

**KEMİK DOKU MÜHENDİSLİĞİ YAKLAŞIMINDA
MELATONİNİN ROLÜ: *İN VİTRO* ÇALIŞMALAR**

**THE ROLE OF MELATONIN IN BONE TISSUE
ENGINEERING APPROACH: *İN VİTRO* STUDIES**

DAMLA ÇETİN ALTINDAL

PROF. DR. MENEMŞE GÜMÜŞDERELİOĞLU

Tez Danışmanı

Hacettepe Üniversitesi
Lisansüstü Eğitim - Öğretim ve Sınav Yönetmeliğinin
Kimya Mühendisliği Anabilim Dalı için Öngördüğü
DOKTORA TEZİ olarak hazırlanmıştır.

2017

ETİK

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

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

beyan ederim.

17/03/2017

DAMLA ÇETİN ALTINDAL

DAMLA ÇETİN ALTINDAL'ın hazırladığı “**Kemik Doku Mühendisliği Yaklaşımında Melatoninin Rolü: *İn Vitro* Çalışmalar**” adlı bu çalışma aşağıdaki jüri tarafından **KİMYA MÜHENDİSLİĞİ ANABİLİM DALI**'nda **DOKTORA TEZİ** olarak kabul edilmiştir.

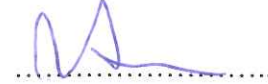
Prof. Dr. Mehlika PULAT
Başkan



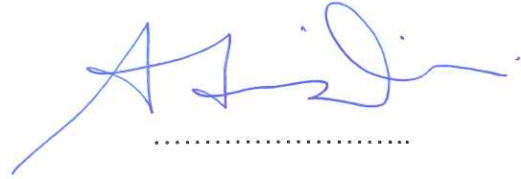
Prof. Dr. Menemşe GÜMÜŞDERELİOĞLU
Danışman



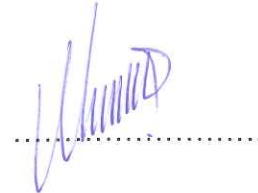
Prof. Dr. Zümriye AKSU
Üye



Prof. Dr. Adil DENİZLİ
Üye



Yrd. Doç. Dr. Murat ŞİMŞEK
Üye



Bu tez Hacettepe Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü tarafından **DOKTORA TEZİ** olarak onaylanmıştır.

Prof. Dr. Menemşe GÜMÜŞDERELİOĞLU
Fen Bilimleri Enstitüsü Müdürü

YAYINLAMA VE FİKRİ MÜLKİYET HAKLARI BEYANI

Enstitü tarafından onaylanan lisansüstü tezimin/raporumun tamamını veya herhangi bir kısmını, basılı (kağıt) ve elektronik formatta arşivleme ve aşağıda verilen koşullarla kullanıma açma iznini Hacettepe Üniversitesine verdiğimi bildiririm. Bu izinle Üniversiteye verilen kullanım hakları dışındaki tüm fikri mülkiyet haklarım bende kalacak, tezimin tamamının ya da bir bölümünün gelecekteki çalışmalarda (makale, kitap, lisans ve patent vb.) kullanım hakları bana ait olacaktır.

Tezin kendi orijinal çalışmam olduğunu, başkalarının haklarını ihlal etmediğimi ve tezimin tek yetkili sahibi olduğumu beyan ve taahhüt ederim. Tezimde yer alan telif hakkı bulunan ve sahiplerinden yazılı izin alınarak kullanması zorunlu metinlerin yazılı izin alarak kullandığımı ve istenildiğinde suretlerini Üniversiteye teslim etmeyi taahhüt ederim.

- ☐ Tezimin/Raporumun tamamı dünya çapında erişime açılabilir ve bir kısmı veya tamamının fotokopisi alınabilir.

(Bu seçenekle teziniz arama motorlarında indekslenebilecek, daha sonra tezinizin erişim statüsünün değiştirilmesini talep etseniz ve kütüphane bu talebinizi yerine getirirse bile, tezinin arama motorlarının önbelleklerinde kalmaya devam edebilecektir.)

- ☒ Tezimin/Raporumun 17.03.2019 tarihine kadar erişime açılmasını ve fotokopi alınmasını (İç Kapak, Özet, İçindekiler ve Kaynakça hariç) istemiyorum.

(Bu sürenin sonunda uzatma için başvuruda bulunmadığım takdirde, tezimin/raporumun tamamı her yerden erişime açılabilir, kaynak gösterilmek şartıyla bir kısmı ve ya tamamının fotokopisi alınabilir)

- ☐ Tezimin/Raporumun tarihine kadar erişime açılmasını istemiyorum, ancak kaynak gösterilmek şartıyla bir kısmı veya tamamının fotokopisinin alınmasını onaylıyorum.

- ☐ Serbest Seçenek/Yazarın Seçimi

20/03/2017



Damla Çetin Altındal

ÖZET

KEMİK DOKU MÜHENDİSLİĞİ YAKLAŞIMINDA MELATONİNİN ROLÜ: *İN VİTRO* ÇALIŞMALAR

Damla ÇETİN ALTINDAL

Doktora, Kimya Mühendisliği Bölümü

Tez Danışmanı: Prof. Dr. Menemşe GÜMÜŞDERELİOĞLU

Mart 2017, 194 sayfa

Sunulan tez çalışmasında, melatoninin osteoindüktif ve antikanserojenik özelliklerinin bir arada bulunduğu doku iskelesi-temelli bir sistem geliştirilmesi amaçlanmıştır. Melatoninin osteoindüktif etkileri preosteoblastik MC3T3-E1 hücre hattı ve insan mezenkimal kök hücreleri (hMSC); antikanserojenik etkileri ise MG-63 insan osteosarkom hücre hattı kullanılarak yürütülen *in vitro* hücre kültür çalışmaları ile incelenmiştir.

Emülsiyon oluşturma/çözücü buharlaştırma yöntemiyle üretilen poli(laktik-ko-glikolik asit) (PLGA) nanopartiküllerin ve PLGA mikropartiküllerin sırasıyla, yaklaşık 200 nm ve 3 µm çapa sahip olduğu belirlenmiştir. *In vitro* salım çalışmaları sonucunda, PLGA nano/mikropartiküllerin melatoninin kontrollü ve uzun dönemli salımı için oldukça uygun sistemler olduğu ve 40 gün sonunda partiküllerden salınan melatonin konsantrasyonunun mikromolar mertebede olduğu görülmüştür. Partiküllerden melatonin salımının Higuchi salım modeline uyduğu, dolayısıyla difüzyon mekanizmasıyla gerçekleştiği kanıtlanmıştır. PLGA nanopartiküllerin preosteoblastik MC3T3-E1 hücreleri ve MG-63 insan osteosarkom hücreleri üzerinde toksik etki gösterdiği belirlenmiş ve partiküllerin hücre içerisine alım yüzdeleri, sırasıyla ~%30 ve ~%60 olarak hesaplanmıştır. Dolayısıyla, PLGA nanopartiküllerin doku iskelelerine yüklenerek kullanılması gerektiği vurgulanmıştır.

Kitosanın biyoaktivitesini arttırmak amacıyla toz ve boncuk formdaki hidroksiapatit (HAp) partiküllerin kitosan yapısına katılmasıyla dondurarak-kurutma yöntemi ile kitosan/hidroksiapatit (HAp) doku iskeleleri üretilmiştir. İskelelerin üç boyutlu gözenek yapıları taramalı elektron mikroskobu (SEM) ve mikro-bilgisayarlı tomografi (µ-CT) ile

incelenmiştir. MC3T3-E1 hücreleri ile gerçekleştirilen çalışmalarda kitosan/boncuk HAp doku iskelesinin hücre üremesini daha çok desteklediği belirlenmiştir. Melatonin yüklü PLGA mikropartiküllerin kitosan/HAp doku iskelelerinin yapısına üretim sırasında katılmasıyla hazırlanan kitosan/HAp+Mp doku iskelelerinde üreyen MC3T3-E1 hücrelerinin alkalen fosfataz (ALP) aktivitesinin ve runt-ilişkili transkripsiyon faktör (*RunX2*), kollajen tip 1 (*Col1*), osteokalsin (*Ocn*) ve osteopontin (*Opn*) genlerinin ekspresyon seviyelerinin diğer gruplara göre daha yüksek olduğu belirlenmiştir. SEM ve konfokal lazer taramalı mikroskop (CLSM) görüntüleri, hücrelerin iskelenin 600-700 µM derinliklerine kadar göç ettiklerini göstermiştir.

Melatoninin osteosarkom hücreleri üzerindeki etkisini incelemek amacıyla, 900 W, 60 s ve 90 s mikrodalga koşullarında melatonin/hidroksiopropil-β-siklodekstrin (HPβCD) inklüzyon kompleksleri üretilmiştir. Melatonin/HPβCD inklüzyon kompleksleri, kitosan/HAp+Mp doku iskelelerine, iskele başına 2.267 ± 0.236 mg melatonin içerecek şekilde başarılı bir şekilde yüklenmiştir. *In vitro* salım çalışmaları, doku iskelelerinden melatonin salımının 5 gün gibi oldukça kısa sürede gerçekleştiğini ve salınan melatoninin yaklaşık 8 mM konsantrasyonda olduğunu ortaya koymuştur. Hazırlanan melatonin/HPβCD inklüzyon kompleksi yüklü doku iskelelerinin MG-63 insan osteosarkom hücreleri üzerindeki etkisi *in vitro* hücre kültür çalışmaları ile incelenmiş ve bu sistemden yüksek miktarda ve çok hızlı bir şekilde salınan melatoninin kanser hücrelerinin üremesini hücre döngüsünün G₀/G₁ fazında inhibe ettiği belirlenmiştir.

