bulunmuştur. Yoon ve arkadaşlarının yaptıkları çalışmada (254), çalışmamızın bulgularına benzer şekilde etkin madde içermeyen PLGA (50:50) ve PLGA (75:25) doku iskelelerinin şişme ve su absorplama özellikleri incelenmiş, buna göre maksimum su absorplama değeri PLGA (50:50) için yaklaşık % 500 ve PLGA (75:25) için yaklaşık % 200 olarak bulunmuştur. Buna göre çalışmamızda elde edilen sonuçların literatürde elde edilen

sonuçlardan biraz daha düşük çıkması, deneyin farklı boyutlardaki doku iskeleleriyle gerçekleştirilmesi sonucu su absorplama yüzdelerinin değişmesiyle açıklanabilir.

PLGA (50:50) kullanılarak hazırlanan formülasyonlar kendi aralarında değerlendirildiğinde gözlenen farklar çok çarpıcı olmamakla birlikte (Şekil 4.22), etkin madde içeren formülasyonların boş doku iskelelerine göre daha az su absorpladıkları tespit edilmiştir. Bu sonuç formülasyonların SEM fotoğrafları ve por büyüklükleri sonuçları ile de uyumludur. Boş doku iskelelerinin yüzeyinin daha gözenekli ve por çapının daha büyük olması, bu formülasyonlara suyun 35. güne kadar daha hızlı ve daha yüksek miktarda penetre olmasına neden olmuştur. Daha küçük por çapına ve yüzeyde daha az gözenekli yapıya sahip olmaları nedeniyle, bu süre zarfında NS yüklü formülasyonlarda su absorpsiyonu daha az ve daha yavaş bir biçimde meydana gelmiştir. Aynı zamanda NS' un sudaki çözünürlüğünün oldukça yüksek olması nedeniyle şişme ve su absorplama deneyleri sırasında inkübasyon ortamında bir miktar çözünerek doku iskelesinin ağırlığında azalmaya neden olması da NS yüklü formülasyonlarda su absorplama değerlerinin daha düşük olmasına neden olabilir. Hem boş hem etkin madde içeren formülasyonlarda, 35. günden sonra su penetrasyonu doygunluk nedeniyle azalmış ve daha sonra da sonlanmıştır.

PLGA (75:25) kullanılarak hazırlanan formülasyonlar kendi aralarında değerlendirildiğinde (Şekil 4.23), formülasyonların su absorplama eğilimlerinin PLGA (50:50) ile hazırlanan formülasyonlara benzerlik gösterdiği tespit edilmiştir. Sonuçlar arasında belirgin bir fark olmamakla birlikte, boş formülasyonlara göre daha küçük por çapına sahip olmaları ve daha az gözenekli yüzey özellikleri nedeniyle NS içeren formülasyonlarda daha yavaş ve daha az miktarda su absorpsiyonu gözlenmiş ve 35. günden sonra daha da azalarak doygunluk nedeniyle sonlanmıştır.

5.4.6. İn Vitro Degradasyon

PLGA doku iskelelerinin degradasyon kinetiklerinin implante edildikleri bölgedeki ortam şartlarına, monomer oranlarına ve doku iskelelerinin kalınlığına bağlı olarak değiştiği bildirilmiştir (299). PLGA doku iskelelerinin parçalanma hızı, polimeri oluşturan PLA ve PGA kopolimerlerinin polimer içerisindeki oranlarına bağlıdır. Polimer bileşimindeki PGA oranının artmasıyla polimerin hidrofilitesi ve buna bağlı olarak su absorplama kapasitesi de artmaktadır. Bu durumda polimer daha

yüksek oranda su absorplayarak parçalanma yolağına girecek ve PLA oranı daha yüksek olan PLGA polimerlerine göre daha hızlı parçalanacaktır (300). Doku iskelelerinin parçalanma zamanı özellikle formülasyonun biyouyumluluğunu ve fonksiyonunu yerine getirebilme kapasitesini etkiler. Doku iskelelerinin implante edildikleri bölgede hasarlı bölgenin onarımını gerçekleştirebilmek için yeterli hücre sayısına ulaşması ve hücre-hücre etkileşimini sağlayabilmesi önemlidir (301). Bu durumda doku iskelelerinin parçalanma hızının, bulundukları bölgede doku onarımını sağlayabileceği süreyle orantılı olması istenir. Ayrıca doku iskelelerinin parçalanma sürelerinin çok uzun olması, bölgeye yerleştirilen materyalin kronik inflamasyon reaksiyonları göstermesine neden olabilir (302). Bu nedenle hazırlanan doku iskelesinde kullanılan polimer, implantasyon bölgesinde doku onarımını sağlayacak sürede parçalanmalıdır.

PLGA (50:50) ve PLGA (75:25) kullanılarak hazırlanan doku iskelesi formülasyonlarının parçalanma özellikleri incelendiğinde, PLGA (50:50) polimerinin kullanıldığı formülasyonlar için 21. gün, PLGA (75:25) polimerinin kullanıldığı formülasyonlar için ise 77. güne kadar pH değerlerinde belirgin bir değişim olmadığı, bu günlerden sonra pH' nın kayda değer bir şekilde düşmeye başladığı ve PLGA (50:50) formülasyonları için 49. gün ve PLGA (75:25) formülasyonları için 91. günde pH değerlerinin minimuma ulaştığı görülmüştür (Şekil 4.24, 4.25). PLGA polimerlerinde asidik parçalanma meydana geldiğinden, pH değerlerindeki düşme parçalanma olayının başladığını gösterir (63-66). Formülasyonlara ilave edilen etkin maddenin (NS) veya kaplama ajanlarının (kolajen, poli-l-lizin) pH değerleri üzerinde herhangi bir etkisi olmamıştır ($p > 0.05$). Wu ve arkadaşlarının yaptıkları çalışmada (282), PLGA (75:25) doku iskelelerinin in vitro degradasyon çalışmaları gerçekleştirilmiş ve yaklaşık 13 hafta süre sonunda minimum pH değerine ulaşılmıştır.

5.4.7. Doku İskelelerine Yüklenen NS Miktarının Belirlenmesi

PLGA (50:50) ve PLGA (75:25) kullanılarak hazırlanan doku iskelesi formülasyonlarının ilaç yükleme etkinliği sonuçları incelendiğinde, tüm formülasyonların yükleme etkinliği % 83-93 arasında bulunmuştur. Hazırlanan tüm doku iskelesi formülasyonlarının ilaç yükleme etkinliği sonuçları istatistiksel olarak karşılaştırıldığında formülasyonlar arasında fark bulunmamış olsa da ($p > 0,05$),

PLGA (50:50) doku iskelelerinin PLGA (75:25) doku iskelelerine göre bir miktar daha yüksek yükleme etkinliğine sahip olduğu tespit edilmiştir. Bu durum hidrofilik etkin maddenin PLGA (75:25)' e göre daha hidrofilik yapıda olan PLGA (50:50) polimeri ile meydana getirdiği etkileşimlerden kaynaklanabilir (192). Kim ve arkadaşları (192) yaptıkları bir çalışmada sırasıyla hidrofilik ve hidrofobik yapıda olan askorbat-2-fosfat ve deksametazon etkin maddelerini PLGA (85:15) doku iskelelerine yüklemişler ve deksametazon ile yaptıkları ilaç yükleme çalışmalarında yaklaşık % 90 oranında yükleme elde ederken, askorbat-2-fosfat için yükleme etkinliğini yaklaşık % 30 oranında bulmuşlardır. Çalışmada bu durum hidrofobik yapıdaki deksametazonun yine hidrofobik bir polimer olan PLGA ile etkileşiminin daha kuvvetli olduğu yönüyle açıklanmıştır. Bir başka çalışmada Yoon ve arkadaşları (303), deksametazonu PLGA (75:25) ve PLGA (65:35) doku iskelelerine yüklemişler, PLGA (65:35) doku iskelesine yüklenen etkin madde miktarını % 49-53, PLGA (75:25) doku iskelesine yüklenen etkin madde miktarını ise % 56-58 bulmuşlardır. Araştırmacılar bu durumu hidrofobik ilaç ile daha hidrofobik olan polimer arasındaki hidrofobik-hidrofobik etkileşimlerin kuvvetli olmasıyla açıklamışlardır.

Kaplama yapılmamış ve kaplı doku iskelesi formülasyonları karşılaştırıldığında, kaplama yapılmamış formülasyonlarda (% 90-92) kolajen veya poli-l-lizin ile kaplanmış formülasyonlara göre (% 83-86) daha yüksek yükleme etkinliği sonuçları elde edilmiştir. Bu durum kaplama işlemi sırasında daha önceden doku iskelesine yüklenmiş olan NS' un büyük oranda su içeren kaplama çözeltisi içerisinde bir miktar çözünerek formülasyondaki miktarının azalmasından kaynaklanabilir.

5.5. İn Vitro Salım Deneyleri

NS' un PLGA50-NS, PLGA50-NS-K, PLGA50-NS-L, PLGA75-NS, PLGA75-NS-K ve PLGA75-NS-L doku iskelesi formülasyonlarından salım eğrileri Şekil 4.27, 4.28, 4.29, 4.30, 4.31 ve 4.32' de gösterilmiş olup 7 günün sonunda NS' un % 90-98' i salınmıştır. NS' un doku iskelelerinden salımı bifazik özellikte olup, başlangıçta yüksek miktarda patlama etkisi (= burst effect) görülmüş ve ilerleyen zamanda NS' un daha yavaş salındığı belirlenmiştir. Bu durum doku iskelelerinin hazırlanması sırasında uygulanan derin-dondurma ve liyofilizasyon işlemlerinin

meydana getirdiği makroporöz yapı ile açıklanabilir (304). Liyofilizasyon işlemi sırasında buz kristalleri tarafından oluşturulan porlu yapı, formülasyonların salım ortamında hızla rehidrate olmasına ve bu sayede salım ortamının başlangıçta hızla doku iskelesine nüfuz ederek salınan NS miktarının artmasına neden olur. Buna ilave olarak, başlangıçta gözlenen yüksek patlama etkisi, hidrofilik bir ilaç olan NS' un PLGA polimerine yüklenmesi sonucu doku iskelesine su penetrasyonunu artırması ve dolayısıyla yüklenen hidrofilik ilacın salım hızının da artmasıyla açıklanabilir. Ayrıca, hidrofilik bir ilaç olan NS ile hidrofobik PLGA arasında sınırlı bir fiziksel etkileşim olmasına rağmen, doku iskelelerinin hazırlanması sırasında yüklenen ilacın büyük çoğunluğunun doku iskelesi formülasyonlarının yüzeyine lokalize olması, yüzeydeki ilacın salım ortamında hızla salınarak başlangıç patlama etkisinin oluşmasına neden olabilir. Kim ve arkadaşları (192) yaptıkları bir çalışmada, sırasıyla hidrofilik ve hidrofobik ilaçlar olan askorbat-2-fosfat ve deksametazon içeren PLGA (85:15) doku iskelesi formülasyonları hazırlamışlar ve bu formülasyonlardan etkin maddelerin salımını incelemişlerdir. Araştırmacılar, askorbat-2-fosfat içeren formülasyonların deksametazon içerenlere göre daha yüksek patlama etkisine sahip olduğunu tespit etmişler ve bu durumu hidrofilik ilacın salım ortamında porlardan su penetrasyonunu artırarak salım hızını artırdığı şeklinde açıklamışlardır. Yine Shi ve arkadaşları (188) yaptıkları bir çalışmada, gentamisin sülfat içeren PLGA doku iskeleleri hazırlamışlar ve bu doku iskelelerinden etkin maddenin salımını incelemişlerdir. Araştırmacılar, salım çalışmaları sonucunda ilk 2 saat içerisinde yaklaşık % 60 civarında patlama etkisi tespit etmişler ve bu durumu hidrofilik ilacın matrikse su penetrasyonunu artırmasıyla açıklamışlardır. Kim ve arkadaşları (186) yaptıkları bir çalışmada, hidrofilik sefoksitin sodyum içeren PLGA (75:25) doku iskelesi formülasyonları hazırlamışlar ve bu formülasyonlardan sefoksitin sodyumun salımını incelemişlerdir. Sefoksitin sodyumun PLGA doku iskelelerinden salımında başlangıçta yaklaşık % 60 oranında bir patlama salımı elde edilmiş ve bu durum hidrofilik ilacın büyük çoğunluğunun hidrofobik polimerin yüzeyine lokalize olmasıyla açıklanmıştır.

Çalışmamızda hazırlanan formülasyonlar ile in vitro olarak 7 gün boyunca sürekli bir antiinflamatuvar ilaç salımının sağlanması, formülasyon tasarımının başlangıçta öngörülen amaca uygun olduğunu göstermektedir. Zira klinikte korneal

hasarların rejenerasyonunda, hasar sırasında meydana gelen inflamasyonun başlangıçtan itibaren antiinflamatuvar ilaç ile sürekli ve kontrollü bir şekilde baskılanması istenmekte ve bu durum tedavinin başarısı açısından büyük önem taşımaktadır. Bu projede araştırmacı olarak görev alan oftalmoloji uzmanları, klinikte bu tür uygulamalarda inflamasyonun şiddetine bağlı olarak bir haftadan birkaç aya kadar bir süre ile topikal antiinflamatuvar ilaç tedavisinin gerektiğini bildirmişlerdir. Bu nedenle çalışmamızda salım deneyleri sonucunda elde edilen bulgular geliştirilen formülasyonların öngörülen amaca uygun olduğunu göstermektedir. Salım sonuçları in vitro degradasyon çalışmalarından elde edilen sonuçlar ile birlikte irdelendiğinde, parçalanma süresinin ilaç salım süresinden daha uzun olduğu görülmektedir. Hem PLGA (50:50), hem de PLGA (75:25) doku iskelelerinden ilaç salımının 7 günde tamamlanmasından sonra, implantasyon bölgesinde halen var olan polimerik doku iskelelerinin hasarlı bölgede rejenerasyonu sağlayabilmesi için epitel hücrelerine destek sağlayacağı ve hücre oluşumu ile iyileşme açısından olumlu sonuçlar vereceği düşünülmektedir.

Hazırlanan tüm doku iskelesi formülasyonlarıyla yapılan benzerlik çalışmalarında, referans formülasyon olarak PLGA (50:50) doku iskeleleri için PLGA50-NS ve PLGA (75:25) doku iskeleleri için PLGA75-NS formülasyonları esas alındığında formülasyonlar birbirleriyle benzer bulunmuştur. Aynı zamanda PLGA (50:50) doku iskelesi formülasyonlarıyla PLGA (75:25) doku iskelesi formülasyonları karşılaştırıldığında yine tüm formülasyonların benzer olduğu bulunmuştur. Doku iskelelerinden 7 günün sonunda salınan % NS miktarı ve hesaplanan salım hızı PLGA (50:50) ve PLGA (75:25) doku iskelesi formülasyonları için kendi aralarında veya birbirleriyle karşılaştırıldığında istatistiksel açıdan anlamlı bir fark bulunmamıştır ($p > 0.05$).

Bu durumda, suda çok çözünen NS' un kullanılan polimerin hidrofilik/hidrofobik özelliğinden bağımsız olarak, aynı hızda salım yaptığı sonucuna varılabilir. Doku iskelelerinden etkin madde salımını, porozite, formülasyonun şişme ve su absorplama özellikleri, yüklenen etkin madde miktarı, etkin maddenin çözünürlüğü ve parçalanma özelliklerinin etkilediği bildirilmiştir (192). Çalışmamızda PLGA (50:50) ve PLGA (75:25) ile hazırlanan formülasyonlarla elde edilen salım profillerinin benzer bulunması, farklı kopolimer oranları ile hazırlanan

formülasyonların parçalanma ve su alım özelliklerinin farklı olmasına rağmen, por çapları arasındaki farkın belirgin olmaması ve yüklenen etkin madde miktarının benzer olması ile de açıklanabilir.