Melatoninin hMSClerin osteoblastlara farklılaşmasındaki etkisini incelemek amacıyla ipek filmler kullanılmış ve bu filmlerin yüzeyi farklı konsantrasyonlarda (0-2,000 µM) melatonin ile modifiye edilmiştir. İpek filmlerden ilk 24 saatte melatoninin büyük bir kısmı ani bir şekilde salınmış ve salım 5 gün boyunca devam etmiştir. Melatoninin 250 µM, 500 µM ve 1,000 µM konsantrasyonları hücreler üzerinde herhangi bir toksik etki yaratmadığından bu konsantrasyonlar kullanılarak hMSCler ile *in vitro* hücre kültür çalışmaları yürütülmüştür. Hem büyüme hem de farklılaşma ortamında gerçekleştirilen çalışmalar sonucunda, melatonin varlığının hücrelerin ALP aktiviteleri ve sırasıyla, erken ve geç dönem farklılaşma belirteçleri olan RUNX2 ve OCN protein ekspresyonlarını arttırdığı görülmüştür. Von Kossa boyamaları sonucunda, melatonin içeren ipek filmler üzerinde kültüre edilen hücrelerin kültürün geç dönemlerinde mineralize nodüller sentezledikleri belirlenmiştir.

Elde edilen veriler sonucunda, geliştirilen doku iskelesi-temelli melatonin taşıyıcı sistemden salınan mikromolar konsantrasyondaki melatoninin preosteoblast hücrelerinin proliferasyonunu arttırdığı, milimolar konsantrasyondaki melatoninin ise osteosarkom hücrelerinin üremesini inhibe ettiği belirlenmiştir. Böylece, melatoninin osteoindüktif ve antikanserojenik özelliklerinin bir arada etkili olduğu bu sistemin osteosarkom tedavisi için uygun olduğu sonucuna ulaşılmıştır.

Anahtar Kelimeler: melatonin, kemik doku mühendisliği, osteosarkom, inklüzyon kompleksi, kontrollü salım, ipek film.

ABSTRACT

THE ROLE OF MELATONIN IN BONE TISSUE ENGINEERING APPROACH: *IN VITRO* STUDIES

Damla ÇETİN ALTINDAL

Doctor of Philosophy, Department of Chemical Engineering

Supervisor: Prof. Dr. Menemşe GÜMÜŞDERELİOĞLU

March 2017, 194 pages

In the presented study, it was aimed to develop a tissue scaffold-based system in which the osteoinductive and anticarcinogenic properties of melatonin coexist. For this purpose, osteoinductive effects of melatonin were investigated using preosteoblastic MC3T3-E1 cell line and human mesenchymal stem cells (hMSC); anticarcinogenic effects of melatonin were investigated using MG-63 human osteosarcoma cell line by *in vitro* cell culture studies.

It has been determined that, poly(lactide-co-glycolic acid) (PLGA) nanoparticles and PLGA microparticles produced by emulsion/solvent evaporation method have diameters of about 200 nm and 3 µm, respectively. *In vitro* release studies showed that, PLGA nano/microparticles are highly suitable systems for controlled and long-term release of melatonin, and the concentration of melatonin released from the particles after 40 days is in micromolar level. The release behavior of melatonin from the particles was consistent with the Higuchi release model, so the diffusional mechanism proved to be the result of mathematical analysis. PLGA nanoparticles were shown to be toxic on both preosteoblastic MC3T3-E1 cells and MG-63 human osteosarcoma cells and the percentages of particles uptaken by the cells were determined to be ~ 30% and ~ 60%, respectively. Therefore, it has been emphasized that PLGA nanoparticles should be loaded onto tissue scaffolds.

In order to increase the bioactivity of chitosan, chitosan/hydroxyapatite (HAp) tissue scaffolds were produced by freeze-drying by adding HAp particles in powder and bead form

to the chitosan structure. Three-dimensional pore structures of the scaffolds were investigated by scanning electron microscopy (SEM) and micro-computerized tomography (μ -CT). Studies conducted with MC3T3-E1 cells have shown that chitosan/bead HAp tissue scaffold more strongly supported cell proliferation. It was determined that, cells proliferating in chitosan/HAp+Mp tissue scaffolds prepared by incorporation of melatonin loaded PLGA microparticles during the production of chitosan/HAp tissue scaffolds produced the most favorable results. The alkaline phosphatase (ALP) activity and the expression levels of runt-related transcription factor (*RunX2*), collagen type 1 (*Coll*), osteocalcin (*Ocn*) and osteopontin (*Opn*) genes of this group were found to be higher than that of the other groups. SEM and confocal laser scanning microscope (CLSM) images showed that the cells migrated into the depth of 600-700 μ M of the scaffold.

To investigate the effect of melatonin on osteosarcoma cells, melatonin/hydroxypropyl- β -cyclodextrin (HP β CD) inclusion complexes were produced under 900 W, 60 s and 90 s microwave conditions. Melatonin/HP β CD inclusion complexes were successfully loaded into chitosan/HAp+Mp to contain 2.267 ± 0.236 mg of melatonin per scaffold. *In vitro* release studies demonstrated that melatonin was released from tissue scaffolds within a very short time period such as 5 days and the released melatonin concentration was approximately 8 mM. The effect of melatonin/HP β CD inclusion complex-loaded tissue scaffolds on MG-63 human osteosarcoma cells was examined by *in vitro* cell culture studies and it was determined that melatonin released from this system in a high amount and very rapidly inhibited the proliferation of cancer cells in the G₀/G₁ phase of the cell cycle.

Silk films were used to study the effect of melatonin on the differentiation of hMSCs into osteoblasts and the surface of these films was modified with melatonin at different concentrations (0-2,000 μ M). In the first 24 hours, most of the melatonin was released suddenly and the release continued for 5 days. Since concentrations of melatonin at 250 μ M, 500 μ M and 1,000 μ M did not cause any toxic effects on the cells, *in vitro* cell culture studies with hMSCs were carried out using these concentrations. Studies of both growth and differentiation medium showed that, the presence of melatonin increased ALP activities of cells and RUNX2 and OCN protein expressions that were early and late differentiation markers, respectively. As a result of Von Kossa staining, it was determined that cells cultured on silk films containing melatonin synthesized mineralized nodules in the late culture period.

As a result of the obtained data, it was determined that melatonin in the micromolar concentration released from the developed tissue scaffold-based melatonin carrier system increased the proliferation of preosteoblast cells and melatonin in milimolar concentration inhibited the proliferation of osteosarcoma cells. Thus, it was concluded that this system, in which osteoinductive and anticarcinogenic properties of melatonin are effective, is suitable for osteosarcoma treatment.

Keywords: melatonin, bone tissue engineering, osteosarcoma, inclusion complex, controlled release, silk film.

TEŞEKKÜR

Öğrencisi olmaktan dolayı gurur duyduğum, bilgi ve deneyimiyle tez çalışmalarımın yönlendirilmesi ve yürütülmesi için gerekli desteği hiçbir zaman esirgemeyen, umutsuzluğa kapıldığım anlarda beni hep cesaretlendiren ve bana inanan, çalışma azmini, disiplini ve insani yönlerini hayatım boyunca örnek alacağım çok değerli hocam **Prof. Dr. Menemşe Gümüşderelioğlu**'na sonsuz saygı ve teşekkürlerimi sunarım.

Tufts Üniversitesi, Biyomedikal Mühendisliği Bölümü'nde (Boston, ABD) çalışmalarımın bir bölümünün gerçekleştirilmesi için gereken desteği sağlayan Bölüm Başkanı **Prof. Dr. David L. Kaplan'a**, bilgi ve tecrübelerini benimle paylaşan başta **Dr. Eric N. James** olmak üzere **tüm araştırma grubuna** teşekkürlerimi sunarım.

2211-A Genel Yurt İçi Doktora Burs Programı ve 2214-A Yurt Dışı Araştırma Burs Programı kapsamında maddi destek sağlayan **TÜBİTAK Bilim İnsanı Destekleme Daire Başkanlığı'na** teşekkürlerimi sunarım.

Tez çalışmama FBA-2015-5315 Kapsamlı Araştırma Projesi ile maddi destek sağlayan **Hacettepe Üniversitesi Bilimsel Araştırmalar Birimi'ne** teşekkürlerimi sunarım.

Tez izleme komitemde yer alan, değerli fikirlerini esirgemeyen hocalarım **Prof. Dr. Zümriye Aksu** ve **Prof. Dr. Mehlika Pulat'a** saygı ve teşekkürlerimi sunarım.

İyi ve kötü her anımı paylaşabildiğim, beni bıkıp usanmadan dinleyen ve hiç yalnız bırakmayan, benimle üzüлp benimle sevinen, daha nice anılar biriktirmeyi dilediğim birbirinden tatlı dostlarım **Yrd. Doç. Dr. Işıl Gerçek Beşkardeş'e**, **Dr. Anıl Sera Çakmak'a**, **Özge Ekin Tunçay'a**, **Yrd. Doç. Dr. Merve Çapkın Yurtsever'e** ve **Gökçe Kaynak Bayrak'a**,

Sorularımı hiçbir zaman yanıtsız bırakmayan, bu süreçte bilgi ve desteklerini hep hissettiğim **Yrd. Doç. Dr. Murat Şimşek** ve **Dr. Soner Çakmak'a**, birlikte çalışmaktan mutluluk duyduğum **Tuğçe Gültan'a**, **Şeyma Bektaş'a**, **Elvan Konuk'a** ve burada adını sayamadığım **Hücre ve Doku Mühendisliği Araştırma Grubu'ndaki değerli arkadaşlarıma**,

Amerika maceramın bana kazandırdığı, kısa zamanda çok şey paylaştığım, her zaman yüzümü güldüren iyi kalpli arkadaşlarım **Dr. Esra Altınok'a**, **Özgür Altınok'a**, **Ayşe Bakar Atıcı'ya** ve **Ali Eren Atıcı'ya**,

Beni ailelerine kabul eden ve kızları gibi seven, dünyalar iyisi **Filiz Annem'e**, **Nevzat Dedem'e** ve **Birsen Anneannem'e**,

Hayatım boyunca sevgisini ve desteğini esirgemeyen, bu günlere gelmemde en büyük payı olan, başarılarımın mimarı canım **Annem'e**, **Babam'a**, **Kardeşim Çisil'e** ve doğduğu günden itibaren bana hayatımda hiç tatmadığım duyguları yaşatan, varlığıyla içimi ısıtan bitanecik yeğenim **Deniz'ime**,

Sevgisi ve anlayışı ile her zaman yanımda olan ve bana kendimi dünyanın en şanslı insanı hissettiren, bu hayattaki en iyi dostum, herşeyim canım eşim **Kağan Altındal'a**,

En içten sevgi ve teşekkürlerimi sunarım.

İÇİNDEKİLER

Sayfa

ÖZET	i
ABSTRACT	iii
TEŞEKKÜR.....	v
İÇİNDEKİLER.....	vi
ŞEKİLLER DİZİNİ.....	xii
ÇİZELGELER DİZİNİ.....	xxii
SİMGELER VE KISALTMALAR.....	xxiii
1. GİRİŞ	1
2. GENEL BİLGİLER.....	4
2.1. Kemik Doku Mühendisliği	4
2.1.1. Kemik yapısı ve yeninden yapılanması	4
2.1.2. Kemik hasarlarında kullanılan klinik yöntemler	6
2.1.3. Kemik doku mühendisliği yaklaşımı	7
2.2. Melatonin.....	9
2.2.1. Sentezi ve genel özellikleri	9
2.2.2. Kemik doku üzerindeki etkisi	12
2.2.3. Kanser üzerindeki etkisi	17
2.2.3.1. Kronobiyolojik düzenleyici etkisi	17
2.2.3.2. Bağışıklık sistemini kuvvetlendirici etkisi	17
2.2.3.3. Antioksidan etkisi.....	18
2.2.3.4. Doğrudan anti-kanser etki	19
2.3. Osteosarkom ve Melatonin-Osteosarkom ilişkisi	21
2.4. Kontrollü Salım Sistemleri	22
2.5. <i>In Vitro</i> Salım Kinetiği ve Salım Mekanizmasının Belirlenmesi	24
2.6. Polimerik Nano/Mikropartiküller	27
2.6.1. Üretim yöntemleri	28
2.6.1.1. Emülsiyon oluşturma/çözücü buharlaştırma yöntemi	28
2.6.1.2. Nanoçöktürme yöntemi	30
2.6.1.3. Tuzla çöktürme yöntemi.....	31
2.6.1.4. Püskürterek kurutma yöntemi	31
2.6.1.5. Polimerizasyon yöntemi	32

2.6.2. Nano/mikropartiküllerin doku mühendisliğinde kullanım alanları.....	32
2.7. Siklodekstrinler ve İnklüzyon Kompleksleri.....	34
3. DENEYSEL ÇALIŞMALAR.....	38
3.1. Deneysel Çalışmalarda Kullanılan Kimyasallar ve Biyolojik Maddeler	39
3.2. PLGA Nano/Mikropartiküllerin Üretimi ve Karakterizasyonu.....	40
3.2.1. Boş ve melatonin yüklü PLGA nanopartiküllerin üretimi	40
3.2.2. Boş ve melatonin yüklü PLGA mikropartiküllerin üretimi	40
3.2.3. Taramalı elektron mikroskop (SEM) ile analiz.....	41
3.2.4. Partikül boyut dağılımının belirlenmesi.....	41
3.2.5. Fourier dönüşümlü toplam yansıması azaltılmış kızılötesi spektroskopisi (ATR-FTIR) analizi.....	41
3.2.6. Enkapsülasyon veriminin belirlenmesi	41
3.2.7. <i>İn vitro</i> salım çalışmaları ve salım kinetiğinin incelenmesi.....	42
3.3. MG-63 Hücrelerinin Karakterizasyonu.....	42
3.3.1. MTT analizi.....	42
3.3.2. Hücre sayımı	43
3.3.3. Floresan mikroskopu ile analiz	43
3.3.4. Kristal viyole ile boyama	43
3.4. Toksisite Çalışmaları.....	44
3.4.1. Melatoninin farklı konsantrasyonlarının MG-63 ve MC3T3-E1 hücreleri üzerindeki etkisinin incelenmesi.....	44
3.4.2. PLGA nano/mikropartiküllerinin farklı konsantrasyonlarının MG-63 hücreleri üzerindeki etkisinin incelenmesi	44
3.4.2.1. MTT analizi.....	45
3.4.2.2. Optik mikroskop ile analiz	45
3.4.3. PLGA nanopartiküllerinin MG-63 ve MC3T3-E1 hücreleri üzerindeki etkisinin incelenmesi.....	45
3.5. PLGA Nanopartikülleri ile Yürütülen Hücre İçerisine Alım Çalışmaları.....	45
3.5.1. FITC yüklü PLGA nanopartiküllerin üretimi	45
3.5.2. MG-63 ve MC3T3-E1 hücreleri ile yürütülen çalışmalar.....	45
3.6. Boş ve PLGA Nano/Mikropartikül Yüklü Kitosan Doku İskelelerinin Üretimi, Karakterizasyonu ve <i>İn Vitro</i> Hücre Kültür Çalışmaları.....	46
3.6.1. Boş kitosan doku iskelelerinin üretimi.....	46
3.6.2. Kitosan doku iskelelerine PLGA nano/mikropartiküllerin yüklenmesi.....	47

3.6.3. SEM analizi	47
3.6.4. ATR-FTIR analizi	47
3.6.5. Termogravimetrik analiz	47
3.6.6. MC3T3-E1 hücreleri ile yürütülen öncül hücre kültür çalışmaları	48
3.7. Farklı Deasetilasyon Derecesine Sahip Kitosan Doku İskelelerinin Üretimi ve Kitosan Doku İskelelerinin Hidroksiapatit (HAp) ile Modifikasyonu	49
3.7.1. SEM analizi	50
3.7.2. ATR-FTIR analizi	50
3.7.3. Mikro-bilgisayarlı tomografi (μ -CT) analizi	50
3.8. Kitosan/HAp Doku İskelelerine PLGA Nano/Mikropartiküllerin Yüklenmesi	50
3.8.1. SEM analizi	51
3.8.2. <i>İn vitro</i> salım çalışmaları ve salım kinetiğinin incelenmesi	51
3.8.3. Hücre kültür çalışmaları	51
3.8.3.1. MTT analizi	52
3.8.3.2. SEM analizi	52
3.8.3.3. Konfokal lazer taramalı mikroskop (CLSM) ile analiz	52
3.8.3.4. ALP aktivitesinin tayini	53
3.8.3.5. Kollajen analizi	53
3.8.3.6. Matris mineralizasyonunun incelenmesi	54
3.8.3.7. Gerçek zamanlı polimeraz zincir reaksiyonu (RT-PCR) ile gen ifadesi analizi ...	54
3.9. İnsan Kemik İliği Mezenkimal Kök Hücreleri (hMSC) ile Yürütülen Karakterizasyon ve <i>İn Vitro</i> Hücre Kültür Çalışmaları	56
3.9.1. Hücre karakterizasyonu	56
3.9.2. Osteojenik farklılaşma çalışmaları	56
3.10. Melatonin/HP β CD İnküzyon Kompleksi Yüklü Kitosan/HAp+Mp Doku İskelelerinin Üretimi ve Karakterizasyonu	57
3.10.1. Melatonin/HP β CD inküzyon kompleksinin doku iskelelerine yüklenme veriminin belirlenmesi	57
3.10.2. ATR-FTIR analizi	57
3.10.3. SEM analizi	58
3.10.4. <i>İn vitro</i> melatonin salım çalışmaları	58
3.10.5. MG-63 hücreleri ile yürütülen hücre kültür çalışmaları	58
3.10.5.1. MTT analizi	59

3.10.5.2. Optik mikroskop ile görüntüleme.....	59
3.10.5.3. Hücre döngü analizi.....	59
3.11. İpek Filmlerin Üretimi, Melatonin ile Modifikasyonu ve <i>In Vitro</i> Hücre Kültür Çalışmaları.....	60
3.11.1. İpek çözeltisinin hazırlanması	60
3.11.2. İpek filmlerin üretimi ve filmlere melatonin emdirilmesi	60
3.11.3. <i>In vitro</i> melatonin salım çalışmaları	61
3.11.4. Melatoninin hMSClerin proliferasyonuna etkisinin incelenmesi	61
3.11.4.1. Alamar Mavisi analizi	61
3.11.5. hMSCler ile yürütülen <i>in vitro</i> hücre kültür çalışmaları.....	61
3.11.5.1. Hücre morfolojisinin incelenmesi	62
3.11.5.2. ALP boyaması	62
3.11.5.3. Kristal viyole ile boyama ve DNA içeriğinin belirlenmesi	62
3.11.5.4. İmmün boyama çalışmaları	63
3.11.5.5. Matris mineralizasyonunun incelenmesi	63
3.12. İstatistiksel Analiz.....	64
4. DENEYSEL SONUÇLAR ve TARTIŞMALAR.....	65
4.1. PLGA Nano/Mikropartiküllerin Üretimi ve Karakterizasyonu.....	65
4.1.1. Boş PLGA nano/mikropartiküllerin üretim koşullarının belirlenmesi.....	66
4.1.2. Melatonin yüklü PLGA nano/mikropartiküllerin üretimi ve karakterizasyonu	70
4.1.2.1. Enkapsülasyon veriminin belirlenmesi	70
4.1.2.2. SEM analizi	73
4.1.2.3. ATR-FTIR analizi	74
4.1.2.4. <i>In vitro</i> melatonin salımı ve salım kinetiğinin matematiksel analizi.....	76
4.2. MG-63 Hücrelerinin Karakterizasyonu	80
4.2.1. MTT analizi ve hücre sayımı	80
4.2.2. Floresan mikroskopu ile analiz	81
4.2.3. Optik mikroskop ile analiz	83
4.3. Toksisite Çalışmaları.....	85
4.3.1. Melatonin farklı konsantrasyonlarının MG-63 ve MC3T3-E1 hücrelerinin canlılığı üzerindeki etkisinin incelenmesi	85
4.3.2. Boş ve melatonin yüklü PLGA nano/mikropartiküllerin MG-63 hücreleri ile etkileşimi.....	88