Salım çalışmalarını değerlendirmenin diğer bir yolu salım verilerinin kinetik modellere uygulanmasıdır. Bu modeller dozaj formunun salım karakterini anlamak ve formülasyonun in vivo ortamda davranışı hakkında bir fikir elde etmek için yararlıdır. Bu nedenle tez çalışmamızda doku iskelelerine ait in vitro salım çalışmalarından elde edilen verilere ait sonuçlar sıfır, birinci derece, Higuchi, RRSBW ve Hixson Crowell uyum iyiliği yöntemine göre değerlendirilmiş olup, r^2 değerleri hesaplanmıştır. 7 günlük salım sonunda formülasyonların r^2 değerleri karşılaştırıldığında doku iskelelerinden salınan NS' un salım profilinin RRSBW modeline uyduğu görülmüştür. RRSBW, salım profilinin doğrusal hale getirilmesi için pek çok çalışmada kullanılmış kinetik bir modeldir ve sistemi çeşitli parametrelerle ifade eder (305-307). Bu modelde en önemli parametrelerden biri şekil faktörü (β) olup, eğrinin eksponansiyel ($\beta = 1$), sigmoidal ($\beta > 1$) veya parabolik ($\beta < 1$) olmasını belirler. Eğri sigmoidal olduğunda ($\beta > 1$) sistemde başlangıçtaki yavaş ilaç salımını takiben hızla plato değere ulaşıldığı bilinmektedir. Eğri eksponansiyel ($\beta = 1$) veya parabolik ($\beta < 1$) ise başlangıçta hızlı ilaç salımını takiben devamında plato değere ulaşan birinci derece ilaç salım profili görülür (308). PLGA (50:50) ve PLGA (75:25) doku iskelesi formülasyonları için bütün β değerleri 0.1909-0.3066 arasında olup $\beta < 1$ dir. Böylelikle salımın başlangıçta hızlı olup devamında plato değere ulaşana kadar yavaş olduğu tespit edilmiştir.

5.6. Hücre Kültürü Çalışmaları

Hücre kültürü çalışmalarında öncelikle tavşan korneasından epitel hücreleri izole edilmiş, izole edilen hücrelerin kornea epitel hücresi olduğu tespit edilmiş ve bu hücreler kültür edildikten sonra hazırlanan doku iskelesi formülasyonları üzerine ekilerek morfolojik ve mikroskopik incelemeler, sitotoksikite testleri ve hücre proliferasyon testleri gerçekleştirilmiştir. Bu bölümde hücre kültür çalışmalarından elde edilen sonuçlar değerlendirilecektir.

5.6.1. İzole Edilen Hücrelerin İmmünohistokimyasal İncelenmesi

Tavşan korneasından izole edilen epitel hücrelerin görsel olarak tanımlanması için gerçekleştirilen immünohistokimyasal çalışmalardan sonra elde edilen floresans mikroskop fotoğrafları incelendiğinde (Şekil 4.33), kornea epitel hücrelerine spesifik olan keratin 14 ile muamele sonucu, hücrelerin yeşil renge boyandığı görülmektedir. Bu durum izolasyon işlemi sırasında elde edilen hücrelerin kornea epitel hücresi olduğunu göstermektedir. Keratin 14 ile boyama yöntemi literatürde benzer şekilde izole edilen hücrelerin kornea epitel hücresi olduğunu ispatlamak için sıklıkla kullanılmaktadır. Elde edilen floresans mikroskop fotoğrafları literatürde kornea epitel hücreleriyle yapılan immünohistokimyasal çalışmalar ile uyum içerisinde (309-313).

5.6.2. Hücre Adezyonunun Mikroskopik Olarak İncelenmesi

Hazırlanan doku iskesi formülasyonlarına hücre adezyonunun görsel olarak incelenmesi amacıyla, formülasyonlara kornea epitel hücrelerinin ekilmesini takiben “giemsa” ile boyama yapılmış ve hücre yüklü doku iskelelerinin optik mikroskop fotoğrafları çekilmiştir. Sadece hücre boyama özelliği olan “giemsa” ile boyama işlemiyle elde edilen fotoğraflar incelendiğinde (Şekil 4.34, 4.35), doku iskeleleri üzerinde tutunan kornea epitel hücrelerinin mor renge boyandığı görülmektedir. Bu durum, tüm formülasyonlarda kornea epitel hücresi bulunduğunu dolayısıyla da hücre adezyonunun kuvvetli olduğunu göstermektedir. Benzer şekilde çeşitli boyama yöntemleri kullanılarak doku iskelelerinin hücre ile etkileşiminin gösterildiği çalışmalar literatürde yer almaktadır. Öztürk ve arkadaşları (314), kitosan kaplı aljinat membranları üzerinde limbal epitel hücrelerinin adezyonunu, giemsa ile boyamayı takiben membranların optik mikroskop fotoğraflarını çekerek göstermişlerdir. Yapılan bir başka çalışmada Lee ve arkadaşları (51), hazırladıkları PLGA-kolajen doku iskeleleri üzerine tutunan kornea epitel hücrelerini hematoksin-eozin boyama yöntemini kullanarak faz-kontrast mikroskopunda çektikleri fotoğraflarla göstermişlerdir.

Doku iskelelerinin hazırlanmasında kullanılan polimerik materyalin hidrofilik özelliğinin artmasının hücrelerin doku iskesi üzerindeki yerleşimi ve etkileşimi üzerinde pozitif etki oluşturduğu bildirilmiştir. Hazırlanan doku iskesi formülasyonunun su alma kapasitesi dolayısıyla hidrofilitesi arttıkça hücrelerin

doku iskelelerinin iç bölgelerine penetrasyonu kolaylaşır ve böylece doku iskelesi üzerinde tutunan hücre sayısı ve hücre büyüme potansiyeli artar (154,285,290,315). Bu durumda doku iskelelerinin implante edildikleri bölgede hücre çoğalmasına ve migrasyonuna olanak sağlayarak hasarlı bölgenin onarımını gerçekleştirmesi beklenir. Literatürde doku iskelelerinin hücre ile etkileşiminin artırılması için polimerik materyallerin hidrofilisitesinin artırılmasına yönelik çalışmalar bulunmaktadır. Oh ve arkadaşları (154), PLGA polimerini PVA ile karıştırarak PLGA doku iskelelerine göre daha hidrofilik yapılar elde etmiş ve böylece hücre adezyonunun arttığını bildirmiştir. Tez çalışmamızda etkin madde olarak NS gibi hidrofilik bir etkin madde seçilmesi, bu anlamda çalışmaya ilave bir katkı sağlamıştır.

Kolajen veya poli-l-lizin ile kaplanmış PLGA (50:50) ve PLGA (75:25) doku iskelesi formülasyonlarının optik mikroskop fotoğrafları, kaplama yapılmamış formülasyonlarla karşılaştırıldığında, kaplama yapılan formülasyonlarda tutunan hücre sayısının daha yoğun olduğu görülmektedir. Bu durum poli-l-lizin ve kolajenin hücreler üzerinde biyomimetik olarak pozitif etki oluşturması ve polimerik materyal üzerinde hücre etkileşimini artırmasıyla açıklanabilir (251,316). Nojehdehian ve arkadaşları (251) yaptıkları çalışmada, PLGA (50:50) mikrokürelerden oluşan doku iskelelerini poli-l-lizin ile kaplamışlar ve poli-l-lizin ile kapladıkları doku iskelelerinin hücre adezyonunu ve proliferasyonunu artırdığını göstermişlerdir. Yapılan bir başka çalışmada Fischer ve arkadaşları (317), kaplama yapılmayan PLGA (50:50) mikropartikülleri ile poli-l-lizin ile kaplanmış PLGA (50:50) mikropartiküllerini karşılaştırmışlar ve kaplama yapılmayan PLGA mikropartiküllerinin başlangıçta varolan negatif zeta potansiyellerinin kaplama sonucu pozitif bir değer aldığını göstermişlerdir. Çalışmada negatif yüklü PLGA mikrokürelerinin polikasyonik poli-l-lizin ile kaplanarak vücut içerisinde hücrelerin etkileşmesini sağlamak için üç boyutlu bir çevre oluşturarak hücrelerin proliferasyonunu ve farklılaşmasını artırdığı bildirilmiştir. Zhu ve arkadaşları (316), PLGA (75:25) ve PLGA (75:25)-kolajen doku iskeleleri üzerinde yaptıkları hücre adezyon çalışmaları sonucunda doku iskelesi formülasyonlarına tutunan domuz özafagus yumuşak kas hücresi sayısını karşılaştırmışlar ve PLGA doku iskelelerinin kolajen ile kaplanmasından sonra hücre tutunması üzerinde pozitif etki

oluşturduğunu göstermişlerdir. Lee ve arkadaşları (51), yaptıkları çalışmada kolajen ile kapladıkları PLGA doku iskelelerinin hücre tutunmasını belirgin bir şekilde artırdığını tespit etmişlerdir. Benzer şekilde, çalışmamızda da doku iskelelerine kolajen veya poli-l-lizin ile kaplama yapılması hücrelerin adezyonunu artırmıştır.

5.6.3. Hücre Morfolojisinin İncelenmesi

Korneal epitel hücrelerinin doku iskelelerinin iç bölgelerine kadar yerleşebildiğinin incelenmesi amacıyla, PLGA (50:50) ve PLGA (75:25) doku iskelelerinin hücre ekiminden 3 gün sonra enine kesit alınarak SEM fotoğrafları çekilmiştir. Elde edilen fotoğraflar incelendiğinde (Şekil 4.36, 4.37, 4.38, 4.39), tüm formülasyonlarda hücrelerin doku iskelelerinin iç bölgelerine kadar adhere olduğu tespit edilmiştir. Literatürde de benzer şekilde doku iskelelerinin iç bölgelerine hücre tutunması SEM fotoğrafları çekilerek değerlendirilmiştir (51,58,318).

5.6.4. İn Vitro Biyouyumluluk Testleri

5.6.4.1. Sitotoksikite Testi

Hazırlanan doku iskelesi formülasyonlarının biyouyumluluklarının (ekilen kornea epitel hücreleri ile etkileşim şekillerinin) tespit edilmesinde ilk basamak sitotoksikite çalışmalarıdır. Bu çalışmada hazırlanan formülasyonların sitotoksik özelliklerinin tespit edilmesi için, doku iskelelerinin hücreler üzerindeki sitotoksik etkileri 1, 5 ve 10. günlerde MTT testi yardımıyla incelenmiştir. MTT testi canlı ve/veya çoğalan hücrelere uygulanan kolorimetrik bir test olup, bu yöntemde canlı hücreler süksinat dehidrogenazları aracılığı ile çözünür bir tetrazolyum tuzu olan sarı renkli MTT bileşiğini çözünür olmayan mor renkli formazan kristallerine çevirirler. Bu kristallerin çözünmesini takiben oluşan renk değişimi spektrofotometrik yöntemle ölçülerek, formülasyonlardaki ilaç duyarlılığı kantitatif olarak tespit edilebilir. Sitotoksikite testinde sonuçlar, kontrol kuyucuklarının absorbansı % 100 olarak kabul edilerek yüzde canlılık olarak hesaplanır (270).

Tez çalışmamızda yapılan sitotoksikite çalışmalarında, doku iskelesi formülasyon bileşenlerinin (polimer, ilaç, kaplama maddeleri) kornea epitel hücreleri üzerinde sitotoksik etkileri incelenmiş ve tüm formülasyonlar ile 10. günün sonunda elde edilen hayatta kalma oranları % 75' in üzerinde bulunmuştur. Hazırlanan doku iskelesi formülasyonlarının implante edildikleri bölgede herhangi bir toksik

reaksiyona sebep olması istenmediğinden, formülasyondaki bileşenlerin de sitotoksik etkilerinin olmaması beklenmektedir. Doku iskelesi formülasyonlarını oluşturan bileşenler incelendiğinde, PLGA polimeri biyoparçalanır, biyouyumlu, nontoksik ve FDA onaylı bir polimer olduğundan sitotoksik etkilere yol açması beklenmemektedir (63-66). Literatürde NS' un sitotoksik etkilerinin incelendiği çeşitli çalışmalar bulunmaktadır. Masubuchi ve arkadaşları (319) yaptıkları çalışmada, NS' u da içeren çeşitli antiinflamatuvar ilaçların sitotoksik etkilerini hepatositler üzerinde incelemiş ve etkin maddelerin çözücüsü olan kontrol grubu ile karşılaştırıldığında NS' un herhangi bir sitotoksik etkisinin olmadığını tespit etmişlerdir. Romet ve arkadaşları (320), NS' u da içeren çeşitli antiinflamatuvar ilaçlar üzerinde sitotoksikite çalışmaları yapmış ve NS' un sitotoksik etkisinin tüm grup içerisinde en düşük olduğunu bulmuşlardır.

Kaplama materyali olarak kullanılan poli-l-lizinin sitotoksik etkilerinin incelenmesine dair literatürde çeşitli çalışmalar bulunmaktadır. Bikram ve arkadaşları (321) yaptıkları çalışmada, gen taşınması için polietilenglikol-ko-poli-l-lizin-g-histidin multiblok kopolimerini poli-l-lizin ile karşılaştırmalı olarak incelemiş ve poli-l-lizinin sıçan yumuşak kas hücre hattı (A7r5) ile muamele edilmesi sonucunda, hücrelerin hayatta kalma oranını % 70' in üzerinde tespit etmişlerdir. Çalışmamızda kaplama materyali olarak kullanılan diğer bir polimer olan kolajenin sitotoksik etkilerinin incelenmesi için Song ve arkadaşları (322), ticari kullanımda olan sığır tendon kolajeni ile hazırladıkları doku iskelelerini insan fibroblast, endotel, yumuşak kas hücreleri ve kondrositler ile muamele etmişler ve 1, 3, 7 ve 10. günlerde hücrelerin hayatta kalma oranını % 80' in üzerinde bulmuşlardır. Çalışmada ayrıca inkübasyon süresi arttıkça kolajenin hücreler üzerinde pozitif etki oluşturarak hücre çoğalmasını artırdığı tespit edilmiştir.

Çalışmamızda, sitotoksikite incelemeleri için hazırlanan doku iskelesi formülasyonlarının kornea epitel hücreleri ile inkübasyon sürelerinin artmasıyla hücrelerin hayatta kalma yüzdelerinin azaldığı ancak istatistiksel olarak inkübasyon süreleri arasında anlamlı bir fark bulunmadığı tespit edilmiştir ($p > 0.05$). NS içeren/içermeyen, kaplama yapılmış/yapılmamış doku iskelesi formülasyonlarının sitotoksikite sonuçları karşılaştırıldığında gruplar arasında anlamlı bir fark bulunmamıştır ($p > 0.05$). Buna ilaveten, tüm formülasyonlar ile 10. günün sonunda

elde edilen hayatta kalma yüzdeleri % 75' in üzerinde bulunmuştur. Literatürde sitotoksikite testi sonucunda hücrelerin hayatta kalma yüzdelerinin % 70' in üzerinde bulunması, kullanılan materyalin sitotoksik olmadığı şeklinde yorumlanmaktadır (323). Dolayısıyla tez çalışmamızda hazırlanan doku iskelesi formülasyonlarının sitotoksik etkisi bulunmadığı anlaşılmaktadır.

5.6.4.2. Proliferasyon Testi

Hazırlanan doku iskelesi formülasyonlarının biyouyumluluklarının (ekilen kornea epitel hücreleri ile etkileşim şekillerinin) tespit edilmesinde bir ileri basamak hücre proliferasyonunun değerlendirilmesidir. Bu amaçla tez çalışmamızda kornea epitel hücreleri doku iskeleleri üzerine ekilmiş ve 1, 5 ve 10. günlerde hücrelerin doku iskeleleri üzerindeki proliferasyonu MTT testi yardımıyla incelenmiştir. Doku iskelelerinin 1, 5 ve 10 gün süreyle kornea epitel hücreleri ile inkübasyonu sonrasında elde edilen optik dansite sonuçları Şekil 4.37 ve 4.38' de verilmiştir. Buna göre PLGA (50:50) ve PLGA (75:25) kullanılarak hazırlanan tüm formülasyonlarda inkübasyon süresi arttıkça doku iskeleleri üzerinde tutunan hücre yoğunluğunun arttığı tespit edilmiştir ($p < 0.05$). Bu durumda hazırlanan doku iskelesi formülasyonlarının hücrelerin tutunması ve çoğalması üzerinde pozitif etkisi olduğu söylenebilir.

Doku iskelelerine hücre ekiminden sonra PLGA (50:50) ve PLGA (75:25) kullanılarak hazırlanan doku iskelesi formülasyonlarının optik dansite sonuçları karşılaştırıldığında, optik mikroskop fotoğraflarında da görüleceği üzere (Şekil 4.34, 4.35), PLGA (50:50) polimeri kullanılarak hazırlanan doku iskelesi formülasyonlarında hücre proliferasyonunun PLGA (75:25) doku iskelesi formülasyonlarına göre daha fazla olduğu belirlenmiştir ($p < 0.05$). PLGA (50:50) ve PLGA (75:25) kullanılarak hazırlanan doku iskelesi formülasyonlarının hücre ekiminden sonra kantitatif proliferasyon sonuçları karşılaştırıldığında, görsel olarak elde edilen optik mikroskop fotoğrafları ile uyum içinde olduğu tespit edilmiştir. Optik mikroskop görüntülerinde olduğu gibi, proliferasyon deneylerinde üç ayrı gün için elde edilen kantitatif sonuçlarda da PLGA (50:50) polimeri kullanılarak hazırlanan doku iskelesi formülasyonlarında hücre tutunmasının PLGA (75:25) doku iskelesi formülasyonlarına göre daha fazla olduğu tespit edilmiştir. Bu durum PLGA (50:50) polimerinin PLGA (75:25)' e göre daha hidrofilik yapıda olmasıyla

açıklanabilir. Literatürde de doku iskelelerinin hazırlanmasında kullanılan polimerik materyalin hidrofilik özelliğinin artmasının hücrelerin doku iskelesi üzerindeki yerleşimi ve etkileşimi üzerinde pozitif etki oluşturduğu bildirilmiştir. Hazırlanan doku iskelesi formülasyonunun su alma kapasitesi dolayısıyla hidrofilisitesi arttıkça hücrelerin doku iskelelerinin iç bölgelerine penetrasyonu kolaylaşır ve böylece doku iskelesi üzerinde tutunan hücre sayısı, hücre büyüme potansiyeli ve hücre proliferasyonu artar (154,285,290,315). Bu durumda doku iskelelerinin implante edildikleri bölgede hücre yerleşimine ve etkileşimine olanak sağlayarak hasarlı bölgenin onarımını gerçekleştirmesi beklenir.

Etkin madde (NS) içeren ve içermeyen doku iskelesi formülasyonlarının optik dansite sonuçları karşılaştırıldığında, NS içeren doku iskelesi formülasyonlarının NS içermeyen doku iskelesi formülasyonlarına göre hücre proliferasyonunu daha çok artırdığı ve bu iki grup için optik dansite sonuçları arasında istatistiksel olarak anlamlı bir fark olduğu tespit edilmiştir ($p < 0.05$). Bu durum yine hidrofilik bir ilaç olan NS' un hidrofobik PLGA polimeri ile kombinasyonu sonucunda hazırlanan doku iskelesi formülasyonunu hidrofilikleştirmesiyle açıklanabilir. Yukarıda da açıklandığı üzere, literatürde doku iskelesi formülasyonlarının hidrofilisitesinin artmasıyla hücrelerin doku iskelelerinin iç bölgelerine penetrasyonunun kolaylaştığı ve böylece doku iskeleleri üzerinde tutunan hücre sayısı, hücre büyüme potansiyeli ve hücre proliferasyonunun arttığı bildirilmiştir (154,285,290,315).

Kolajen veya poli-l-lizin ile kaplanmış PLGA (50:50) ve PLGA (75:25) doku iskelesi formülasyonlarının optik dansite sonuçları kaplama yapılmamış formülasyonlarla karşılaştırıldığında, kaplama yapılan formülasyonlarda hücre proliferasyonunun daha fazla olduğu görülmektedir. Bu durum poli-l-lizin ve kolajenin hücreler üzerinde biyomimetik olarak pozitif etki oluşturarak polimerik materyal üzerinde hücre etkileşimini artırmasıyla açıklanabilir. Wu ve arkadaşları (324), hazırladıkları PLGA doku iskelesi formülasyonlarını kolajen ile kaplamışlar ve yüzeyde yapılan kolajen modifikasyonunun hücre tutunması ve proliferasyonunu artırdığını bildirmişlerdir. Yaptıkları çalışmada kolajenin hücre adezyonunu artırıcı etkisini yapısında bulunan arjinin, glisin ve aspartik asit aminoasitlerinin hücrelerle etkileşime girerek hücre tutunmasına yardımcı olmasıyla açıklamışlardır. Chen ve

arkadaşları (325), hazırladıkları PLGA/kolajen doku iskeleleri üzerine kondrositleri ekmişler ve kolajen-PLGA hibridizasyonunun hücre tutunması ve proliferasyonunu artırdığını tespit etmişlerdir. Ide ve arkadaşları (326), bağ dokusu hücrelerinin PLA/kolajen doku iskelelerine hücrel cevaplarını in vitro ve in vivo olarak incelemişler ve kolajen ile hibridizasyonun hücre tutunması, hücre çoğalması ve hücre migrasyonunu artırdığını bildirmişlerdir. Yang ve arkadaşları (327), PLGA doku iskelelerini poli-l-lizin ile kaplayarak yaptıkları yüzey modifikasyonu sonrasında PLGA doku iskeleleri üzerine hücre tutunması ve yayılmasının arttığını bildirmişlerdir. Yapılan bir başka çalışmada Fischer ve arkadaşları (316), kaplama yapılmayan PLGA mikropartikülleri ile poli-l-lizin ile kaplanmış PLGA mikropartiküllerini karşılaştırmışlar ve kaplama yapılmayan PLGA mikropartiküllerinin başlangıçta varolan negatif zeta potansiyellerinin kaplama sonucu pozitif bir değere aldığını göstermişlerdir.

6. SONUÇ

Bu çalışma ile;

- PLGA polimerinin (50:50) ve (75:25) kopolimer oranları kullanılarak NS yüklü doku iskelesi formülasyonları hazırlanabilmektedir.
- Hazırlanan doku iskeleleri kolajen veya poli-L-lizin ile etkin bir şekilde kaplanabilmektedir.
- PLGA (50:50) ve PLGA (75:25) kullanılarak hazırlanan doku iskelelerinin makroporöz yapıda ve porların birbirlerine bağlı ("inter-connected") olarak bulunduğu ve bu yapının kullanılan polimerin kopolimer oranına, etkin maddenin yüklenip yüklenmemesine ve kaplama işleminin uygulanıp uygulanmamasına bağlı olarak değişebildiği gösterilmiştir. PLGA (50:50) ve PLGA (75:25) kopolimeri ile hazırlanan formülasyonların porozite sonuçları karşılaştırıldığında, daha yüksek oranda PLA içermesi nedeniyle PLGA (75:25) kopolimeri ile hazırlanan doku iskelelerinin daha az poröz yapıya sahip olduğu tespit edilmiştir. Buna ilaveten her iki kopolimer oranı için geçerli olmak üzere etkin madde yüklenmesinin ve kaplama işleminin yapılmasının poröz yapının azalmasına neden olduğu bulunmuştur. Bu durum yüklenen NS' un ve kaplama maddelerinin boş formülasyonlardaki porları bir miktar doldurması ile açıklanabilir.
- Hazırlanan doku iskelelerinde kullanılan polimerin kopolimer oranına bağlı olarak şişme ve su absorplama özellikleri ile degradasyon sürelerinin değişebildiği gösterilmiştir. PLGA (50:50) ve PLGA (75:25) kopolimeri ile hazırlanan formülasyonlardaki su absorplama özellikleri ve degradasyon süreleri karşılaştırıldığında, daha yüksek oranda PLA içermesi ve böylelikle daha hidrofobik olması nedeniyle PLGA (75:25) kopolimeri ile hazırlanan doku iskelelerinde daha az su absorpsiyonu gözlenmiş olup, bu durum daha yavaş bir parçalanma meydana gelmesine neden olmuştur.
- Hazırlanan PLGA doku iskelelerine NS etkin miktarda (% 83-93) yüklenebilmektedir.
- NS içeren PLGA doku iskelelerinde salımın uzun süreli olduğu, salım profillerinin tüm formülasyonlarda RRSBW kinetiğine uygun bir şekilde

bifazik olarak gerçekleştiği ve birbirine benzer olduğu tespit edilmiştir. Bifazik salım kinetiği ile antiinflamatuvar ilacın başlangıç yükleme ve uzun süreli idame dozunun sağlanarak in vivo çalışmalarda avantaj sağlayacağı düşünülmektedir.

- Yapılan hücre kültür çalışmalarında tavşan korneasından izole edilen hücrelerin kornea epitel hcreti olduğu tespit edilmiştir.
- Hazırlanan doku iskelesi formülasyonlarının kornea epitel hcretleri üzerinde sitotoksik etkisinin olmadığı gözlenmiştir.
- Kornea epitel hcretlerinin doku iskeleleri üzerindeki adezyonu ve proliferasyonunun güçlü olduğu ve bu özelliklerin polimerin kopolimer oranına, yüklenen etkin maddeye ve kaplama ajanlarına bağlı olarak değişebildiği tespit edilmiştir. PLGA (50:50) polimerinin PLGA (75:25)' e göre daha hidrofilik yapıda olması nedeniyle yapının hidrofilisitesinin artması hcretlerin doku iskelesi üzerindeki yerleşimi ve etkileşimi üzerinde pozitif etki oluşturmuştur. Hazırlanan doku iskelesi formülasyonunun su alma kapasitesi dolayısıyla hidrofilisitesi arttıķa hcretlerin doku iskelelerinin i bölgelerine penetrasyonu kolaylaşmış ve böylece doku iskelesi üzerinde tutunan hücre sayısı ve hücre büyüme potansiyeli artmıştır. Benzer şekilde formülasyona hidrofilik bir etkin madde yüklenmesi yapının hidrofilisitesinin artmasına ve yukarıda belirtildiği şekilde hcretler üzerinde pozitif etki oluşturmasına neden olmuştur. Buna ilaveten kullanılan kaplama maddelerinin (kolajen veya poli-l-lizin) biyomimetik olarak pozitif yönde etkili olması da hcretlerin adezyonu ve proliferasyonu üzerinde pozitif yönde etki etmiştir.

Yukarıda belirtilen sonuçların ışığı altında, diğer formülasyonlara göre daha hidrofilik ve biyomimetik özelliklere sahip olması nedeniyle, kornea epitel hcretlerinin adezyonu ve proliferasyonunda daha mit verici sonuçların elde edildiği NS yüklü, kolajen veya poli-l-lizin kaplı PLGA (50:50) doku iskelesi formülasyonlarının bu tez çalışmasını takiben planlanan in vivo hayvan deneylerinde kullanılmasına karar verilmiştir. Yapılacak olan in vivo deneylerde hazırlanan

formülasyonların kornea hasarı oluşturulmuş tavşan gözüne implantasyonundan sonra etkinlik deneyleri gerçekleştirilecektir.

KAYNAKLAR

1. Robinson, J.C. (1993). Ocular Anatomy and Physiology Relevant to Ocular Drug Delivery. A.K. Mitra (Ed.). *Ophthalmic Drug Delivery Systems* (s. 29-57). New York: Marcel Dekker.
2. William R. Weimer, O.D. (t.y.). Erişim: 25 Ekim 2009, <http://www.seeweimer.com/eye-anatomy/>
3. Stjernscantz, J., Astin, M. (1993). Anatomy and Physiology of the Eye, Physiological Aspects of Ocular Drug Therapy. P. Edman (Ed.). *Biopharmaceutics of Ocular Drug Delivery* (s. 1-25). Boca Raton: CRC Press.
4. Netland, P.A. (2007). Ocular Pharmacology. P.A. Netland (Ed.). *Glaucoma Medical Therapy: Principles and Management* (s. 3-5). London: Oxford University Press.
5. The Corneoscleral Tunic. (t.y.). Erişim: 25 Ekim 2009, <http://www.education.vetmed.vt.edu/.../eye/crnscra.htm/>
6. Beuerman, R.W., Pedroza, L. (1996). Ultrastructure of the Human Cornea. *Microscopy Research and Technique*, 33(4), 320-335.
7. Song, Y., Wang, Y., Thakur, R., Meidan, M., Michniak, B. (2004). Mucosal Drug Delivery: Membranes, Methodologies and Applications. *Critical Reviews in Therapeutic Drug Carrier Systems*, 21(3), 195-256.
8. Schoenwald, R.D. (1993). Pharmacokinetics in Ocular Drug Delivery. P. Edman (Ed.). *Biopharmaceutics of Ocular Drug Delivery* (s. 159-189). Boca Raton: CRC Press.
9. Green, K. (1993). The Effects of Preservatives on Corneal Permeability of Drugs. P. Edman (Ed.). *Biopharmaceutics of Ocular Drug Delivery* (s. 43-59). Boca Raton: CRC Press.
10. Borderie, V., Touzeau, O., Bourcier, T., Laroche, L. (2005). Physiology of the Cornea. *Ophthalmologie*, 2, 103-117.
11. Huang, A.J., Tseng, S.C., Kenyon, K.R. (1989). Paracellular Permeability of Corneal and Conjunctival Epithelia. *Investigative Ophthalmology&Visual Science*, 30, 684-689.

12. Schwartz, G.S., Holland, E.J. (2005). Classification and Staging of Ocular Surface Disease. J.H. Kramer, M.J. Mannis, E.J. Holland (Ed.). *Cornea* (s.1785-1797). Philadelphia: Elsevier Inc.
13. Prevalance and Incidence of Eye Conditions. (t.y.). Erişim: 16 Aralık 2009, http://www.wrongdiagnosis.com/e/eye_conditions/prevalence.htm/
14. Tsubota, K., Tseng, S.C.G., Nordlund, M.L. (2002). Anatomy and Physiology of the Ocular Surface. E.J. Holland, M.J. Mannis (Ed.). *Ocular Surface Disease: Medical and Surgical Management*. New York: Springer-Verlag.
15. Kruse, F.E. (2002). Classification of Ocular Surface Disease. E.J. Holland, M.J. Mannis (Ed.). *Ocular Surface Disease: Medical and Surgical Management*. New York: Springer-Verlag.
16. Lindquist, T.D. (1997). Conjunctivitis: An Overview and Classification. J.H. Krachmer, M.J. Mannis, E.J. Holland (Ed.). *Cornea*. St Louis: Mosby.
17. Harry, J.Mission, G. (2001). Clinical Ophthalmic Pathology. *Principles of Diseases of the Eye and Associated Structures*. Oxford: Butterworth Heinemann.
18. Chang, J.H., Chung, H. (1993). Non-steroidal Antiinflammatory Drug and Endotoxin Induced Uveitis. *Korean Journal of Ophthalmology*, 7, 35-42.
19. Ahuja, M., Dhake, A.S., Sharma, S.K., Majumdar, D.K. (2008). Topical Ocular Delivery of NSAIDs. *AAPS Journal*, 10(2), 229-241.
20. Potten, C.S. (1978). Epithelial Proliferative Subpopulations. *Stem Cells and Tissue Homeostasis* (s. 317). Cambridge: Cambridge University Press.
21. Pellegrini, G., Traverso, C.E., Franzi, A.T. (1997). Long-term Restoration of Damaged Corneal Surfaces with Autologous Cultivated Corneal Epithelium . *Lancet*, 349, 990-993.
22. Davanger, M., Evensen, A. (1971). Role of the Pericorneal Papillary Structure in Renewal of Corneal Epithelium. *Nature*, 229, 560-561.
23. Kinoshita, S., Friend, J., Thoft, R.A. (1983). Biphasic Cell Proliferation in Transdifferentiation of Conjunctival to Corneal Epithelium in Rabbits. *Investigative Ophthalmology&Visual Science*, 24, 1008-1014.
24. Shapiro, M.S., Friend, J., Thoft, R.A. (1981). Corneal Re-epithelialization from the Conjunctiva. *Investigative Ophthalmology&Visual Science*, 21, 135-142.