4.3.3.Boş ve melatonin yüklü PLGA nanopartiküllerin MC3T3-E1 ve MG-63 hücreleri ile etkileşimi.....	94
4.3.3.1. MTT analizi.....	94
4.3.3.2. PLGA nanopartiküllerin hücre içerisine alımının incelenmesi	96
4.4. Boş ve PLGA Nano/Mikropartikül Yüklü Kitosan Doku İskelelerinin Üretimi ve Karakterizasyonu.....	99
4.4.1.Boş kitosan doku iskelelerinin üretimi ve karakterizasyonu.....	99
4.4.1.1. SEM analizi	100
4.4.1.2. ATR-FTIR analizi	101
4.4.1.3. Termogravimetrik analiz	102
4.4.2.PLGA nano/mikropartikül yüklü kitosan doku iskelelerinin üretimi ve karakterizasyonu	104
4.4.2.1. SEM analizi	104
4.4.2.2. ATR-FTIR analizi	107
4.4.3.MC3T3-E1 hücreleri ile yürütülen öncül hücre kültür çalışmaları.....	108
4.4.3.1. Etilen oksit gazı ile sterillenen kitosan doku iskeleleri ile yürütülen çalışmalar	109
4.4.3.2. Etanol-UV ile sterillenen kitosan doku iskeleleri ile yürütülen çalışmalar	109
4.5. Farklı Deasetilasyon Derecesine Sahip Kitosan Doku İskeleleri ve Kitosan/HAp Doku İskelelerinin Üretimi, Karakterizasyonu ve Hücre Kültür Çalışmaları	111
4.5.1.SEM analizi.....	112
4.5.2.ATR-FTIR analizi	113
4.5.3. μ -CT analizi	114
4.5.4.Hücre kültür çalışmaları	114
4.5.4.1. MTT analizi	115
4.5.4.2. SEM analizi	116
4.6. Kitosan/HAp doku iskelelerine PLGA nano/mikropartiküllerin yüklenmesi	119
4.6.1.Kitosan/HAp doku iskelelerinden melatoninin <i>in vitro</i> salım kinetiği	121
4.6.2.Kitosan/HAp doku iskeleleri ile yürütülen hücre kültür çalışmaları	124
4.6.2.1. MTT analizi.....	124
4.6.2.2. SEM analizi	126
4.6.2.3. CLSM analizi	132
4.6.2.4. ALP aktivitesinin tayini.....	133
4.6.2.5. Kollajen analizi.....	135

4.6.2.6. Matris mineralizasyonunun incelenmesi	136
4.6.2.7. RT-PCR analizi	137
4.7. hMSCler ile Yürütülen <i>İn Vitro</i> Hücre Kültür Çalışmaları	142
4.7.1. hMSClerin karakterizasyonu.....	142
4.7.2. Kitosan/HAp+Mp doku iskeleleri ile yürütülen <i>in vitro</i> hücre kültür çalışmaları ...	144
4.8. Kitosan/HAp Doku İskelelerine Melatonin/HP β CD İnküzyon Kompleksinin Yüklenmesi, Karakterizasyon ve <i>İn Vitro</i> Hücre Kültür Çalışmaları	147
4.8.1. SEM analizi	148
4.8.2. ATR-FTIR analizi	149
4.8.3. <i>İn vitro</i> melatonin salımı	150
4.8.4. MTT analizi.....	150
4.8.5. Optik mikroskop ile görüntüleme	151
4.8.6. Hücre döngü analizi	153
4.9. İpek Filmlerin Üretimi, Melatonin ile Modifikasyonu ve Hücre Kültür Çalışmaları	155
4.9.1. İpek filmlerin üretimi	155
4.9.2. İpek filmlerin yüzeyinin melatonin ile modifikasyonu.....	156
4.9.3. Melatoninin hMSClerin proliferasyonuna etkisinin incelenmesi	157
4.9.4. <i>İn vitro</i> melatonin salım çalışmaları.....	158
4.9.5. İpek filmler üzerinde kültüre edilen hMSClerin osteojenik farklılaşmasının incelenmesi.....	160
4.9.5.1. Hücre canlılığının belirlenmesi	160
4.9.5.2. Hücre morfolojisinin incelenmesi	162
4.9.5.3. ALP aktivitesinin tayini.....	163
4.9.5.4. İmmün boyama çalışmaları	164
4.9.5.5. Matris mineralizasyonu	168
5. GENEL SONUÇLAR.....	170
KAYNAKLAR.....	174
EK 1	189
EK 2	190
EK 3	191
ÖZGEÇMİŞ	192

ŞEKİLLER DİZİNİ

Sayfa

Şekil 2.1. Kemiğin yapısı ve hiyerarşik organizasyonu ([1]'den değiştirilerek).....	5
Şekil 2.2. Kemiğin yeniden yapılanması ([15]'ten değiştirilerek).	6
Şekil 2.3. Kemik doku mühendisliği yaklaşımı ([18]'den değiştirilerek).	7
Şekil 2.4. Melatoninin (a) kimyasal yapısı ve (b) moleküler gösterimi.	9
Şekil 2.5. Melatonin sentezi ([29]'dan değiştirilerek).....	10
Şekil 2.6. Melatoninin beyindeki üretim yolağı ([29]'dan değiştirilerek).....	11
Şekil 2.7. Melatonin seviyesi ve kemik yıkımı arasında 24 saatlik döngüdeki ilişki ([46]'dan değiştirilerek).....	13
Şekil 2.8. Melatoninin kemik ve kemik hücreleri üzerindeki etki mekanizmaları: (A) MT ₂ melatonin reseptörü aracılığıyla mezenkimal kök hücrelerin osteoblastlara farklılaşmasını sağlar; (B) preosteoblastlarda OPN üretimini tetikleyerek RANKL'nin preosteoklastlara bağlanmasını engeller ve osteoklast aktivitesini inhibe eder; (C) serbest radikal süpürücü ve antioksidan özelliklerinden dolayı kemik yıkımını engeller. PTH (paratiroid hormon), OPN (osteopontin), BMP (kemik morfogenetik protein), ALP (alkalen fosfataz), OCN (osteokalsin), TRAP (tartarat dirençli asit fosfataz), OPG (osteoprotegerin), CTR (kalsitonin reseptörü) ([46]'dan değiştirilerek).	14
Şekil 2.9. Melatoninin kemik metabolizması üzerindeki etkisini sağlayan hücre içi sinyal yolları ([46]'dan değiştirilerek).	15
Şekil 2.10. Hücre döngü fazları (A) ve akış sitometrisi ile belirlenmiş diploid DNA'ya ait histogramı ([89]'dan değiştirilerek).	20
Şekil 2.11. İlaç-plazma konsantrasyonunun zamana bağlı değişimi: a) standart dozaj şekli, b) kontrollü salım yapan dozaj şekli ([98]'den değiştirilerek).	23
Şekil 2.12. (a) Monolitik ve (b) rezervuar sistemlerin yapısı ([99]'dan değiştirilerek).	24
Şekil 2.13. Nano/mikro partiküllerin şematik gösterimi ([109]'dan değiştirilerek).....	27
Şekil 2.14. Tekli emülsiyon oluşturma/çözücü buharlaştırma yöntemi ile nano/mikropartikül üretimi ([113]'ten değiştirilerek).	29

Şekil 2.15. İkili emülsiyon oluşturma/çözücü buharlaştırma yöntemi ile nano/mikropartikül üretimi ([113]'ten değiştirilerek).....	29
Şekil 2.16. Emülsiyon oluşturma/çözücü buharlaştırma ve nanoçöktürme yöntemi arasındaki farklılıkları gösteren deneysel basamaklar ([111]'den değiştirilerek).....	30
Şekil 2.17. Tuzla çöktürme yöntemi ile nano/mikropartiküllerin üretimi ([99]'dan değiştirilerek).....	31
Şekil 2.18. Siklodekstrinlerin (a) kimyasal, (b) üç boyutlu moleküler yapısı ([122]'den değiştirilerek).....	34
Şekil 2.19. Farklı sitokiyometrik oranlardaki inklüzyon komplekslerinin şematik gösterimi ([126]'dan değiştirilerek).....	36
Şekil 2.20. Melatoninin çeşitli siklodekstrinler ile oluşturduğu inklüzyon komplekslerinin şematik gösterimi ([128]'den değiştirilerek).....	36
Şekil 3.1. MC3T3-E1 hücreleri ile gerçekleştirilen öncül hücre kültür çalışmalarının şematik gösterimi.....	49
Şekil 4.1. PLGA nanopartiküllerin boyut ve boyut dağılımlarını gösteren grafikler: (a) homojenizasyon hızı: 8,000 rpm, homojenizasyon süresi: 5 dk, (b) homojenizasyon hızı: 8,000 rpm, homojenizasyon süresi: 7 dk ve (c) homojenizasyon hızı: 15,000 rpm, homojenizasyon süresi: 7 dk.	67
Şekil 4.2. Farklı homojenizasyon koşullarında üretilen boş PLGA nanopartiküllerin SEM görüntüleri: (a) homojenizasyon hızı: 8,000 rpm ve homojenizasyon süresi: 5 dk (10,000 X), (b) homojenizasyon hızı: 8,000 rpm ve homojenizasyon süresi: 5 dk (20,000 X), (c) homojenizasyon hızı: 15,000 rpm ve homojenizasyon süresi: 7 dk (20,000 X) ve (d) homojenizasyon hızı: 15,000 rpm ve homojenizasyon süresi: 7 dk (40,000 X).	68
Şekil 4.3. Boş PLGA mikropartiküllerin farklı büyütmelelerdeki SEM görüntüleri: (a) 1,000 X, (b) 10,000 X.....	69
Şekil 4.4. Melatoninin enkapsülasyon verimi hesabında kullanılan kalibrasyon grafiği. ...	71
Şekil 4.5. Ağırlıkça %10 melatonin yüklü PLGA nanopartiküllerin farklı büyütmelelerdeki SEM görüntüleri: (a) 20,000 X ve (b) 30,000 X; ağırlıkça %20 melatonin yüklü PLGA mikropartiküllerin farklı büyütmelelerdeki SEM görüntüleri: (c) 5,000 X ve (d) 10,000 X.	74