25. Kinoshita, S., Kiorpes, T.C., Friend, J., Thoft, R.A. (1982). Limbal Epithelium in Ocular Surface Wound Healing. *Investigative Ophthalmology&Visual Science*, 23, 73-80.
26. Dua, H.S. (1998). The Conjunctiva in Corneal Epithelial Wound Healing. *The British Journal of Ophthalmology*, 82, 1407-1411.
27. Chang, J.H., Azar, D.T., Hernandez-Quintela, H.C. (2000). Characterization of Angiostatin in the Mouse Cornea. *Investigative Ophthalmology&Visual Science*, 41, 832.
28. Pfister, R.R., Burnstein, N. (1976). The Alkali Burned Cornea. *Experimental Eye Research*, 23, 519-535.
29. Linhart, R.W. (1978). Burns of the Eyes and Eyelids. *American Journal of Ophthalmology*, 10, 999-1000.
30. Guy, R.J. (1982). Three-Years Experience in a Regional Burn Center with Burns of the Eyes and Eye Lids. *Ophthalmic Surgery*, 13(5), 383-386.
31. Schwartz, G.S., Holland, E.J. (1998). Iatrogenic Limbal Stem Cell Deficiency. *Cornea*, 17(1), 31-37.
32. Palmon, F.E., Webster, G.F., Holland, E.J. (1997). Erythema Multiforme, Stevens-Johnson Syndrome, and Toxic Epidermal Necrolysis. Krachmer, M.J. Mannis, E.J. Holland (Ed.). *Cornea*. St Louis: Mosby.
33. Tauber, J. (2002). Autoimmune Diseases Affecting the Ocular Surface. M.J. Mannis, E.J. Holland (Ed.). *Ocular Surface Disease: Medical and Surgical Management*. New York: Springer Verlag.
34. Dohlman, C.H., Doughman, D.J. (1972). The Stevens-Johnson Syndrome. *Transactions of the New Orleans Academy of Ophthalmology*, 24, 236-252.
35. Arstikaitis, M.J. (1973). Ocular Aftermath of Stevens-Johnson Syndrome. *Archives of Ophthalmology*, 90, 376-379.
36. Mondino, B.J., Brown, S.I. (1981). Ocular Cicatricial Pemphigoid. *Ophthalmology*, 88, 95-100.
37. Holland, E.J., Schwartz, G.S. (1996). The Evolution of Epithelial Transplantation for Severe Ocular Surface Disease and a Proposed Classification System. *Cornea*, 15, 549-556.

38. Holland, E.J. (1996). Epithelial Transplantation for the Management of Severe Ocular Surface Disease. *Transactions of the American Ophthalmological Society*, 94, 677-743.
39. Chen, J.J., Tseng, S.C. (1990). Corneal Epithelial Wound Healing in Partial Limbal Deficiency. *Investigative Ophthalmology&Visual Science*, 31, 1301-1314.
40. Kim, J.S., Kim, J.C., Na, B.K. (2000). Amniotic Membrane Patching Promotes Healing and Inhibits Proteinase Activity on Wound Healing Following Acute Corneal Alkali Burn. *Experimental Eye Research*, 70, 329-337.
41. Meller, D., Tseng, S.C. (1999). Conjunctival Epithelial Cell Differentiation on Amniotic Membrane. *Investigative Ophthalmology&Visual Science*, 40, 878-886.
42. Kubo, M., Sonoda, Y., Muramatsu, R., Usui, M. (2001). Immunogenicity of Human Amniotic Membrane in Experimental Xenotransplantation. *Investigative Ophthalmology&Visual Science*, 42, 1539-1546.
43. Prabhasawat, P., Tseng, S.C. (1997). Impression Cytology Study of Epithelial Phenotype of Ocular Surface Reconstructed by Preserved Human Amniotic Membrane. *Archives of Ophthalmology*, 115, 1360-1367.
44. Nerem, R.M. (1991). Cellular Engineering. *Annals of Biomedical Engineering*, 19(5), 529-545.
45. Langer, R., Vacanti, J.P. (1993). Tissue Engineering. *Science*, 260(5110), 920-926.
46. The Emergence of Tissue Engineering as a Research Field (t.y.). Erişim: 25 Kasım 2009, www.nsf.gov/pubs/2004/nsf0450/activities.htm/
47. Gümüşderelioğlu, M. (Ekim 2007). Doku Mühendisliğinde Nanoteknoloji. *Bilim ve Teknik*, 1-3.
48. Vacanti, J.P., Langer, R. (1999). Tissue Engineering: The Design and Fabrication of Living Replacement Devices for Surgical Reconstruction and Transplantation. *Lancet*, 354, 132-134.
49. Hicks, C.R., Fitton, J.H., Chirila, T.V. (1997). Keratoprosthesis: Advancing toward a True Artificial Cornea. *Survey of Ophthalmology*, 42, 175-189.

50. Torbet, J., Malbouyres, M., Builles, N., Justin, V., Roulet, M., Damour, O. ve diğerleri. (2007). Orthogonal Scaffold of Magnetically Aligned Collagen Lamellae for Corneal Stroma Reconstruction. *Biomaterials*, 28, 4268-4276.
51. Lee, S.Y., Oh, J.H., Kim, J.C., Kim, Y.H., Kima, S.H., Choi, J.W. (2003). In Vivo Conjunctival Reconstruction Using Modified PLGA Grafts for Decreased Scar Formation and Contraction. *Biomaterials*, 24, 5049-5059.
52. Oh, J.H. (2002). In Vivo Comparison of Corneal Substitutes Using PLGA Scaffold, Type I Collagen Film, Type I Collagen Film Combined with Amniotic Membrane and Lyophilized Homologous Cornea. *Investigative Ophthalmology&Visual Science*, 43.
53. Nishida, K., Yamato, M., Hayashida, Y., Watanabe, K., Maeda, N., Watanabe, H. ve diğerleri. (2004). Functional Bioengineered Corneal Epithelial Sheet Grafts from Corneal Stem Cells Expanded Ex Vivo on A Temperature-Responsive Cell Culture Surface. *Transplantation*, 77(3), 379-385.
54. Hu, X., Lui, W., Cui, L., Wang, M., Cao, Y. (2005). Tissue Engineering of Nearly Transparent Corneal Stroma. *Tissue Engineering*, 11(11-12), 1710-1717.
55. Alaminos, M., Carmen Sanchez-Quevedo, M., Munoz-Avila, J.I., Serrano, D., Medialdea, S., Carreras, I. ve diğerleri. (2006). Construction of a Complete Rabbit Cornea Substitute Using a Fibrin-Agarose Scaffold. *Investigative Ophthalmology&Visual Science*, 47(8), 3311-3317.
56. Liu, Y., Gan, L., Carlsson, D.J., Fagerholm, P., Lagali, N., Watsky, M.A. ve diğerleri. (2006). A Simple, Cross-Linked Collagen Tissue Substitute for Corneal Implantation. *Investigative Ophthalmology&Visual Science*, 47(5), 1869-1875.
57. Freyman, T.M., Yannas, I.V., Gibson, L.J. (2001). Cellular Materials as Porous Scaffolds for Tissue Engineering. *Progress in Material Science*, 46, 273-282.
58. Chen, G., Ushida, T., Tateishi, T. (2001). Development of Biodegradable Porous Scaffolds for Tissue Engineering. *Material Science Engineering*, 17, 63-69.
59. Mikos, A.G., Temenoff, J.S. (2000). Formation of Highly Porous Biodegradable Scaffolds for Tissue Engineering. *Journal of Biotechnology*, 3(2), 114-119.
60. Uttarwar, M., Aswath, P. (2008). Fabrication of Porous, Drug-Releasing, Biodegradable Polymer Scaffolds for Sustained Drug Release. *Journal of Biomedical Materials Research B: Applied Biomaterials*, 87, 121-131.

61. Pillai, O., Panchagnula, R. (2001). Polymers in Drug Delivery. *Current Opinion in Chemical Biology*, 5, 447-451.
62. Pişkin, E. (1998). Polymer Based Drug Delivery Systems. A.A. Hıncal, S. Kaş (Ed.). *Biomedical Science and Technology* (s. 1-16). New York: Plenum Press.
63. Jalil, R., Nixon, J.R. (1990). Biodegradable Poly(Lactic Acid) and Poly(Lactide-co-Glycolide) Microcapsules: Problems Associated with Preparative Techniques and Release Properties. *Journal of Microencapsulation*, 7(3), 297-325.
64. Wu, X. (1995). Synthesis and Properties of Biodegradable Lactic/Glycolic Acid Polymers. R. Wise (Ed.). *Encyclopedic Handbook of Biomaterials and Bioengineering* (s. 1015-1054). New York: Marcel Dekker.
65. Lewis, D. (1990). Controlled Release of Bioactive Agents from Lactide/Glycolide Polymers. M. Chasin, R. Langer (Ed.). *Biodegradable Polymers as Drug Delivery Systems* (s. 1-41). New York: Marcel Dekker.
66. Tice, T. (1984). Biodegradable Controlled-Release Parenteral Systems. *Pharmaceutical Technology*, 11, 26-35.
67. Loo, S.C.J., Chui, P.O., Yin, C.F.B. (2004). Radiation Effects on Poly(Lactide-co-Glycolide) (PLGA) and Poly(L-Lactide) (PLLA). *Polymer Degradation and Stability*, 83, 259-265.
68. Mundargi, R.C., Babu, V.R., Rangaswamy, V., Patel, P., Aminabhavi, T.M. (2008). Nano/Micro Technologies for Delivering Macromolecular Therapeutics Using Poly(D,L-Lactide-Co-Glycolide) and Its Derivatives. *Journal of Controlled Release*, 125(3), 193-209.
69. Gilding, D., Reed, A. (1979). Biodegradable Polymers for Use in Surgery-Poly(Glycolic)/Poly(Lactic Acid) Homo and Copolymers. *Polymer*, 20(12), 1459-1464.
70. Jamshidi, K., Hyon, S., Ikada, Y. (1988). Thermal Characterization of Polylactides. *Polymer*, 29(12), 2229-2234.
71. Raghuvanshi, R., Singh, M., Talwar, G. (1993). Biodegradable Delivery System for Single Step Immunization with Tetanus Toxoid. *Journal of Pharmaceutics*, 93(1-3), 1-5.
72. Brinckmann, J. (2005). Collagens at a Glance. *Topics in Current Chemistry*, 247, 1-6.

73. Veit, G., Kobbe, B., Keene, D.R., Paulsson, M., Koch, M., Wagener, R. (2006). Collagen XXVIII, A Novel Von Willebrand Factor a Domain-Containing Protein with Many Imperfections in the Collagenous Domain. *Journal of Biological Chemistry*, 281, 3494-3504.
74. Gümüşderelioğlu, M. (Temmuz 2002). Biyomalzemeler. Bilim ve Teknik, 10.
75. Collagen. (t.y.). Erişim: 23 Kasım 2009, <https://.../Collagen+-+B-+rgam/>
76. Shoulders, M.D., Raines, R.T. (2009). Collagen Structure and Stability. *Annual Review of Biochemistry*, 78, 929-958.
77. Piez, K.A. (1985). Collagen. J.I. Kroschwitz (Ed.). *Encyclopedia of Polymer Science and Engineering* (s. 699-727). New York: Wiley.
78. Kucharz, E.J. (1992). *The Collagens: Biochemistry and Pathophysiology* (s. 7-29.). Berlin: Springer-Verlag.
79. Cawston, T.E., Murphy, G. (1981). Mammalian Collagenases. L. Lorand (Ed.). *Methods in Enzymology* (s. 711-722). London: Academic Press.
80. Stricklin, G.P., Hibbs, M.S. (1988). Biochemistry and Physiology of Mammalian Collagenases. M.E. Nimni (Ed.). *Collagen* (s. 187-206). Boca Raton: CRC Press.
81. Welgus, H.G., Jeffrey, J.J., Stricklin, G.P., Roswit, W.T., Eisen, A.Z. (1980). Characteristics of the Action of Human Skin Fibroblast Collagenase on Fibrillar Collagen. *Journal of Biological Chemistry*, 255, 6806-6813.
82. Hunt, J.A., Van der Laan, J.S., Schakenraad, J., Williams, D.F. (1993). Quantitative In Vivo Assessment of the Tissue Response to Dermal Sheep Collagen in Abdominal Wall Defects. *Biomaterials*, 15, 378-382.
83. Dung, S.Z., Li, Y., Dunioace, A.J., Stookey, G.K. (1994). Degradation of Insoluble Bovine Collagen and Human Dentine Collagen Pretreated In Vitro with Lactic Acid, pH 4.0 and 5.5. *Archives of Oral Biology*, 39, 901-905.
84. Kincl, F.A., Ciaccio, L.A. (1980). Supression of Immun Responses by Progesterone. *Endocrinologia Experimentalis*, 14, 27-33.
85. Spira, M., Liu, B., Xu, Z., Harrell, R., Chahadeh, H. (1994). Human Amnion Collagen for Soft Tissue Augmentation-Biochemical Characterizations and Animal Observations. *Journal of Biomedical Materials Research*, 28, 91-96.

86. Chvapil, M., Kronenthal, R.L., Van Winkle, W. (1973). Medical and Surgical Applications of Collagen. D.A. Hall, D.S. Jackson (Ed.). *International Connective Tissue Research* (s. 1-61). New York: Academic Press.
87. Gorham, S.D. (1991). Collagen. D. Byrom (Ed.). *Biomaterials* (s. 55-122). New York: Stockton Press.
88. Fu Lu, M.Y., Thies, C. (1991). Collagen-based drug delivery devices. P. Tarche (Ed.). *Polymers for Controlled Drug Delivery* (s. 149-161). Boca Raton: CRC Press.
89. Nakanishi, Y., Chen, G., Komuro, H., Ushida, T., Kaneko, S., Tateishi, T. ve diğ erleri. (2003). Tissue-Engineered Urinary Bladder Wall Using PLGA Mesh-Collagen Hybrid Scaffolds: A Comparison Study of Collagen Sponge and Gel as a Scaffold. *Journal of Pediatric Surgery*, 38(12), 1781-1784.
90. Shao, H.J., Chen, C.S., Lee, I.C., Wang, J.H., Young, T.H. (2009). Designing a Three-dimensional Expanded Polytetrafluoroethylene–Poly(lactic-co-glycolic acid) Scaffold for Tissue Engineering. *Artificial Organs*, 33(4), 309-317.
91. Bloomfield, S.E., Miyata, T., Dunn, M.W., Bueser, N., Stenzel, K.H., Rubin, A.L. (1978). Soluble Gentamicin Ophthalmic Inserts as a Drug Delivery System. *Ophthalmology*, 96-885-887.
92. Rubin, A.L., Stenzel, K.H., Miyata, T., White, M.J., Dunn, M. (1973). Collagen as a Vehicle for Drug Delivery. *Journal of Clinical Pharmacology*, 17, 309-312.
93. Punch, P.I., Costa, N.D., Edwards, M.E., Wilcox, G.E. (1987). The Release of Insoluble Antibiotics from Collagen Ocular Inserts In Vitro and Their Insertion into the Conjunctival Sac of Cattle. *Journal of Veterinary Pharmacology and Therapeutics*, 10, 37–42.
94. Poland, D.E., Kaufman, H.E. (1988). Clinical Uses of Collagen Shields. *Journal of Cataract Refractive Surgery*, 14, 489-491.
95. Robin, J.B., Keys, C.L., Kaminski, L.A., Viana, M.A. (1990). The Effect of Collagen Shields on Rabbit Corneal Reepithelialization after Chemical Debridement. *Investigative Ophthalmology&Visual Science*, 31, 1294–1300.
96. Shaker, G.J., Ueda, S., LoCascio, J.A., Aquavella, J.V. (1989). Effect of Collagen Shield on Cat Corneal Epithelial Wound Healing. *Investigative Ophthalmology&Visual Science*, 30, 1565-1568.