Şekil 4.6. PLGA nano/mikropartikül üretiminde kullanılan bileşenlere ve PLGA nano/mikropartiküllere ait ATR-FTIR spektrumları.	75
Şekil 4.7. (a) PLGA nanopartiküllerden ve (b) PLGA mikropartiküllerden kümülatif yüzde melatonin salımı.	76
Şekil 4.8. a) PLGA nanopartiküllerden, b) PLGA mikropartiküllerden kümülatif salınan melatonin miktarı.....	77
Şekil 4.9. (a) MTT analizi sonucu elde edilen MG-63 hücre üreme grafiği, (b) hemositometrik sayım sonucu elde edilen üreme grafiği.	80
Şekil 4.10. MG-63 hücrelerinin floresan mikroskop görüntüleri: (a) 2. gün (10 X), (b) 4. gün (10 X), (c) 2. gün (20 X), (d) 4. gün (20 X), (e) 2. gün (40 X), (f) 4. gün (40 X), (g) 7. gün (10 X), (h) 14. gün (10 X), (i) 7. gün (20 X), (j) 14. gün (20 X), (k) 7. gün (40 X), (l) 14. gün (40 X). (Fotoğraflardaki mavi renk hücre çekirdeklerini, yeşil renk ise hücre iskeletlerini göstermektedir).	82
Şekil 4.11. Kristal viyole ile boyanan MG-63 hücreleri (a) 1. gün (10 X), (b) 5. gün (10 X), (c) 1. gün (20 X), (d) 5. gün (20 X), (e) 1. gün (40 X), (f) 5. gün (40 X), (g) 9. gün (10 X), (h) 16. gün (10 X), (i) 9. gün (20 X), (j) 16. gün (20 X), (k) 9. gün (40 X), (l) 16. gün (40 X).	84
Şekil 4.12. MC3T3-E1 hücrelerinin farklı melatonin miktarlarını içeren kültür ortamlarındaki MTT grafikleri. (İstatistiksel olarak anlamlı farklar: 0 µM melatonin içeren grup kontrol iken: * p<0.05, ** p<0.01, *** p<0.001).	85
Şekil 4.13. MG-63 hücrelerinin farklı melatonin miktarlarını içeren kültür ortamlarındaki MTT grafikleri. (İstatistiksel olarak anlamlı farklar: 0 µM melatonin içeren grup kontrol iken: * p<0.05, ** p<0.01, *** p<0.001).	86
Şekil 4.14. Melatoninin farklı konsantrasyonları ile etkileşen MC3T3-E1 hücrelerinin kültürün 3. gününe ait optik mikroskop görüntüleri (10 X).	87
Şekil 4.15. Melatoninin farklı konsantrasyonları ile etkileşen MG-63 hücrelerinin kültürün 3. gününe ait optik mikroskop görüntüleri (10 X).	88
Şekil 4.16. Boş ve melatonin yüklü PLGA nanopartikülleri ile etkileştirilen MG-63 hücrelerinin MTT sonuçlarını gösteren grafik. (İstatistiksel olarak anlamlı farklar: TCPS kontrol grubu iken: * p<0.05, ** p<0.01, *** p<0.001).	89

Şekil 4.17. Boş ve melatonin yüklü PLGA mikropartikülleri ile etkileştirilen MG-63 hücrelerinin MTT sonuçlarını gösteren grafik. (İstatistiksel olarak anlamlı farklar: TCPS kontrol grubu iken: * $p<0.05$, ** $p<0.01$, *** $p<0.001$).	90
Şekil 4.18. TCPS'te üreyen MG-63 hücrelerinin optik mikroskop görüntüleri (20 X): (a) 1. gün, (b) 2. gün ve (c) 3. gün.	91
Şekil 4.19. Farklı miktarlarda PLGA nanopartikülleri ile etkileşen MG-63 hücrelerinin kültürün 2. gününe ait optik mikroskop görüntüleri (20 X): (a) 0.05 mg/cm ² PLGA nano (boş), (b) 0.05 mg/cm ² PLGA nano-10, (c) 0.5 mg/cm ² PLGA nano (boş), (d) 0.5 mg/cm ² PLGA nano-10, (e) 5 mg/cm ² PLGA nano (boş), (f) 5 mg/cm ² PLGA nano-10.	92
Şekil 4.20. Farklı miktarlarda PLGA mikropartikülleri ile etkileşen MG-63 hücrelerinin kültürün 2. gününe ait optik mikroskop görüntüleri (20 X): a) 0.05 mg/cm ² PLGA mikro (boş), b) 0.05 mg/cm ² PLGA mikro-20, c) 0.5 mg/cm ² PLGA mikro (boş), d) 0.5 mg/cm ² PLGA mikro-20, e) 5 mg/cm ² PLGA mikro (boş), f) 5 mg/cm ² PLGA mikro-20.....	93
Şekil 4.21. Boş ve melatonin yüklü PLGA nanopartikülleri ile etkileşen MC3T3-E1 hücrelerinin MTT değerleri. (İstatistiksel olarak anlamlı farklar: TCPS kontrol grubu iken: * $p<0.05$, ** $p<0.01$, *** $p<0.001$).	94
Şekil 4.22. Boş ve melatonin yüklü PLGA nanopartikülleri ile etkileşen MG-63 hücrelerinin MTT değerleri. (İstatistiksel olarak anlamlı farklar: TCPS kontrol grubu iken: * $p<0.05$, ** $p<0.01$, *** $p<0.001$).	95
Şekil 4.23. PLGA nanopartiküller ile etkileştirilen MC3T3-E1 hücrelerinin floresan mikroskop görüntüleri: (a) 1 sa inkübasyon (4 X), (b) 1 sa inkübasyon (32 X), (c) 5 sa inkübasyon (32 X), (d) 24 sa inkübasyon (32 X). Yeşil alanlar FITC-yüklü nanopartikülleri, mavi alanlar ise hücre çekirdeğini ifade etmektedir.	96
Şekil 4.24. PLGA nanopartikülleri ile etkileştirilen MG-63 hücrelerinin floresan mikroskop görüntüleri: (a) 1 sa inkübasyon (4 X), (b) 1 sa inkübasyon (32 X), (c) 5 sa inkübasyon (32 X), (d) 24 sa inkübasyon (32 X). Yeşil alanlar FITC-yüklü nanopartikülleri, mavi alanlar ise hücre çekirdeğini ifade etmektedir.	97
Şekil 4.25. FITC-yüklü PLGA nanopartiküllerin hücre içerisine alım yüzdesi: (a) MC3T3-E1 hücreleri ve (b) MG-63 hücreleri.	98
Şekil 4.26. Etanol ile nötralize edilen kitosan doku iskelelerinin farklı büyütmelelerdeki SEM görüntüleri: (a) 100 X, (b) 250 X, (c) 500 X, (d) 1,000 X; sodyum karbonat ile nötralize	

edilen kitosan doku iskelelerinin farklı büyütmelelerdeki SEM görüntüleri: (e) 100 X, (f) 250 X, (g) 500 X, (h) 1,000 X.	100
Şekil 4.27. Kitosan doku iskelelerine ait ATR-FTIR spektrumları: (a) nötrale edilmemiş, (b) etanol ile nötrale edilmiş ve (c) sodyum karbonat ile nötrale edilmiş.	101
Şekil 4.28. (a) Nötrale edilmemiş, (b) etanol ile nötrale edilmiş ve (c) sodyum karbonat ile nötrale edilmiş kitosan doku iskelelerine ait termogramlar.	103
Şekil 4.29. İskele başına 1 mg PLGA nanopartikül içeren kitosan+Np doku iskelelerinin farklı büyütmelelerdeki SEM görüntüleri: (a) 250 X, (b) 500 X, (c) 1,000 X ve (d) 10,000 X; iskele başına 1 mg PLGA nanopartikül içeren kitosan-Np doku iskelelerinin farklı büyütmelelerdeki SEM görüntüleri: (e) 250 X, (f) 500 X, (g) 1,000 X ve (h) 10,000 X. (Beyaz oklar iskele içerisindeki nanopartikülleri göstermektedir).	105
Şekil 4.30. İskele başına 2 mg PLGA nanopartikül içeren kitosan+Np doku iskelelerinin farklı büyütmelelerdeki SEM görüntüleri: a) 250 X, b) 500 X, c) 1,000 X ve d) 2,500 X. .	106
Şekil 4.31. 1 mg PLGA mikropartikül içeren kitosan+Mp doku iskelelerinin SEM görüntüleri: (a) 100 X, (b) 250 X, (c) 5,000 X ve (d) 10,000 X.	107
Şekil 4.32. PLGA nano/mikropartikül içeren ve içermeyen kitosan doku iskelelerine ait ATR-FTIR spektrumları: (a) boş kitosan doku iskelesi, (b) PLGA nanopartikül içeren kitosan doku iskelesi (kitosan+Np) ve (c) PLGA mikropartikül içeren kitosan doku iskelesi (kitosan+Mp).	108
Şekil 4.33. Etilen oksit gazı ile sterillenen kitosan doku iskelelerinde üreyen MC3T3-E1 hücrelerine ait MTT grafiği.	109
Şekil 4.34. (a) Etanol ve (b) sodyum karbonat ile nötrale edilen kitosan doku iskelelerinde üreyen MC3T3-E1 hücrelerine ait MTT grafiği.	110
Şekil 4.35. Kitosan doku iskelelerinin farklı büyütmelelerdeki SEM görüntüleri: %75-85 deasetilasyon derecesine sahip kitosan doku iskelesi (a) 250 X, (b) 500 X; >%85 deasetilasyon derecesine sahip kitosan doku iskelesi (c) 250 X, (d) 500 X; Kitosan/toz HAp doku iskelesi (e) 250 X, (f) 500 X; Kitosan/boncuk HAp doku iskelesi g) 250 X, h) 500 X. (Toz ve boncuk formdaki HAp partiküller beyaz oklarla gösterilmiştir).	112
Şekil 4.36. ATR-FTIR spektrumları: (a) kitosan doku iskelesi, (b) kitosan/boncuk HAp doku iskelesi ve (c) boncuk formdaki HAp.	113