97. Marmer, R.H. (1988). Therapeutic and Protective Properties of the Corneal Collagen Shield. *Journal of Cataract Refractive Surgery*, 14, 496-499.
98. Weissman, B.A., Lee, D.A. (1988). Oxygen Transmissibility, Thickness, and Water Content of Three Types of Collagen Shields. *Archives of Ophthalmology*, 106, 1706-1708.
99. Kaufman, H.E. (1988). Collagen Shield Symposium. *Journal of Cataract Refractive Surgery*, 14, 487-488.
100. Friedberg, M.L., Pleyer, U., Mondino, B.J. (1991). Device Drug Delivery to the Eye: Collagen Shields, Iontophoresis, and Pumps. *Ophthalmology*, 98, 725-732.
101. Palmer, R.M., McDonald, M.B. (1995). A Corneal Lens/Shield System to Promote Postoperative Corneal Epithelial Healing. *Journal of Cataract Refractive Surgery*, 21, 125-126.
102. Milani, J.K., Verbukh, I., Pleyer, U., Sumner, H., Adamu, S.A., Halabi, H.P. ve diğ erleri. (1993). Collagen Shields Impregnated with Gentamicin-Dexamethasone as a Potential Drug Delivery Device. *American Journal of Ophthalmology*, 116, 622-627.
103. Gebhardt, B.M., Kaufman, H.E. (1995). Collagen as a Delivery System for Hydrophobic Drugs: Studies with Cyclosporine. *Journal of Ocular Pharmacology and Therapeutics*, 11, 319-327.
104. Gebhardt, B.M., Varnell, E.D., Kaufman, H.E. (1995). Cyclosporine in Collagen Particles: Corneal Penetration and Suppression of Allograft Rejection. *Journal of Ocular Pharmacology and Therapeutics*, 11, 509-517.
105. Fu, C.R., Shek, E., Fleitman, J.S., Leung, M.E. (1990). Collagen Containing Ophthalmic Formulation, Eur. Patent No. 19900119626.
106. Sutton, R., Yu, N., Luck, E., Brown D., Conley, F. (1990). Reduction of Vinblastine Neurotoxicity in Mice Utilizing a Collagen Matrix Carrier. *Selective Cancer Therapeutics*, 6, 35-49.
107. Davidson, B.S., Izzo, F., Cromeens, D.M., Stephens, L.C., Siddik Z.H., Curley, S.A. (1995). Collagen Matrix Cisplatin Prevents Local Tumor Growth after Margin-Positive Resection. *The Journal of Surgical Research*, 58, 618-624.

- 108.Kanekal, S., Sahai, A., Jones, R.E., Brown, D. (1995). Enhanced Retention of ^{195m}Pt-Cisplatin in Murine Tumors with a Novel Injectable Sustained-Release Drug Delivery System. *Pharmaceutical Research*, 12, 228.
- 109.Becker, P.L. Smith, R.A. Williams, R.S., Dutkowsky, J.P. (1994). Comparison of Antibiotic Release from Polymethylmethacrylate Beads and Sponge Collagen. *Journal of Orthopaedic Research*, 12, 737-741.
- 110.Stemberger, A., Grimm, H. Bader, F. Rahn, H.D. Ascherl, R. (1997). Local Treatment of Bone and Soft Tissue Infections with the Collagen-Gentamicin Sponge. *The European Journal of Surgery*, 163(578), 17-26.
- 111.Rushton, N. (1997). Applications of Local Antibiotic Therapy. *The European Journal of Surgery* 163(578), 27-30.
- 112.Firsov, A.A., Nazarov, A.D., Fomina, I.P. (1987). Biodegradable Implants Containing Gentamicin: Drug Release and Pharmacokinetics. *Drug Development and Industrial Pharmacy*, 13, 1651-1674.
- 113.Jorgensen, L., Sorensen, T. Lorentzen, J. (1991). Clinical and Pharmacokinetic Evaluation of Gentamicin Coating Collagen in Groin Wound Infections after Vascular Reconstruction. *European Journal of Vascular Surgery*, 5, 87-91.
- 114.Wachol-Drewek, Z., Pfeiffer, M., Scholl, E. (1996). Comparative Investigation of Drug Delivery of Collagen Implants Saturated in Antibiotic Solutions and a Sponge Containing Gentamicin. *Biomaterials*, 17, 1733-1738.
- 115.Cascone, M.C., Sim, B., Downes, S. (1995). Blends of Synthetic and Natural Polymers as Drug Delivery Systems for Growth Hormone. *Biomaterials* 16, 569-574.
- 116.Rössler, B., Kreuter, J., Scherer, D. (1995). Collagen Microparticles: Preparation and Properties. *Journal of Microencapsulation*, 12, 49-57.
- 117.Rössler, B., Kreuter, J., Ross, G. (1994). Effect of Collagen Microparticles on the Stability of Retinol and Its Absorption into Hairless Mouse Skin In Vitro. *Pharmazie*, 49, 175-179.
- 118.Ogawa, Y., Arikawa, Y., Kida, T., Akashi, M. (2008). Fabrication of Novel Layer-by-Layer Assembly Films Composed of Poly(lactic acid) and Polylysine through Cation-Dipole Interactions. *Langmuir*, 24, 8606-8609.

119. Shima, S., Sakai, H. (1981). Poly-l-lysine Produced by Streptomyces. Part III. Chemical Studies. *Agricultural and Biological Chemistry*, 45, 2503-2508.
120. Shima, S., Sakai, H. (1981). Poly-l-lysine Produced by Streptomyces. Part II. Taxonomy and Fermentation Studies. *Agricultural and Biological Chemistry*, 45, 2497-2502.
121. Hiraki, J. (2000). Polylysine, Its Development and Utilization. *Fine Chemicals*, 29, 18-25.
122. Itzhaki, F.R. (1972). Colorimetric Method for Estimating Polylysine and Polyarginine. *Analytical Biochemistry*, 50, 569-574.
123. Kito, M., Onji, Y., Yoshida, T., Nagasawa, T. (2002). Occurrence of Poly-l lysine Degrading Enzyme in Poly-l-lysine Tolerant Sphingobacterium Multivorum OJ10, Purification and Characterization. *FEMS Microbiology Letters*, 207, 147-151.
124. Kito, M., Takimoto, R., Yoshida, T., Nagasawa, T. (2002). Purification and Characterization of Poly-l-lysine Degrading Enzyme from an Poly-l-lysine Producing Strain Streptomyces Albulus. *Archives of Microbiology*, 178, 325-330.
125. Kito, M., Yoshida, T., Nagasawa, T. (2002). Cloning and Analysis of the Gene for Poly-l-lysine Degrading Enzyme of an Poly-l-lysine Producing Streptomyces Albulus. *Annual Meeting Society Bioscience Biotechnology Biochemistry*, 2002, 208.
126. Nishikawa, M., Ogawa, K. (2002). Antimicrobial Activity of a Chelatable Poly(Arginyl-Histidine) Produced by the Ergot Fungus Verticillium Kibiense. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 68, 3575.
127. Hiraki, J. (2002). Production of Epsilon-Polylysine in an Airlift Bioreactor (ABR). *Journal of Bioscience and Bioengineering*, 93(3), 274-280.
128. Hiraki, J., Ichikawa, T., Ninomiya, S., Seki, H., Uohama, K., Kimura, S., Yanagimoto, Y., Barnett, J. W. (2003). Use of ADME Studies to Confirm the Safety of Epsilon-Polylysine as a Preservative in Food. *Regulatory Toxicology and Pharmacology*, 37, 328.
129. Zheng, Z., Zhang, L., Kong, L., Wang, A., Gong, Y., Zhang, X. (2009). The Behavior of MC3T3-E1 Cells on Chitosan/Poly-L-Lysine Composite Films:

- Effect of Nanotopography, Surface Chemistry, and Wettability. *Journal of Biomedical Materials Research*, 89A, 453-465.
130. Tryoen-Toth, P., Vautier, D., Haikel, Y., Voegel, J.C., Schaaf, P., Chluba, J. (2002). Viability, Adhesion, and Bone Phenotype of Osteoblast-Like Cells on Polyelectrolyte Multilayer Films. *Journal of Biomedical Materials Research*, 60, 657-667.
 131. Daubiné, F., Cortial, D., Ladam, G., Atmani, H., Haikel, Y., Voegel, J.C. ve diğerleri. (2009). Nanostructured Polyelectrolyte Multilayer Drug Delivery Systems for Bone Metastasis Prevention. *Biomaterials*, 30(31), 6367-6373.
 132. Kaneshiro, T.L., Lu, Z.R. (2009). Targeted Intracellular Codelivery of Chemotherapeutics and Nucleic Acid with a Well-Defined Dendrimer-Based Nanoglobular Carrier. *Biomaterials*, 30(29), 5660-5666.
 133. Fox, M.E., Guillaudeu, S., Jerger, K., Macaraeg N., Szoka, F.C. (2009). Synthesis and In Vivo Antitumor Efficacy of PEGylated Poly(L-lysine) Dendrimer-Camptothecin Conjugates. *Molecular Pharmaceutics*, 6(5), 1562-1572.
 134. Sugao, Y., Watanabe, K., Higuchi, Y., Kurihara, R., Kawakami, S., Hashida, M. ve diğerleri. (2009). NF κ B Decoy Delivery Using Dendritic Poly(L-lysine) for Treatment of Endotoxin-Induced Hepatitis in Mice. *Bioorganic and Medicinal Chemistry*, 17(14), 4990-4995.
 135. Oh, K.T., Oh, Y.T., Oh, N.M., Kim, K., Lee, D.H., Lee, E.S. (2009). A Smart Flower-Like Polymeric Micelle for pH-Triggered Anticancer Drug Release. *International Journal of Pharmaceutics*, 375(1-2), 163-169.
 136. Kaminskis, L.M., Kelly, B.D., McLeod, V.M., Boyd, B.J., Krippner, G.Y., Williams, E.D. ve diğerleri. (2009). Pharmacokinetics and Tumor Disposition of PEGylated, Methotrexate Conjugated Poly-L-lysine Dendrimers. *Molecular Pharmaceutics*, 6(4), 1190-1204.
 137. Crouzier, T., Ren, K., Nicolas, C., Roy, C., Picart, C. (2009). Layer-by-Layer Films as a Biomimetic Reservoir for rhBMP-2 Delivery: Controlled Differentiation of Myoblasts to Osteoblasts, *Small*, 5(5), 598-608.
 138. Bilensoy, E., Sarisozen, C., Esendağlı, G., Doğan, A.L., Aktaş, Y., Şen, M. (2009). Intravesical Cationic Nanoparticles of Chitosan and Polycaprolactone for

- the Delivery of Mitomycin C to Bladder Tumors. *International Journal of Pharmaceutics*, 371(1-2), 170-176.
- 139.Li, L., Nie, Y., Zhu, R., Shi, S., Luo, K., He, B. ve diğerleri. (2008). Preparation and Gene Delivery of Alkaline Amino Acids-Based Cationic Liposomes. *Archives of Pharmacal Research*, 31(7), 924-931.
 - 140.Park, J.S., Park, K., Woo, D.G., Yang, H.N., Chung, H.M., Park, K.H. (2008). PLGA Microsphere Construct Coated with TGF- β 3 Loaded Nanoparticles for Neocartilage Formation. *Biomacromolecules*, 9(8), 2162-2169.
 - 141.Sugisaki, K., Usui, T., Nishiyama, N., Jang, W.D., Yanagi, Y., Yamagami, S. (2008). Photodynamic Therapy for Corneal Neovascularization Using Polymeric Micelles Encapsulating Dendrimer Porphyrins. *Investigative Ophthalmology and Visual Science*, 49, 894-899.
 - 142.Inoue, Y., Kurihara, R., Tsuchida, A., Hasegawa, M., Nagashima, T., Mori, T. ve diğerleri. (2008). Efficient Delivery of siRNA Using Dendritic Poly(L-lysine) for Loss-of-Function Analysis. *Journal of Controlled Release*, 126(1), 59-66.
 - 143.Huang, M., Vitharana, S.N., Peek, L.J., Coop, T., Berkland, C. (2007). Polyelectrolyte Complexes Stabilize and Controllably Release Vascular Endothelial Growth Factor. *Biomacromolecules*, 8(5), 1607-1614.
 - 144.Layman, H., Spiga, M.G., Brooks, T., Pham, S., Webster, K.A., Andreopoulos, F.M. (2007). The Effect of the Controlled Release of Basic Fibroblast Growth Factor from Ionic Gelatin-Based Hydrogels on Angiogenesis in a Murine Critical Limb Ischemic Model. *Biomaterials*, 28(16), 2646-2654.
 - 145.Mikos, A.G., Temenoff, J.S. (2000). Formation of Highly Porous Biodegradable Scaffolds for Tissue Engineering. *Electronic Journal of Biotechnology*, 3(2), 1-6.
 - 146.Mikos, A.G., Bao, Y., Cima, L.G., Ingber, D.E., Vacanti, J.P., Langer, R. (1993). Preparation of Poly(Glycolic Acid) Bonded Fiber Structures for Cell Attachment and Transplantation. *Journal of Biomedical Materials Research*, 27, 183-189.
 - 147.Mooney, D.J., Mazzoni, C.L., Breuer, C., McNamara, K., Hern, D., Vacanti, J.P. (1996). Stabilized Polyglycolic Acid Fiber-Based Tubes for Tissue Engineering. *Biomaterials*, 17, 115-124.

148. Mikos, A.G., Thorsen, A.J., Czerwonka, L.A., Bao, Y., Langer, R., Winslow, D.N. (1994). Preparation and Characterization of Poly(L-Lactic Acid) Foams. *Polymer*, 35, 1068-1077.
149. Mikos, A.G., Sarakinos, G., Leite, S.M., Vacanti, J.P., Langer, R. (1993). Laminated Three-Dimensional Biodegradable Foams for Use in Tissue Engineering. *Biomaterials*, 14, 323-330.
150. Lhommeau, C., Levene, H., Abramson, S., Kohn, J. (1998). Preparation of Highly Interconnected Porous Tyrosine-Derived Polycarbonate Scaffolds. *Tissue Engineering*, 4, 468.
151. Cai, Z., Cheng, G. (2003). Novel Method to Produce Poly(3-Hydroxybutyrate) Scaffolds with Controlled Multi-Pore Size. *Journal of Materials Science Letters*, 22(2), 153-155.
152. Leong, K.F., Cheah, C.M., Chua, C.K. (2003). Solid Freeform Fabrication of Three-Dimensional Scaffolds for Engineering Replacement Tissues and Organs. *Biomaterials*, 24(13), 2363-2378.
153. Oh, S.H., Kang, S.G., Lee, J.H. (2006). Degradation Behavior of Hydrophilized PLGA Scaffolds Prepared by Melt-Molding Particulate-Leaching Method: Comparison with Control Hydrophobic One. *Journal of Materials Science: Materials in Medicine*, 17(2), 131-137.
154. Oh, S.H., Kang, S.G., Kim, E.S., Cho, S.H., Lee, J.H. (2003). Fabrication and Characterization of Hydrophilic Poly(Lactic-Co-Glycolic Acid)/Poly(Vinyl Alcohol) Blend Cell Scaffolds by Melt-Molding Particulate-Leaching Method. *Biomaterials*, 24(22), 4011-4021.
155. Washburn, N.R., Simon, C.G. (2006). Co-Extrusion of Biocompatible Polymers for Scaffolds With Co-Continuous Morphology. *Journal of Biomedical Materials Research*, 60(1), 20-29.
156. Yang, H.Y., Thompson, I., Yang, S.F., Chi, X.P., Evans, J.R.G., Cook, R.J. (2008). Dissolution Characteristics of Extrusion Freeformed Hydroxyapatite/Tricalcium Phosphate Scaffolds. *Journal of Materials Science: Materials in Medicine*, 19(11), 3345-3353.

157. Mooney, D.J., Baldwin, D.F., Suh, N.P., Vacanti, J.P., Langer, R. (1996). Novel Approach to Fabricate Porous Sponges of Poly(D,L-Lactid-Co-Glycolic Acid) without the Use of Organic Solvents. *Biomaterials*, 17, 1417-1422.
158. Lo, H., Kadiyala, S., Guggiona, S.E., Leong, K.W. (1996). Poly(L-Lactic Acid) Foams with Cell Seeding and Controlled-Release Capacity. *Journal of Biomedical Materials Research*, 30, 475-484.
159. Lo, H., Ponticiello, M.S, Leong, K.W. (1995). Fabrication of Controlled Release Biodegradable Foams by Phase Separation. *Tissue Engineering*, 1, 15-28.
160. Nam, Y.S., Park, T.G., (1999). Biodegradable Polymeric Microcellular Foams by Modified Thermally Induced Phase Separation Method. *Biomaterials*, 20, 1783-1790.
161. Nam, Y.S., Park, T.G. (1999). Porous Biodegradable Polymeric Scaffolds Prepared by Thermally Induced Phase Separation. *Journal of Biomedical Materials Research*, 47, 8-17.
162. Nanofibrous Matrices For Tissue Engineering. (t.y.). Erişim: 28 Kasım 2009, <http://www.eng.nus.edu.sg/EResnews/0506/rd/rd7.html/>
163. Ifkovits, J.L., Sundararaghavan, H.G., Burdick, J.A. (2009). Electrospinning Fibrous Polymer Scaffolds for Tissue Engineering and Cell Culture. *Journal of Visualized Experiments*, 32, 1589.
164. McClure, M.J., Sell, S.A., Ayres, C.E., Simpson, D.G., Bowlin, G.L. (2009). Electrospinning-Aligned and Random Polydioxanone-Polycaprolactone-Silk Fibroin-Blended Scaffolds: Geometry for a Vascular Matrix, 4(5), 55010.
165. Lanza, R.P., Langer, R., Vacanti, J. (2000). *Principles of Tissue Engineering Second Edition*. San Diego: Academic Press.
166. O'Brien, F.J., Harley, B.A., Yannas, I.V., Gibson, L.J. (2005). The Effect of Pore Size on Cell Adhesion in Collagen-GAG Scaffolds. *Biomaterials*, 26(4), 433-441.
167. Huiyong, Z., Qiuliang, W., Jianzhong, S., Huiming, W., Yingqian, H., Kangjie, Z. ve diğerleri. (2005). Release Behavior and Biological Activity of Recombinant Human Bone Morphogenetic Protein-2 from Porous PLGA Scaffold. *Journal of Bioactive and Compatible Polymers*, 20, 270-278.

- 168.Healy, K.E.,Whang, K., Thomas, C.H. (1998). Method of Fabricating Emulsion Freeze-Dried Scaffold Bodies and Resulting Products, U.S. Patent No. 5723508, Evanston: Northwestern University.
- 169.Radev, B.R., Kase, J.A., Askew, M.J., Weiner, S.D. (2009). Potential for Thermal Damage to Articular Cartilage by PMMA Reconstruction of a Bone Cavity Following Tumor Excision: A Finite Element Study. *Journal of Biomechanics*, 42(8), 1120-1126.
- 170.Hasirci, V., Litman, A.E., Trantolo, D.J., Gresser, J.D., Wise, D.L., Margolis, H.C. (2002). PLGA Bone Plates Reinforced with Crosslinked PPF. *Journal of Materials Science. Materials in Medicine*, 13(2), 159-167.
- 171.Leong, K.F., Cheah, C.M., Chua, C.K. (2003). Solid Freeform Fabrication of Three-Dimensional Scaffolds for Engineering Replacement Tissues and Organs. *Biomaterials*, 24(13), 2363-2378.
- 172.Salmoria, G.V., Ahrens, C.H., Klauss, P., Paggi, R.A., Oliveira, R.G., Lago, A. (2007). Rapid Manufacturing of Polyethylene Parts with Controlled Pore Size Gradients Using Selective Laser Sintering. *Materials Research*, 10(2).
- 173.Novel Platform Scaffolds Technology for Tissue Engineering. (t.y.). Erişim: 28 Kasım 2009, [http:// www.eng.nus.edu.sg/research/2004/2004C3_044.htm/](http://www.eng.nus.edu.sg/research/2004/2004C3_044.htm/)
- 174.Lee, K.W., Wang, S., Fox, B.C., Ritman, E.L., Yaszemski, M.J., Lu, L. (2007). Poly(Propylene Fumarate) Bone Tissue Engineering Scaffold Fabrication Using Stereolithography: Effects of Resin Formulations and Laser Parameters. *Biomacromolecules*, 8(4), 1077-1084.
- 175.Lee, J.W., Lan, P.X., Kim, B., Lim, G., Cho, D.W. (2008). Fabrication and Characteristic Analysis of a Poly(Propylene Fumarate) Scaffold Using Micro-Stereolithography Technology. *Journal of Biomedical Materials Research: Applied Biomaterials*, 87(1), 1-9.
- 176.Development of Extended - Lifetime Organic - Inorganic Scaffolds for Orthopaedical Applications. (t.y.). Erişim: 28 Kasım 2009, [http:// materiales.unex.es/.../lineas/MarieCurie.html/](http://materiales.unex.es/.../lineas/MarieCurie.html/)
- 177.Mariani, M., Rosatini, F., Vozzi, G., Previti, A., Ahluwalia, A. (2006). Characterization of Tissue-Engineered Scaffolds Microfabricated with PAM. *Tissue Engineering*, 12(3), 547-557.

- 178.Kullenberg, J., Rosatini, F., Vozzi, G., Bianchi, F., Ahluwalia, A., Domenici, C. (2008). Optimization of PAM Scaffolds for Neural Tissue Engineering: Preliminary Study on an SH-SY5Y Cell Line. *Tissue Engineering Part A*, 14(6), 1017-1023.
- 179.Tissue Engineering Scaffold Fabrication. (t.y.). Erişim: 28 Kasım 2009, <http://www-bioc.rice.edu/bios576/scaffolds/Scaffolds.htm/>
- 180.Germain, L., Auger, F.A., Grandbois, E., Guignard, R., Giasson, M., Boisjoly, H. ve diğerleri. (1999). Reconstructed Human Cornea Produced In Vitro by Tissue Engineering. *Pathobiology*, 67(3), 140-147.
- 181.Griffith, M., Osborne, R., Munger, R., Xiong, X., Doillon, C.J., Laycock, N.L., ve diğerleri. (1999). Functional Human Corneal Equivalents Constructed from Cell Lines. *Science*, 286(5447), 2169-2172.
- 182.Builles, N., Bechetoille, N., Justin, V., Andre, V., Barbaro, V., Iorio, E.D. ve diğerleri. (2007). Development of a Hemicornea from Human Primary Cell Cultures for Pharmacotoxicology Testing. *Cell Biology and Toxicology*, 23(4), 279-292.
- 183.Denkbaş, E.B., Seyyal, M., Pişkin, E. (2000). Implantable 5-Fluorouracil Loaded Chitosan Scaffolds Prepared by Wet Spinning. *Journal of Membrane Science*, 172(1-2), 33-38.
- 184.Wang, Y., Liu, X.C., Zhao, J., Kong, X.R., Shi, R.F., Zhao, X.B. ve diğerleri. (2009). Degradable PLGA Scaffolds with Basic Fibroblast Growth Factor. *Texas Heart Institute Journal*, 36(2), 89-97.
- 185.Yilgor, P., Tuzlakoglu, K., Reis, R.L., Hasirci, N., Hasirci, V. (2009). Incorporation of a Sequential BMP-2/BMP-7 Delivery System into Chitosan-Based Scaffolds for Bone Tissue Engineering. *Biomaterials*, 30, 3551-3559.
- 186.Kim, K., Luu, Y.K., Dufei, F., Chang, C., Fang, D., Hsiao, B.S. ve diğerleri. (2004). Incorporation and Controlled Release of a Hydrophilic Antibiotic Using Poly(Lactide-Co-Glycolide)-Based Electrospun Nanofibrous Scaffolds. *Journal of Controlled Release*, 98, 47-56.
- 187.Teng, S.H., Lee, E.J., Wang, P., Jun, S.H., Han, C.M., Kim, H.E. (2009). Functionally Gradient Chitosan/Hydroxyapatite Composite Scaffolds for

- Controlled Drug Release. *Journal of Biomedical Materials Research Part B: Applied Biomaterials*, 90B, 275–282.
188. Shi, X., Wang, Y., Ren, L., Zhao, N., Gong, Y., Wang, D.A. (2009). Novel Mesoporous Silica-Based Antibiotic Releasing Scaffold for Bone Repair. *Acta Biomaterialia*, 5, 1697–1707.
 189. Cantón, I., Mckean, R., Charnley, M., Blackwood, K.A., Fiorica, C., Ryan, A.J., Macneil, S. (2009). Development of an Ibuprofen Releasing Biodegradable PLA/PGA Electrospun Scaffold for Tissue Regeneration. *Biotechnology and Bioengineering*, Article in Press.
 190. Prabaharana, M., Jayakumar, R. (2009). Chitosan-Graft-B-Cyclodextrin Scaffolds with Controlled Drug Release Capability for Tissue Engineering Applications. *International Journal of Biological Macromolecules*, 44, 320-325.
 191. Tıǧlı, R.S., Akman, A.C., Gümüşderelioǧlu, M., Nohutçu, R.M. (2009). In Vitro Release of Dexamethasone or bFGF from Chitosan/Hydroxyapatite Scaffolds. *Journal of Biomaterials Science Polymer Edition*, 20(13), 1899-1914.
 192. Kim, H., Kim, H.W., Suh, H. (2003). Sustained Release of Ascorbate-2-Phosphate and Dexamethasone from Porous PLGA Scaffolds for Bone Tissue Engineering Using Mesenchymal Stem Cells. *Biomaterials*, 24, 4671-4679.
 193. Lia, B., Davidson, J.M., Guelcher, S.A. (2009). The Effect of the Local Delivery of Platelet-Derived Growth Factor from Reactive Two-Component Polyurethane Scaffolds on the Healing in Rat Skin Excisional Wounds. *Biomaterials*, 30, 3486-3494.
 194. Badylak, S.F., Freytes, D.O., Gilbert, T.W. (2009). Extracellular Matrix as a Biological Scaffold Material: Structure and Function. *Acta Biomaterialia*, 5, 1-13.
 195. Development of Biodegradable Scaffold for Dermo-Epidermal Skin Grafts. (t.y.). Erişim: 30 Kasım 2009, http://www.biomateria.com/bio_skin_3.htm/
 196. Freshney, R.I. (1994). *Culture of Animal Cells*. New York: Wiley-Liss Inc.
 197. Harrison, R. (1907). Observations on the Living Developing Nerve Fiber. *Proceedings of the Society for Experimental Biology and Medicine*, 4, 140-143.
 198. Carrel, A. (1912). On the Permanent Life of Tissues Outside of the Organism. *Journal of Experimental Medicine*, 15, 516-528.

- 199.Sanford, K., Earle, W., Likely, G. (1948). The Growth In Vitro of Single Isolated Tissue Cells. *Journal of the National Cancer Institute*, 9, 229-246.
- 200.Eagle, H.(1955). Nutrition Needs of Mammalian Cells in Tissue Culture. *Science*, 122, 501-504.
- 201.Waymouth, C. (1981). Major Ions, Buffer Systems, pH, Osmolality and Water Quality. C. Waymouth, R. Ham, P. Chapple (Ed.). *The Growth Requirements of Vertebrate Cells In Vitro* (s. 105-117). New York: Cambridge University Press.
- 202.Mather, J.P., Roberts, P.E. (1998). *Introduction to Cell and Tissue Culture*. New York: Plenum Press.
- 203.Rosenfeld, M.A., Yoshimura, K., Trapnell, B.C., Yoneyama, K. (1992). In Vivo Transfer of the Human Cystic Fibrosis Transmembrane Conductance Regulator Gene to the Airway Epithelium. *Cell*, 68, 143-155.
- 204.Snyder, E.Y., Deitcher, D.L, Walsh, C., Arnold-Aldea, S., Hartweig, E.A., Cepko, C.L. (1992). Multipotent Cell Lines Can Engraft and Participate in Development of Mouse Cerebellum. *Cell*, 68, 33-51.
- 205.Maniatis, T.,Hardison, R.C., Lacy, E., Lauer, J., O'Connel, C., Quon, D. (1978). The Isolation of Structural Genes from Libraries of Eukaryotic DNA. *Cell*, 15, 687-701.
- 206.Grueterich, M., Espana, E.M., Touhami, A. (2002). Phenotypic Study of a Case with Successful Transplantation of Ex Vivo Expanded Human Limbal Epithelium for Unilateral Total Limbal Stem Cell Deficiency. *Ophthalmology*, 109, 1547-1552.
- 207.Koizumi, N., Inatomi, T., Suzuki, T. (2001). Cultivated Corneal Epithelial Stem Cell Transplantation in Ocular Surface Disorders. *Ophthalmology*, 108, 1569-1574.
- 208.Koizumi, N., Inatomi, T., Suzuki, T. (2001). Cultivated Corneal Epithelial Transplantation for Ocular Surface Reconstruction in Acute Phase of Stevens-Johnson Syndrome. *Archives of Ophthalmology*, 119, 298-300.
- 209.Sangwan, V.S., Matalia, H.P., Vemuganti, G.K. (2006). Clinical Outcome of Autologous Cultivated Limbal Epithelium Transplantation. *Indian Journal of Ophthalmology*, 54, 29-34.