Şekil 4.37. Kitosan/boncuk HAp doku iskelesine ait μ CT görüntüleri: (a) xy ekseninde merkez görüntüsü ve (b) xyz ekseninde genel görünüm.	114
Şekil 4.38. Farklı deasetilasyon derecelerine sahip kitosan doku iskeleleri ile toz ve boncuk formundaki HAp ile modifiye edilen kitosan/HAp doku iskeleleri üzerinde kültüre edilen MC3T3-E1 hücrelerinin MTT sonuçları. (İstatistiksel olarak anlamlı farklar: %75-85 DD kitosan kontrol grubu iken: * $p<0.05$, ** $p<0.01$, *** $p<0.001$; kitosan/toz HAp kontrol grubu iken: ● $p<0.05$, ●● $p<0.01$, ●●● $p<0.001$, $n=3$).	115
Şekil 4.39. %75-85 DD'ye sahip kitosan doku iskeleleri üzerinde üreyen MC3T3-E1 hücrelerinin SEM görüntüleri: (a) 14. gün (500 X), (b) 14. gün (1,000 X), (c) 21. gün (500 X), (d) 21. gün (1,000 X); >%85 DD'ye sahip kitosan doku iskeleleri üzerinde üreyen MC3T3-E1 hücrelerinin SEM görüntüleri: (e) 14. gün (500 X), (f) 14. gün (2,000 X), (g) 21. gün (500 X), (h) 21. gün (2,000 X). (Hücreler beyaz oklarla gösterilmiştir).	117
Şekil 4.40. Kitosan/toz HAp doku iskeleleri üzerinde üreyen MC3T3-E1 hücrelerinin SEM görüntüleri: (a) 14. gün (500 X), (b) 14. gün (2,000 X), (c) 21. gün (500 X), (d) 21. gün (5,000 X); Kitosan/boncuk HAp doku iskeleleri üzerinde üreyen MC3T3-E1 hücrelerinin SEM görüntüleri: (e) 14. gün (500 X), (f) 14. gün (5,000 X), (g) 21. gün (500 X), (h) 21. gün (5,000 X).	118
Şekil 4.41. İskele başına 1 mg partikül yüklenen kitosan/HAp doku iskelelerine ait farklı büyütmelelerdeki SEM görüntüleri: (a) kitosan/HAp+Mp (250 X), (b) kitosan/HAp+Mp (2,500 X), (c) kitosan/HAp+Np (250 X), (d) kitosan/HAp+Np (2,500 X), (e) kitosan/HAp-Np (250 X) ve (f) kitosan/HAp-Np (5,000 X).	119
Şekil 4.42. İskele başına 0.5 mg partikül yüklenen kitosan/HAp doku iskelelerine ait farklı büyütmelelerdeki SEM görüntüleri: (a) kitosan/HAp+Mp (250 X), (b) kitosan/HAp+Mp (1,000 X), (c) kitosan/HAp-Mp (250 X), (d) kitosan/HAp-Mp (1,000 X), (e) kitosan/HAp+Np (250 X), (f) kitosan/HAp+Np (1,000 X), (g) kitosan/HAp-Np (250 X) ve (h) kitosan/HAp-Np (1,000 X). Küçük fotoğraflar iskelelerin 10,000X büyütmelelerine aittir.	120
Şekil 4.43. PLGA mikropartikül yüklü doku iskelelerinden kümülatif yüzde melatonin salımı: (a) kitosan/HAp+Mp, (b) kitosan/HAp-Mp.	121
Şekil 4.44. PLGA nanopartikül yüklü doku iskelelerinden kümülatif yüzde melatonin salımı: a) kitosan/HAp+Np, b) kitosan/HAp-Np.	122

Şekil 4.45. Kitosan/HAp-bazlı doku iskelelerinde kültüre edilen MC3T3-E1 hücrelerinin 28 günlük MTT sonuçları. (İstatistiksel olarak anlamlı farklar: n=3, * p<0.05, ** p<0.01, *** p<0.001, kitosan/HAp kontrol grubudur).	124
Şekil 4.46. Doku iskelelerinde üreyen MC3T3-E1 hücrelerinin kültürün 7. gününe ait yatay kesit SEM görüntüleri: (a) kitosan/HAp (250 X), (b) kitosan/HAp (2,000 X), (c) kitosan/HAp+Mp (250 X), (d) kitosan/HAp+Mp (2,000X), (e) kitosan/HAp-Mp (250 X), (f) kitosan/HAp-Mp (2,000 X), (g) kitosan/HAp+Np (250 X), (h) kitosan/HAp+Np (2,000 X), (i) kitosan/HAp-Np (250 X), (j) kitosan/HAp-Np (2,000 X).	127
Şekil 4.47. Doku iskelelerinde üreyen MC3T3-E1 hücrelerinin kültürün 14. gününe yatay kesit SEM görüntüleri: (a) kitosan/HAp (250 X), (b) kitosan/HAp (2,000 X), (c) kitosan/HAp+Mp (250 X), (d) kitosan/HAp+Mp (2,000X), (e) kitosan/HAp-Mp (250 X), (f) kitosan/HAp-Mp (2,000 X), (g) kitosan/HAp+Np (250 X), (h) kitosan/HAp+Np (2,000 X), (i) kitosan/HAp-Np (250 X), (j) kitosan/HAp-Np (2,000 X).	128
Şekil 4.48. Doku iskelelerinde üreyen MC3T3-E1 hücrelerinin kültürün 21. gününe yatay kesit SEM görüntüleri: (a) kitosan/HAp (250 X), (b) kitosan/HAp (2,000 X), (c) kitosan/HAp+Mp (250 X), (d) kitosan/HAp+Mp (2,000X), (e) kitosan/HAp-Mp (250 X), (f) kitosan/HAp-Mp (2,000 X), (g) kitosan/HAp+Np (250 X), (h) kitosan/HAp+Np (2,000 X), (i) kitosan/HAp-Np (250 X), (j) kitosan/HAp-Np (2,000 X).	129
Şekil 4.49. Doku iskelelerinde üreyen MC3T3-E1 hücrelerinin kültürün 21. gününe ait dikey kesit SEM görüntüleri: (a) kitosan/HAp (500 X), (b) kitosan/HAp (2,000 X), (c) kitosan/HAp+Mp (250 X), (d) kitosan/HAp+Mp (1,000X), (e) kitosan/HAp-Mp (250 X), (f) kitosan/HAp-Mp (1,000 X), (g) kitosan/HAp+Np (250 X), (h) kitosan/HAp+Np (5,000 X), (i) kitosan/HAp-Np (250 X), (j) kitosan/HAp-Np (1,000 X).	131
Şekil 4.50. Doku iskelelerinin 600 µm derinliğinde bulunan MC3T3-E1 hücrelerinin 21. gün konfokal mikroskop görüntüleri (20 X): (a) kitosan/HAp, (b) kitosan/HAp+Mp, (c) kitosan/HAp-Mp, (d) kitosan/HAp+Np, (e) kitosan/HAp-Np. (F-aktin yapıları yeşil, hücre çekirdeği kırmızı ile boyanmıştır).	133
Şekil 4.51. MC3T3-E1 hücrelerinin zamana bağlı ALP aktiviteleri. (İstatistiksel olarak anlamlı farklar: n=3, * p<0.05, ** p<0.01, *** p<0.001, kitosan/HAp kontrol grubudur).	134