- 210.Shortt, A.J., Secker, G.A., Notara, M.D., Limb, G.A., Khaw, P.T., Tuft, S.J. ve diğçerleri. (2007). Transplantation of Ex Vivo Cultured Limbal Epithelial Stem Cells: A Review of Techniques and Clinical Results. *Survey of Ophthalmology*, 52(5), 483-502.
- 211.Rheinwald, J.G., Green, H. (1975). Serial Cultivation of Strains of Human Epidermal Keratinocytes: The Formation of Keratinizing Colonies from Single Cells. *Cell*, 6, 331-343.
- 212.Pellegrini, G., Golisano, O., Paterna, P. (1999). Location and Clonal Analysis of Stem Cells and Their Differentiated Progeny in the Human Ocular Surface. *Journal of Cellular Biology*, 145, 769-782.
- 213.Rheinwald, J.G. (1980). Serial Cultivation of Normal Human Epidermal Keratinocytes. *Methods of Cellular Biology*, 21A, 229-254.
- 214.Grueterich, M., Espana, E.M., Tseng, S.C. (2003). Ex Vivo Expansion of Limbal Epithelial Stem Cells: Amniotic Membrane Serving as a Stem Cell Niche. *Survey of Ophthalmology*, 48, 631-646.
- 215.Valero, M., Pérez-Revuelta, B.I., Rodriguez, L.J. (2003). Effect of PVP K-25 on the Formation of the Naproxen:β-Ciclodextrin Complex. *International Journal of Pharmaceutics*, 253, 97–110.
- 216.Reynolds, J.E.F. (1996). *Martindale, The Extra Pharmacopoeia Thirty-first Edition*. London: Royal Pharmaceutical Society.
- 217.Ekpe, A., Tong, J.H., Rodriguez, L. (2001). High-Performance Liquid Chromatographic Method Development and Validation for the Simultaneous Quantitation of Naproxen Sodium and Pseudoephedrine Hydrochloride Impurities. *Journal of Chromatographic Science*, 39(3), 81-86.
- 218.Dinc, E., Ozdemir, A., Aksoy, H., Ustundag, O., Baleanu, D. (2006). Chemometric Determination of Naproxen Sodium and Pseudoephedrine Hydrochloride in Tablets by HPLC. *Chemical&Pharmaceutical Bulletin (Tokyo)*, 54(4), 415-421.
- 219.Monser, L., Darghouth, F. (2003). Simultaneous Determination of naproxen and Related Compounds by HPLC Using Porous Graphitic Carbon Column. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, 32(4-5), 1087-1092.

- 220.Mitakos, A., Panderi, I. (2002). A Validated LC Method for the Determination of Clopidogrel in Pharmaceutical Preparations. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, 28(3-4), 431-438.
- 221.Carrasco-Portugal Mdel, C., Herrera, J.E., Reyes-Garcia, G., Medina-Santillan, R., Flores-Murrieta, F.J. (2006). Comparative Bioavailability of Two Oral Suspensions of Naproxen Sodium. *Arzneimittelforschung*, 56(8), 589-592.
- 222.Bansal, V., Dex, T., Proskin, H., Garreffa, S. (2001). A Look at the Safety Profile of Over-the-Counter Naproxen Sodium: A Meta-Analysis. *Journal of Clinical Pharmacology*, 41(2), 127-138.
- 223.Tashtoush, B.M., Al-Taani, B.M. (2003). HPLC Determination of Naproxen in Plasma. *Pharmazie*, 58(9), 614-615.
- 224.Nielsen-Kudsk, F. (1980). HPLC Determination of Some Antiinflammatory, Weak Analgesic and Uricosuric Drug in Human Blood Plasma and Its Application to Pharmacokinetics. *Acta Pharmacology and Toxicology*, 47(4), 267-273.
- 225.Mikami, E., Goto, T., Ohno, T., Matsumoto, H., Nishida, M. (2000). Simultaneous Analysis of Naproxen, Nabumetone and Its Major Metabolite 6-Methoxy-2-Naphthylacetic Acid in Pharmaceuticals and Human Urine by High-Performance Liquid Chromatography. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, 23(5), 917-925.
- 226.Zakeri-Milani, P., Barzegar-Jalali, M., Tajerzadeh, H., Azarmi, Y., Valizadeh, H. (2005). Simultaneous Determination of Naproxen, Ketoprofen and Phenol Red in Samples from Rat Intestinal Permeability Studies: HPLC Method Development and Validation. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, 39(3-4), 624-630.
- 227.Moore, D.E., Chappuis, P.P. (1988). A Comparative Study of the Photochemistry of the Non-Steroidal Anti-Inflammatory Drugs, Naproxen, Benoxaprofen and Indomethacin. *Photochemistry and Photobiology*, 47(2), 173-180.
- 228.Segre, E.J. (1980). Naproxen Sodium (Anaprox): Pharmacology, Pharmacokinetics and Drug Interactions. *The Journal of Reproductive Medicine*, 25(4), 222-225.

- 229.Moyer, S. (1986). Pharmacokinetics of Naproxen Sodium. *Cephalalgia*, 6(4), 77-80.
- 230.Li, J.J., Norton, M.B., Reinhard, E.J., Anderson, G.D., Gregory, S.A., Isakson, P.C. ve diğerleri. (1996). Novel Terphenyls as Selective Cyclooxygenase-2 Inhibitors and Orally Active Anti-inflammatory Agents. *Journal of Medicinal Chemistry*, 39(9), 1846-1856.
- 231.Di Martino, P., Barthelemy, C., Joiris, E., Capsoni, D., Masic, A., Massarotti, V. ve diğerleri. (2007). A New Tetrahydrated Form of Sodium Naproxen. *Journal of Pharmaceutical Sciences*, 96(1), 156-167.
- 232.Kayaalp, S.O. (2002). Nonsteroidal Antiinflatuvar İlaçlar. *Rasyonel Tedavi Yönünden Tıbbi Farmakoloji* (s. 960-994). Ankara: Hacettepe-Taş Kitapçılık.
- 233.Gaynes, B.I., Fiscella, R. (2002). Topical Nonsteroidal Anti-Inflammatory Drugs for Ophthalmic Use: A Safety Review. *Drug Safety*, 25(4), 233-250.
- 234.Papa, V., Russo, S., Russo, P., Di Bella, A., Santocono, M., Milazzo, G. (2002). Topical Naproxen Sodium for Inhibition of Miosis During Cataract Surgery. Prospective, Randomized Clinical Trials. *Eye*, 16, 292-296.
- 235.Toothaker, R.D., Barker, S.H., Gillen, M.V., Helsinger, S.A., Kindberg, C.G., Hunt, T.L. ve diğerleri. (2000). Absence of Pharmacokinetic Interaction Between Orally Co-administered Naproxen Sodium and Diphenhydramine Hydrochloride. *Biopharmaceutics&Drug Disposition*, 21(6), 229-233.
- 236.Todd, P.A., Clissold, S.P. (1990). Naproxen. A Reappraisal of Its Pharmacology, and Therapeutic Use in Rheumatic Diseases and Pain States. *Drugs*, 40(1), 91-137.
- 237.Lo, A., Addison, R.S., Hooper, W.D., Dickinson, R.G. (2001). Disposition of Naproxen, Naproxen Acyl Glucuronide and Its Rearrangement Isomers in the Isolated Perfused Rat Liver. *Xenobiotica*, 31(6), 309-319.
- 238.Weyenberg, W., Vermeireb, A., Vandervoort, J., Remonb, J.P., Ludwig, A. (2005). Effects of Roller Compaction Settings on the Preparation of Bioadhesive Granules and Ocular Minitablets. *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics*, 59, 527-536.,

239. Shimek, J.L., Rao, N.G., Khalil, S.K. (1982). An Isocratic High-Pressure Liquid Chromatographic Determination of Naproxen and Desmethylnaproxen in Human Plasma. *Journal of Pharmaceutical Sciences*, 71(4), 436-439.
240. Guidance for Industry Validation of Analytical Procedures: Methodology Final Guidance, Food and Drug Administration Center for Veterinary Medicine, (1999), 2-13.
241. Shabir, G.A. (2003). Validation of High-Performance Liquid Chromatography Methods for Pharmaceutical Analyses. *Journal of Chromatography. A.*, 987, 57-66.
242. Tormiyama, N., Tsuji, H., Watanabe, M., Takeda, M., Harada, T., Kobayashi, H. (2000). High-Performance Liquid Chromatographic Method for the Determination of DDT and Its Degradation Products in Rat Plasma, Liver and Brain: Validation and Application to a Pharmacokinetic Study. *Journal of Chromatography*, 748, 361-368.
243. Mandal, B., Halder, K.K., Dey, S.K., Bhoumik, M., Debnath, M.C., Ghosh, L.K. (2009). Development and Physical Characterization of Chloramphenicol Loaded Biodegradable Nanoparticles for Prolonged Release. *Pharmazie*, 64(7), 445-449.
244. Vega, E., Gamisans, F., García, M.L., Chauvet, A., Lacoulonche, F., Egea, M.A. (2008). PLGA Nanospheres for the Ocular Delivery of Flurbiprofen: Drug Release and Interactions. *Journal of Pharmaceutical Sciences*, 97(12), 5306-5317.
245. Eperon, S., Bossy-Nobs, L., Petropoulos, I.K., Gurny, R., Guex-Crosier, Y. (2008). A Biodegradable Drug Delivery System for the Treatment of Postoperative Inflammation. *International Journal of Pharmaceutics*, 352, 240-247.
246. Sarısözen, C., Arıca, B., Hıncal, A.A., Çalış, S. (2008). Development of Biodegradable Drug Releasing Polymeric Cardiovascular Stents and In Vitro Evaluation. *Journal of Microencapsulation*, 1, 1-11.
247. Miyashita, H., ; Shimmura, S., Kobayashi, H., Taguchi, T., Asano-Kato, N., Uchino, Y. ve diğerleri. (2006). Collagen-Immobilized Poly(vinyl alcohol) as an Artificial Cornea Scaffold That Supports a Stratified Corneal Epithelium. *Journal of Biomedical Materials Research Part B: Applied Biomaterials*, 76(1), 56-63.

- 248.Olfih, Z., Komoly, S., Nagashima, N., Joo, F., Rapp, U.R., Anderson, W.B. (1991). Cerebral Ischemia Induces Transient Intracellular Redistribution and Intranuclear Translocation of the Raf Proto-Oncogene Product in Hippocampal Pyramidal Cells. *Experimental Brain Research*, 84, 403-410.
- 249.Nieponice, A., Soletti, L., Guan, J., Deasy, B.M., Huard, J., Wagner, W.R. (2008). Development of a Tissue Engineered Vascular Graft Combining a Biodegradable Scaffold, Muscle-Derived Stem Cells and a Rotational Vacuum Seeding Technique. *Biomaterials*, 29(7), 825–833.
- 250.Guana, J., Fujimotoa, K.L., Sacks, M.S., Wagner, W.R. (2005). Preparation and Characterization of Highly Porous, Biodegradable Polyurethane Scaffolds for Soft Tissue Applications. *Biomaterials*, 26, 3961-3971.
- 251.Nojehdehian, H., Moztarzadeh, F., Baharvand, H., Nazarian, H., Tahriri, M. (2009). Preparation and Surface Characterization of Poly-L-Lysine-Coated PLGA Microsphere Scaffolds Containing Retinoic Acid for Nerve Tissue Engineering: In Vitro Study. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*, 73(1), 23-29.
- 252.Miao, X., Tan, D.M., Li, J., Xiao, Y., Crawford, R. (2008). Mechanical and Biological Properties of Hydroxyapatite/Tricalcium Phosphate Scaffolds Coated with Poly(Lactic-Co-Glycolic Acid). *Acta Biomaterialia*, 4, 638-645.
- 253.Pinho, E.D., Martins, A., Araujo, J.V., Reis, R.L., Neves, N.M. (2009). Degradable Particulate Composite Reinforced with Nanofibres for Biomedical Applications. *Acta Biomaterialia*, 5, 1104–1114.
- 254.Yoon, J.J., Park, T.G. (2001). Degradation Behaviors of Biodegradable Macroporous Scaffolds Prepared by Gas Foaming of Effervescent Salts. *Journal of Biomedical Materials Research*, 55, 401–408.
- 255.Çirpanlı, Y., Ünlü, N., Çalış, S., Hincal, A.A. (2005). Formulation and In-Vitro Characterization of Retinoic Acid Loaded Poly (Lactic-Co-Glycolic Acid) Microspheres. *Journal of Microencapsulation*, 22(8), 877-889.
- 256.Mundada, A.S., Shrikhande, B.K. (2008). Formulation and Evaluation of Ciprofloxacin Hydrochloride Soluble Ocular Drug Insert. *Current Eye Research*, 33(5-6), 469-475.

257. Gilhotra, R.M., Gilhotra, N., Mishra, D.N. (2009). Piroxicam Bioadhesive Ocular Inserts: Physicochemical Characterization and Evaluation in Prostaglandin-Induced Inflammation. *Current Eye Research*, 34(12), 1065-1073.
258. Bamba, M., Puisieux, F., Marty, J.P., Carstensen, J.T. (1979). Release Mechanisms in Gel Forming Sustained Release Preparations. *International Journal of Pharmaceutics*, 2, 307.
259. Ocaña, J., Frutos, G., Sánchez O.P. (2009). Using the Similarity Factor f_2 in Practice: A Critical Revision and Suggestions for Its Standard Error Estimation. *Chemometrics and Intelligent Laboratory Systems*, 99(1), 49-56.
260. Bamba, M., Puisieux, F., Marty, J.P., Carstensen, J.T. (1979). Physical Model for Release of Drug from Gel Forming Sustained Release Preparations. *International Journal of Pharmaceutics*, 3, 87-92.
261. Jacob, J.T., Rochefort, J.R., Bi, J., Gebhardt, B.M. (2005). Corneal Epithelial Cell Growth Over Tethered-Protein/Peptide Surface-Modified Hydrogels. *Journal of Biomedical Materials Research Part B: Applied Biomaterials*, 72B, 198-205.
262. Wolosin, J.M., Budak, M.T., Akinci, M.A.M. (2004). Ocular Surface Epithelial and Stem Cell Development. *International Journal of Developmental Biology*, 48, 981-991.
263. Kim, M.K., Lee, J.L., Shin, K.S., Jung, G.A., Wee, W.R., Lee, J.H. ve diğerleri. (2006). Isolation of Putative Corneal Epithelial Stem Cells from Cultured Limbal Tissue. *Korean Journal of Ophthalmology*, 1, 55-61.
264. Lekhanont, K., Choubtum, L., Chuck, R.S., Sangiampornpanit, T., Chuckpaiwong, V., Vongthongsri, A. (2009). A Serum- and Feeder-Free Technique of Culturing Human Corneal Epithelial Stem Cells on Amniotic Membrane. *Molecular Vision*, 15, 1294-1302.
265. Ifkovits, J.L., Sundararaghavan, H.G., Burdick, J.A. (2009). Electrospinning Fibrous Polymer Scaffolds for Tissue Engineering and Cell Culture. (t.y.). Erişim: 08 Şubat 2010, <http://www.jove.com/index/details.stp?id=1589>.
266. Schoenlein, P.V., Barrett, J.T., Welter, D. (1999). The Degradation Profile of Extrachromosomal Circular DNA During Cisplatin-Induced Apoptosis is

- Consistent with Preferential Cleavage at Matrix Attachment Regions. *Chromosoma*, 108(2), 121-131.
- 267.Franke, O., Durst, K., Maier, V., Göken, M., Birkholz, T., Schneider, H. Ve diğerleri. (2007). Mechanical Properties of Hyaline and Repair Cartilage Studied by Nanoindentation. *Acta Biomaterialia*, 3(6), 873-881.
- 268.International Standarts for Business, Government and Society, ISO 10993-5:2009, Biological Evaluation of Medical Devices: Part 5- Tests for In Vitro Cytotoxicity. (t.y.). Erişim: 08 Şubat 2010, http://www.iso.org/iso/catalogue_detail.htm?csnumber=36406.
- 269.Hansen, M.B., Nielsen, S.E., Berg, K. (1989). Re-Examination and Further Development of a Precise and Rapid Dye Method for Measuring Cell-Growth Cell-Kill. *Journal of Immunological Methods*, 119(2), 203-210.
- 270.Ünyayar, A., Demirbilek, M., Turkoglu, M., Celik, A., Mazmanci, M.A., Erkurt, E.A. ve diğerleri. (2006). Evaluation of Cytotoxic and Mutagenic Effects of *Coriolus versicolor* and *Funalia trogii* Extracts on Mammalian Cells. *Drug and Chemical Toxicology*, 29, 69–83.
- 271.Sun, M., Zhou, P., Pan, L.F., Liu, S., Yang, H.X. (2009). Enhanced Cell Affinity of the Silk Fibroin- Modified PHBHHx Material. *Journal of Materials Science: Materials in Medicine*, 20, 1743–1751.
- 272.Thein-Han, W.W., Misra, R.D.K. (2009). Biomimetic Chitosan–Nanohydroxyapatite Composite Scaffolds for Bone Tissue Engineering. *Acta Biomaterialia*, 5, 1182-1197.
- 273.Organ Procurement and Transplantation Network. (t.y.). Erişim: 3 Nisan 2010, <http://optn.transplant.hrsa.gov/>
- 274.Organ Nakli Koordinatörleri Derneği. (t.y.). Erişim: 3 Nisan 2010, <http://www.onkod.org/istatistik.php/>
- 275.2020: A New Vision - A Future for Regenerative Medicine, U.S. Department of Health and Human Services. (t.y.) Erişim: 3 Nisan 2010, <http://www.hhs.gov/reference/newfuture.shtml/>
- 276.Tabata, Y. (2009). Biomaterial Technology for Tissue Engineering Applications. *Journal of Royal Society Interface*, 6, 311-324.