Şekil 4.52. Kitosan/HAp-bazlı doku iskelelerinde sentezlenen kollajen miktarları. (İstatistiksel olarak anlamlı farklar: n=3, * p<0.05, ** p<0.01, *** p<0.001, kitosan/HAp kontrol grubudur).....	135
Şekil 4.53. Kitosan/HAp-bazlı doku iskelelerinin Von Kossa boyaması sonrası görüntüsü.	137
Şekil 4.54. Kitosan/HAp-bazlı iskelelerde üreyen MC3T3-E1 hücrelerine ait bağıl <i>Coll</i> gen ifadesi grafiği. (İstatistiksel olarak anlamlı farklılık, n=3, kontrol grubu kitosan/HAp iken * p<0.05, ** p<0.01, *** p<0.001).	138
Şekil 4.55. Kitosan/HAp-bazlı iskelelerde üreyen MC3T3-E1 hücrelerine ait bağıl <i>RunX2</i> gen ifadesi grafiği. (İstatistiksel olarak anlamlı farklılık, n=3, kontrol grubu kitosan/HAp iken * p<0.05, ** p<0.01, *** p<0.001).	139
Şekil 4.56. Kitosan/HAp-bazlı iskelelerde üreyen MC3T3-E1 hücrelerine ait bağıl <i>Ocn</i> gen ifadesi grafiği. (İstatistiksel olarak anlamlı farklılık, n=3, kontrol grubu kitosan/HAp iken * p<0.05, ** p<0.01, *** p<0.001).	140
Şekil 4.57. Kitosan/HAp-bazlı iskelelerde üreyen MC3T3-E1 hücrelerine ait bağıl <i>Opn</i> gen ifadesi grafiği. (İstatistiksel olarak anlamlı farklılık, n=3, kontrol grubu kitosan/HAp iken * p<0.05, ** p<0.01, *** p<0.001).	141
Şekil 4.58. hMSClere ait (a) MTT analizi sonucu elde edilen hücre üreme grafiği, (b) hemositometrik sayım sonucu elde edilen üreme grafiği ve (c) optik mikroskop görüntüleri (10 X).....	143
Şekil 4.59. Kitosan/HAp+Mp doku iskelelerinde kültüre edilen hMSClerin MTT sonuçları. (İstatistiksel olarak anlamlı farklar: n=3, *p<0.05, **p<0.01, ***p<0.001, kitosan/HAp+Mp(-) kontrol grubudur).	144
Şekil 4.60. Kitosan/HAp+Mp(-) iskelelerinde üreyen hMSClerin SEM görüntüleri: (a) 7.gün (500 X), (b) 7. gün (2,000 X), (c) 28. gün (500 X), (d) 28. gün (2,000 X); Kitosan/HAp+Mp(+) iskelelerinde üreyen hMSClerin SEM görüntüleri: (e) 7.gün (500 X), (f) 7. gün (2,000 X), (g) 28. gün (500 X), (h) 28. gün (2,000 X). Beyaz oklar hücreleri göstermektedir.	146
Şekil 4.61. Melatonin/HPβCD yüklü kitosan/HAp+Mp doku iskelelerinin farklı büyütmelelerdeki SEM görüntüleri: (a) 250 X, (b) 1,000 X, (c) 2,000 X ve (d) 3,000 X.	

(Kırmızı oklar iskele içerisindeki melatonin/HP β CD inklüzyon kompleksini göstermektedir).....	148
Şekil 4.62. (a) Kitosan/HA+Mp ve (b) kitosan/HA+Mp/ik doku iskelelerine ait ATR-FTIR spektrumları.	149
Şekil 4.63. Kitosan/HAp+Mp doku iskelelerinden salınan melatoninin: a) yüzde kümülatif salım değerleri, b) iskele başına salınan miktarları.	150
Şekil 4.64. Kitosan/HAp doku iskeleleri ile dolaylı olarak etkileşen MG-63 hücrelerinin MTT sonuçlarını gösteren grafik. (İstatistiksel olarak anlam farklılığı, kitosan/HAp+Mp(-) kontrol grubu iken, * p<0.05, ** p<0.01, *** p<0.001).	151
Şekil 4.65. Doku iskeleleri ile etkileştirilen MG-63 hücrelerine ait optik mikroskop görüntüleri (10 X).....	152
Şekil 4.66. Akış sitometrisinden elde edilen histogramlar: (a) Kitosan/HAp+Mp(-), (b) Kitosan/HAp+Mp(+), (c) Kitosan/HAp+Mp(-)/ik ve (d) Kitosan/HAp+Mp(+)/ik.....	153
Şekil 4.67. Doku iskeleleri ile dolaylı olarak etkileşen MG-63 hücrelerinin hücre döngü analiz sonuçları. (İstatistiksel olarak anlam farklılığı, kitosan/HAp+Mp(-) kontrol grubu iken, * p<0.05, ** p<0.01, *** p<0.001).	154
Şekil 4.68. Melatonin ile modifiye edilmiş ipek filmler üzerinde kültüre edilen hMSClerin mitokondriyal aktiviteleri. (İstatistiksel olarak anlam farklılığı, 0 μ M kontrol grubu iken, * p<0.05, ** p<0.01, *** p<0.001).	158
Şekil 4.69. Salınan melatonin konsantrasyonunun belirlenmesi için kullanılan kalibrasyon grafiği.	159
Şekil 4.70. (a) Metanol ile tavlanmış, (b) su ile tavlanmış ipek filmlerden kümülatif yüzde melatonin salımı.	159
Şekil 4.71. İpek filmler üzerinde kültüre edilen hücrelerin mitokondriyal aktiviteleri: (a) büyüme ortamı, (b) farklılaşma ortamı. (İstatistiksel olarak anlam farklılığı, 0 μ M kontrol grubu iken, * p<0.05, ** p<0.01, *** p<0.001).	161
Şekil 4.72. İpek filmler üzerinde büyüme ve farklılaşma ortamında kültüre edilen hücrelerin kültürün 7. gününe ait floresan mikroskop görüntüleri (mavi renk: hücre çekirdeğini; kırmızı renk: aktin filamentlerini göstermektedir, 10 X büyütme, ölçek çubukları 100 μ M'yi temsil etmektedir).....	162

Şekil 4.73. İpek filmler üzerinde kültüre edilen hMSClerin ALP aktiviteleri: (a) büyüme ortamı, (b) farklılaşma ortamı. (İstatistiksel olarak anlam farklılığı, 0 μ M kontrol grubu iken, * $p<0.05$, ** $p<0.01$, *** $p<0.001$); (c) büyüme ortamında ve (d) farklılaşma ortamında kültüre edilen hMSClerin kültürün 7. günündeki ALP boyama görüntüleri (4 X). 163

Şekil 4.74. Büyüme ve farklılaşma ortamında yüzeyi melatonin ile modifiye edilmiş ipek filmler üzerinde kültüre edilen hMSClerin kültürün 7. gününe ait RUNX2 ve OCN immün boyama görüntüleri (mavi renk: hücre çekirdeğini; yeşil renk: RUNX2 ve OCN ekspresyonlarını göstermektedir, 10 X büyütme, ölçek çubukları 100 μ M'yi temsil etmektedir). 165

Şekil 4.75. Büyüme ve farklılaşma ortamında yüzeyi melatonin ile modifiye edilmiş ipek filmler üzerinde kültüre edilen hMSClerin kültürün 14. gününe ait RUNX2 ve OCN immün boyama görüntüleri (mavi renk: hücre çekirdeğini; yeşil renk: RUNX2 ve OCN ekspresyonlarını göstermektedir, 10 X büyütme, ölçek çubukları 100 μ M'yi temsil etmektedir). 167

Şekil 4.76. İpek filmler üzerinde kültüre edilen hMSClerin kültürün 21. günündeki Von Kossa boyama görüntüleri (4 X büyütme, ölçek çubukları 100 μ M'yi temsil etmektedir). 168

ÇİZELGELER DİZİNİ

Sayfa

Çizelge 2.1. Farklı geometrik şekildeki salım sistemleri için “n” parametresinin değerleri ve salım mekanizmaları.....	27
Çizelge 3.1. RT-PCR analizinde kullanılan primer dizileri.....	55
Çizelge 4.1. Üretim koşullarının boş PLGA nanopartiküllerin üretim verimine ve ortalama çapına olan etkisi (partikül sayısı=100).....	66
Çizelge 4.2. Melatonin yüklü PLGA nano/mikropartiküllerin enkapsülasyon verim değerleri (n=3).	72
Çizelge 4.3. PLGA nano/mikropartiküllerden salınan kümülatif melatonin miktarları.	77
Çizelge 4.4. PLGA nano/mikropartiküllerden melatonin salım kinetiği ve mekanizması. .	79
Çizelge 4.5. Kitosan/HAp doku iskelelerinden salınan toplam melatonin miktarları.	123
Çizelge 4.6. Kitosan/HAp doku iskelelerinden melatonin salım kinetiği ve mekanizması.	123
Çizelge 4.7. İpek filmlerden salınan kümülatif melatonin miktarları.....	160

SİMGELER VE KISALTMALAR

Simgeler

AgNO ₃	Gümüş Nitrat
CO ₂	Karbon Diyoksit
D	Difüzyon Katsayısı (cm ² /s)
Gy	Gray
HCl	Hidroklorik Asit
J	Ak ₁ (g/cm ² .s)
kDa	Kilodalton
K ₀	Sıfırıncı Derece Salım Hız Sabiti
K ₁	Birinci Derece Salım Hız Sabiti
K _H	Higuchi Salım Hız Sabiti
K _{HC}	Hixson-Crowell Salım Hız Sabiti
LiBr	Lityum Bromür
M _w	Molekül Ağırlığı
Na ₂ CO ₃	Sodyum Karbonat
α	Alfa
β	Beta
γ	Gama
t _d	İkilenme Süresi
v/v	Hacim/Hacim Oranı
w/v	Ağırlık/Hacim Oranı
w/w	Ağırlık/Ağırlık Oranı

Kısaltmalar

ALP	Alkalen Fosfataz
ANOVA	Tek Yönlü Varyans Analizi
ATP	Adenozin Trifosfat
ATR-FTIR	Fourier Dönüşümlü Toplam Yansıması Azaltılmış Kızılötesi Spektroskopisi
bFGF	Bazik Fibroblast Büyüme Faktörü
BMP	Kemik Morfogenetik Protein