- 277.Koch, T.G., Berg, L.C., Betts, D.H. (2009). Current and Future Regenerative Medicine - Principles, Concepts, and Therapeutic Use of Stem Cell Therapy and Tissue Engineering in Equine Medicine. *Canadian Veterinary Journal*, 50(2), 155-165.
- 278.Garg, P., Krishna, P.V., Stratis, A.K., Gopinathan, U. (2005). The Value of Corneal Transplantation in Reducing Blindness. *Eye*, 19, 1106-1114.
- 279.Griffith, M., Hakim, M., Shimmura, S., Watsky, M.A., Li, F., Carlson, D. ve diğ erleri. (2002). Artificial Human Corneas: Scaffold for Transplantation and Host Regeneration. *Cornea*, 21(2), 54-61.
- 280.Di Martino, P., Barthélémy, C., Palmieri, G.F., Martelli, S. (2001). Physical Characterization of Naproxen Sodium Hydrate and Anhydrate Forms. *European Journal of Pharmaceutical Sciences*, 14(4), 293-300.
- 281.Sharma, J., Singla, A.K., Dhawan, S. (2003). Zinc–Naproxen Complex: Synthesis, Physicochemical and Biological Evaluation. *International Journal of Pharmaceutics*, 260, 217–227.
- 282.Wu, L., Ding, J. (2004). In Vitro Degradation of Three-Dimensional Porous Poly(D,L-Lactide-co-Glycolide) Scaffolds for Tissue Engineering. *Biomaterials*, 25, 5821-5830.
- 283.Germain, L., Carrier, P., Auger, F.A., Salesse, C., Guerin, S.L. (2000). Can We Produce a Human Corneal Equivalent by Tissue Engineering? *Progress in Retinal and Eye Research*, 19(5), 497-527.
- 284.Kayıran, S., Bozdağ, S., Çakmak, H.B., Denkbaşı, E.B., Ünlü, N. (2009). Kornea Onarımında Kullanılan Destek Materyaller. *Türkiye Klinikleri Journal of Ophthalmology*, 18(1), 48-60.
- 285.Arpornmaeklong, P., Suwatwirote, N. (2008). Properties of Chitosan-Collagen Sponges and Osteogenic Differentiation of Rat-Bone-Marrow Stromal Cells. *International Journal of Oral and Maxillofacial Surgery*, 37, 357-366.
- 286.Ochi, K., Chen, G., Ushida, T., Gojo, S., Segawa, K., Tai, H. ve diğ erleri. (2002). Use of Isolated Mature Osteoblasts in Abundance Acts as Desired-Shaped Bone Regeneration in Combination with a Modified Poly-DL-Lactic-co-Glycolic Acid (PLGA)-Collagen Sponge. *Journal of Cellular Physiology*, 194, 45-53.

287. Lu, L., Reinach, P.S., Kao, W.W.Y. (2001). Corneal Epithelial Wound Healing. *Experimental Biology and Medicine*, 226(7), 653-664.
288. Baldwin, H.C., Marshall, J. (2002). Growth Factors in Corneal Wound Healing Following Refractive Surgery: A Review. *Acta Ophthalmologica Scandinavica*, 80, 238-247.
289. Chen, J., Li, Q., Xu, J., Huang, Y., Ding, Y., Deng, H. ve diğerleri. (2005). Study on Biocompatibility of Complexes of Collagen–Chitosan–Sodium Hyaluronate and Cornea. *Artificial Organs*, 29(2), 104-113.
290. Lee, C.T., Lee, Y.D. (2006). Preparation of Porous Biodegradable Poly(Lactide-co-Glycolide)/Hyaluronic Acid Blend Scaffolds: Characterization, In Vitro Cells Culture and Degradation Behaviors. *Journal of Materials Science: Materials in Medicine*, 17, 1411-1420.
291. Kuo, Y.C., Ku, I.N. (2008). Cartilage Regeneration by Novel Polyethylene Oxide/Chitin/Chitosan Scaffolds. *Biomacromolecules*, 9(10), 2662-2669.
292. Thomson, H., Treharne, A., Walker, P., Grossel, M., Lotery, A. (2009). Optimisation of Polymer Scaffolds for Retinal Pigment Epithelium Cell Transplantation. *British Journal of Ophthalmology* (In Press).
293. Ku, C.S., Sathishkumar, M., Mun, S.P. (2007). Binding Affinity of Proanthocyanidin from Waste Pinus radiata Bark onto Proline-Rich Bovine Achilles Tendon Collagen Type I. *Chemosphere*, 67, 1618-1627.
294. Peng, H., Xiao, M., Chen, L., Crawford, R., Whittaker, A.K. (2009). Amphiphilic Triblock Copolymers of Methoxy-poly(ethyleneglycol)-b-poly(L-lactide)-b-poly(L-lysine) for Enhancement of Osteoblast Attachment and Growth. *Biomacromolecules*, 10, 95-104.
295. Huang, Y.C., Huang, C.C., Huang, Y.Y., Chen, K.S. (2007). Surface Modification and Characterization of Chitosan or PLGA Membrane with Laminin by Chemical and Oxygen Plasma Treatment for Neural Regeneration. *Journal of Biomedical Materials Research*, 82A, 842-851.
296. Soil Science Society of America Journal, Different Classifications of Pores Based on Their Equivalent Cylindrical Diameter. (t.y.). Erişim: 4 Nisan 2010, <http://soil.scijournals.org/cgi/content/full/63/6/1530/TBL1/>

297. Duarte, A.R.C., Mano, J.F., Reis, R.L. (2009). Dexamethasone Loaded Scaffolds Prepared by Supercritical-Assisted Phase Inversion. *Acta Biomaterialia*, 5, 2054-2062.
298. Jiao, Y., Liu, Z., Zhou, C. (2007). Fabrication and Characterization PLLA-Chitosan Hybrid Scaffolds with Improved Cell Compatability. *Journal of Biomedical Materials Research*, 80A, 820-825.
299. Spenlehauer, G., Vert, M., Benoit, J.P. (1989). In Vitro And In Vivo Degradation of Poly(D,L Lactide/Glycolide) Type Microspheres Made by Solvent Evaporation Method. *Biomaterials*, 10, 557-563.
300. Lu, L., Peter, S.J., Lyman, M.D. (2000). In Vitro And In Vivo Degradation of Porous Poly(DL-Lactic-Co-Glycolic Acid) Foams. *Biomaterials*, 21, 1837-1845.
301. Barbanti, S.H., Santos, A.R., Zavaglia, C.A. (2004). Porous and Dense Poly(L-Lactic Acid) and Poly(D,L-Lactic Acid-Co-Glycolic Acid) Scaffolds: In Vitro Degradation in Culture Medium and Osteoblasts Culture. *Journal of Materials Science: Materials in Medicine*, 15, 1315-1321.
302. Ronneberger, B., Kao, W.J., Anderson, J.M. (1996). In Vivo Biocompatibility Study of ABA Triblock Copolymers Consisting of Poly(L-Lactic-Co-Glycolic Acid) A Blocks Attached to Central Poly(Oxyethylene) B Blocks. *Journal of Biomedical Materials Research*, 30, 31-40.
303. Yoon, J.J., Kim, J.H., Park, T.G. (2003). Dexamethasone-Releasing Biodegradable Polymer Scaffolds Fabricated by a Gas-Foaming/Salt-Leaching Method. *Biomaterials*, 24(13), 2323-2329.
304. Reves, B.T., Bumgardner, J.D., Cole, J.A., Yang, Y., Haggard, W.O. (2009). Lyophilization to Improve Drug Delivery for Chitosan-Calcium Phosphate Bone Scaffold Construct: A Preliminary Investigation. *Journal of Biomedical Materials Research Part B: Applied Biomaterials*, 90(1), 1-10.
305. Costa, P., Lobo, J.M.S. (2001). Modeling and Comparison of Dissolution Profiles. *European Journal of Pharmaceutical Sciences*, 13, 123-133.
306. Özkan, Y., Atay, T., Dikmen, N., Işimer, A., Abboul-Enein, H.Y. (2000). Improvement of Water Solubility and In Vitro Dissolution Rate of Gliclazide by Complexation with β -Cyclodextrin. *Pharmaceutica Acta Helvetiae*, 74, 365-370.

307. Ertan, T., Karasulu, H.Y., Karasulu, E., Ege, M.A., Köse, T., Güneri, T. (2000). A New In Vitro/In Vivo Kinetic Correlation Method for Nitrofurantoin Matrix Tablet Formulations. *Drug Development and Industrial Pharmacy*, 26(7), 737-743.
308. Comoğlu, T., Gönül, N., Şener, E., Dal, A.G., Tunçel, M. (2006). Determination of Carbamazepine by Flow-Injection Analysis: Its Application to Tablet Analysis and Dissolution Studies. *Journal of Liquid Chromatography & Related Technologies*, 29, 2677-2690.
309. Terai, N.T., Terai, K., Hayashi, Y., Chikama, T., Kao, W.W.Y. (2006). Expression of Keratin 12 and Maturation of Corneal Epithelium during Development and Postnatal Growth. *Investigative Ophthalmology and Visual Science*, 47, 545-551.
310. Higa, K., Shimmura, S., Kato, N., Kawakita, T., Miyashita, H., Itabashi, Y. ve diğerleri. (2007). Proliferation and Differentiation of Transplantable Rabbit Epithelial Sheets Engineered with or without an Amniotic Membrane Carrier. *Investigative Ophthalmology and Visual Science*, 48(2), 597-604.
311. Barbaro, V., Ferrari, S., Fasolo, A., Ponzin, D., Di Iorio, E. (2009). Reconstruction of a Human Hemicornea through Natural Scaffolds Compatible with the Growth of Corneal Epithelial Stem Cells and Stromal Keratocytes. *Molecular Vision*, 15, 2084-2093.
312. Wakuta, M., Morishige, N., Chikama, T., Seki, K., Nagano, T., Nishida, T. (2007). Delayed Wound Closure and Phenotypic Changes in Corneal Epithelium of the Spontaneously Diabetic Goto-Kakizaki Rat. *Investigative Ophthalmology and Visual Science*, 48, 590-596.
313. Yoshida, S., Shimmura, S., Kawakita, T., Miyashita, H., Den, S., Shimazaki, J. ve diğerleri. (2006). Cytokeratin 15 Can Be Used to Identify the Limbal Phenotype in Normal and Diseased Ocular Surfaces. *Investigative Ophthalmology and Visual Science*, 47, 4780-4786.
314. Öztürk, Ergün, M.A., Öztürk, Z., Nurözler, A.B., Keçeci, K., Özdemir, N. ve diğerleri. (2006). Chitosan-Coated Alginate Membranes for Cultivation of Limbal Epithelial Cells to Use in the Restoration of Damaged Corneal Surfaces. *International Journal of Artificial Organs*, 29(2), 228-238.

- 315.Lee, J.H., Khang, G., Lee, J.W., Lee, H.B. (1998). Interaction of Different Types of Cells on Polymer Surfaces with Wettability Gradient. *Journal of Colloid and Interface Science*, 205, 325-330.
- 316.Zhu, Y., Chan-Park, M.B., Chian, K.S. (2005). The Growth Improvement of Porcine Esophageal Smooth Muscle Cells on Collagen-Grafted Poly(DL-Lactide-co-Glycolide)Membrane. *Journal of Biomedical Materials Research Part B: Applied Biomaterials*, 75B, 193-199.
- 317.Fischer, S., Allmen, E.U., Men, Y.W., Groettrup, M., Merkle, H.P.,Gander, B. (2007). The Preservation of Phenotype and Functionality of Dendritic Cells upon Phagocytosis of Polyelectrolyte-Coated PLGA Microparticles. *Biomaterials*, 28(6), 994-1004.
- 318.Li, X., Cai, S., Liu, B., Xu, Z., Dai, X., Ma, K. ve diğ erleri. (2007). Characteristics of PLGA-Gelatin Complex as Potential Artificial Nerve Scaffold. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*, 57, 198-203.
- 319.Masubuchi, Y., Saito, H., Horie, T. (1998). Structural Requirements for the Hepatotoxicity of Nonsteroidal Anti-inflammatory Drugs in Isolated Rat Hepatocytes. *Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics*, 287(1), 208-213.
- 320.Romet, M.J., Crawford, K., Huangi H.S. (1994). Comparative Cytotoxicity of Non-steroidal Anti-inflammatory Drugs in Primary Cultures of Rat Hepatocytes. *Toxicology in Vitro*, 8(1), 55-66.
- 321.Bikram, M., Ahn, C.H., Chae, S.Y., Yockman, J.W., Kim, S.W. (2004). Biodegradable Poly(ethylene glycol)-co-poly(l-lysine)-g-histidine Multiblock Copolymers for Nonviral Gene Delivery. *Macromolecules*, 37 (5), 1903-1916.
- 322.Song, E., Kim, S.Y., Chun, T., Byun, H.J., Lee, Y.M. (2006). Collagen Scaffolds Derived from a Marine Source and Their Biocompatibility. *Biomaterials*, 27(15), 2951-2961.
- 323.Montanaro, L., Arciola, C.R., Cenni, E. (2001). Cytotoxicity, Blood Compatibility and Antimicrobial Activity of Two Cyanoacrylate Glues for Surgical Use. *Biomaterials*, 22, 59-66.

- 324.Wu, Y.C., Shaw, S.Y., Lin, H.R., Lee, T.M., Yang, C.Y. (2006). Bone Tissue Engineering Evaluation Based on Rat Calvaria Stromal Cells Cultured on Modified PLGA Scaffolds. *Biomaterials*, 27(6), 896-904.
- 325.Chen, G., Sato, T., Ushida, T., Ochiai, N., Tateishi, T. (2004). Tissue Engineering of Cartilage Using a Hybrid Scaffold of Synthetic Polymer and Collagen. *Tissue Engineering*, 10(3-4), 323-330.
- 326.Ide, A., Sakane, M., Chen, G., Shimojo, H., Ushida, T., Tateishi, T. ve diğeri. (2001). Collagen Hybridization with Poly(L -lactic acid) Braid Promotes Ligament Cell Migration. *Materials Science and Engineering: C*, 17(1-2), 95-99.
- 327.Yang, X.B. Roach, H.I., Clarke, N.M.P., Howdle, S.M., Quirk, R., Shakesheff, K.M. (2001). Human Osteoprogenitor Growth and Differentiation on Synthetic Biodegradable Structures after Surface Modification. *Bone*, 29(6), 523-531.