BSA	Sığır Serum Albümin
CD	Siklodekstrin
cDNA	Komplementer DNA
CLSM	Konfokal Lazer Taramalı Mikroskopu
Col1	Tip I Kollajen
CTR	Kalsitonin Reseptörü
DAPI	4'-6-Diamidino-2-Fenilindol
DCM	Diklorometan
DD	Deasetilasyon Derecesi
dk	Dakika
DMAB	Didodesil Dimetil Amonyum Bromür
DMEM	Dulbecco's Modified Eagle Medium
DNA	Deoksi Ribonükleik Asit
DPBS	Dulbecco Fosfat Tampon Çözeltilisi
ECM	Hücre Dışı Matris
F-Aktin	Filementöz Aktinleri
FBS	Fetal Sığır Serumu
FDA	Amerikan Gıda ve İlaç Kurumu
FGF	Fibroblastik Büyüme Faktörü
FITC	Floresan İzotiyosiyanat
FzR	Frizzed Reseptörü
GSK	Glikojen Sentez Kinaz
HAp	Hidroksiapatit
HMDS	Hekzametil Disilazan
hMSC	İnsan Kaynaklı Mezenkimal Kök Hücre
HPβCD	Hidroksipropil-beta-Siklodekstrin
MAPK	Mitojen-Aktive Protein Kinaz
MC3T3-E1	Fare Osteoblastik Hücre Hattı
MG-63	İnsan Osteosarkom Hücre Hattı
Mp	Mikropartikül
mRNA	Haberci Ribonükleik Asit
MSC	Mezenkimal Kök Hücre
MTT	3-[4,5-Dimetiltiyazol-2-il]-Difeniltetrazolyum Bromür

NAD	Nikotinamid Adenin Dinükleotid
Np	Nanopartikül
OCN	Osteokalsin
OPG	Osteoprotegerin
OPN	Osteopontin
p53	Tümör Protein 53
PBS	Fosfat Tampon Çözeltisi
PDI	Çoklu Dağılım Endeksi
PEG	Polietilen Glikol
PLGA	Poli(Laktik-ko-Glikolik Asit)
pNPP	p-Nitrofenil Fosfat
PTH	Paratiroid Hormon
PVA	Polivinil Alkol
RANK	Reseptör Aktivatör Nükleer Kappa B
RANKL	Reseptör Aktivatör Nükleer Kappa B Ligandı
RGD	Arjinin-Glisin-Aspartik Asit
RNA	Reoksiribonükleik Asit
RT-PCR	Gerçek Zamanlı Polimeraz Zincir Tepkimesi
RUNX2	Runt-İlişkili Transkripsiyon Faktörü 2
s	Saniye
sa	Saat
SAOS-2	İnsan Sarkoma Osteojenik Hücre Hattı
SEM	Taramalı Elektron Mikroskobu
SIRT	Sirtuin
TCP	Trikalsiyum Fosfat
TCPS	Polistiren Hücre Kültür Kapları
TGF- β	Transforme Edici Büyüme Faktörü-beta
TNF	Tümör Nekroz Faktörü
TRAP	Tartarat Dirençli Asit Fosfataz
UV	Ultraviyole
VEGF	Vasküler Endotel Büyüme Faktörü
α -MEM	Minimum Essential Medium Alpha Modification
μ -CT	Mikro-Bilgisayarlı Tomografi

1. GİRİŞ

Kemik dokusu, kemiğe elastikliğini veren organik matris ile kemiğe sertlik kazandıran inorganik matrisi içeren kompozit bir yapıdır. Kemiğin, vücuda destek sağlamasının haricinde, iç organları dış etkilere korumak, kalsiyum ve fosfor gibi minerallerin depolanması ile kandaki elektrolitlerin miktarlarının düzenlenmesi gibi oldukça hayati görevleri bulunmaktadır [1]. Kemik dokusu, her ne kadar kendini yenileyebilme ve yüksek iyileşme potansiyeline sahip olsa da, tümörler, travmalar veya bazı kemik hastalıklarından kaynaklı büyük kemik hasarlarında cerrahi müdahaleler gerekmekte ve bu durum da bireyin yaşam kalitesini düşürmektedir [2].

Osteosarkom, en çok çocukları ve gençleri etkileyen kötü huylu kemik tümörüdür ve çocukluk çağı tümörlerinin yaklaşık %5'ini oluşturmaktadır. Genellikle uzun kemiklerde görülen bu hastalık, biyolojisi gereği radyoterapiye cevap vermemekte ve cerrahi işlemin ardından yüksek doz kemoterapi ile tedavi edilmektedir. Ancak, bu tedavi yöntemleri tam anlamıyla verimli olmamakla birlikte, hastaların yaklaşık %20'sinde osteosarkom hücrelerinin akciğerlere metastazı ile sonuçlanmaktadır. Ayrıca, kemoterapi oldukça zorlu bir süreçtir ve sadece kanserli dokuya değil tüm vücuda etki etmektedir. Bu nedenle, son yıllarda sadece tümörlü bölgeye özgü tedavi sistemleri geliştirilmektedir. Bu tedavi yöntemlerinde, çeşitli antikanserojenik ilaçların tek başlarına veya birlikte kullanımı söz konusudur. Ancak etkin ilaç türü, dozu ve salım süresi gibi tedaviyi başarılı kılacak parametrelerin kişiye göre değişken oluşu, ilaçların sağlıklı hücreler ve bağışıklık sistemi üzerindeki olumsuz etkileri gibi nedenler, tedavi sürecindeki başarıyı arttıracak yeni yaklaşımların geliştirilmesini gerekli kılmaktadır [2-4].

Kemik hasarlarının tedavisinde hastanın kendi vücudundan alınan otolog kemik yamaları şimdiye kadar kullanılan en avantajlı yöntem olmasına rağmen, ikinci bir cerrahi işlem gerektirmesi, hastada yeni bir kemik hasarına neden olması ve çok büyük hasarlarda istenilen boyutta doku alınamaması gibi bazı dezavantajlara sahiptir [5]. Bu nedenle, preosteoblast veya mezenkimal kök hücrelerin, kemik doku oluşumunu uyarıcı biyosinyal moleküllerin ve üç boyutlu, gözenekli doku iskelelerinin kullanıldığı **kemik doku mühendisliği** yaklaşımı kemik hasarlarının tedavisinde çok büyük önem taşımaktadır [6].

Kemik doku mühendisliği temel olarak doku iskelesi, hücreler ve biyosinyal moleküllerden oluşmaktadır. Bu biyosinyaller, doğrudan doku iskelelerine yüklenebilmektedir, ancak kararsız yapıları ve kısa yarılanma ömürlerinden dolayı etkin bir şekilde bu moleküllerden

yararlanılamamaktadır. **Kontrollü salım sistemleri** ise hedef bölgeye uygulanacak ilaçların etkinliğini arttırmada sıklıkla tercih edilmektedir. Böylelikle, ilaç dozu azaltılmakta, ilacın uygulama süresi uzatılmakta ve oluşabilecek yan etkiler minimuma indirilmektedir. Ayrıca, bu sistemlerde biyoaktivitesi çabuk bozulan ilaçlar genellikle polimerik yapılar içerisine hapsedildiğinden, ilaçlardan en yüksek verimde yararlanmak mümkündür [7].

Melatonin beyindeki epifiz bezi tarafından salgılanan indol yapıdaki bir hormondur. Melatoninin kronobiyolojik bir düzenleyici olması, üremeyi, yaşlanmayı, uyku davranışını ve kan basıncını düzenlemesi ile bağışıklık sistemini desteklemesi gibi çeşitli görevleri bulunmaktadır. Bu fonksiyonlarda meydana gelebilecek bozukluklar çeşitli hastalıklara zemin hazırlayarak enfeksiyon riski, bağışıklık sistemi hastalıkları ve kansere yakalanma oranını arttırabilmektedir. Melatoninin kemik dokusu üzerinde oldukça önemli etkileri bulunmaktadır. Osteoblastları aktive eden melatonin, osteoklastların aktivitesini ise inhibe etmektedir [8-10]. Melatoninin bir diğer etkisi ise kanser üzerinedir ve birçok kanser türünde oldukça etkili sonuçlar verdiği yapılan çalışmalarda gösterilmiştir. Melatoninin kanser tedavilerinde kemoterapik ilaçlar ile kullanılmasının hem bu ilaçların etkinliğini arttırdığı hem de ilaçların neden olduğu yan etkileri azalttığı *in vitro* ve *in vivo* çalışmalarla belirlenmiştir [11, 12]. Ancak, melatoninin osteosarkom üzerindeki etkilerini inceleyen oldukça az sayıda çalışma bulunmaktadır. Ayrıca, ilgili literatürde melatoninin hem yeni kemik doku oluşumu, hem de osteosarkom üzerindeki etkisini bir arada inceleyen doku mühendisliği yaklaşımına bir çalışmaya da rastlanmamıştır.

Sunulan tez çalışmasının amacı, melatoninin osteoindüktif ve antikanserojenik özelliklerinin bir arada etkili olabileceği doku iskelesi-temelli bir sistem geliştirilmesidir. Kemik tümörüne sahip hastalarda tümörün cerrahi işlemle alınmasının ardından oluşan hasarlı bölgeye üretilen sistemin implante edilmesi ile bir yandan çevre dokudaki kanser hücrelerinin kemoterapiye gerek kalmadan ortadan kaldırılması, bir yandan da hasarlı bölgede yeni kemik doku oluşumu hedeflenmiştir. Bu amaçla, geliştirilen doku iskelesi-temelli sistemin kemik hücreleri üzerindeki proliferatif etkisi ile kanser hücreleri üzerindeki inhibitör etkisi, istenilen dozlarda ve sürede melatonin salımını gerçekleştirecek iki farklı taşıyıcı sistemin doku iskelelerine eklenmesi ile incelenmiştir.

Kemik farklılaşmasını desteklemek için düşük melatonin konsantrasyonu (mikromolar), kanser hücrelerinin inhibe olması için ise yüksek melatonin konsantrasyonu (milimolar) gerekmektedir. Bu amaçla, melatoninin kemik doku mühendisliğindeki etkinliğinin incelenmesi için PLGA nano/mikropartikülleri üretilmiş ve doku iskelelerine eklenerek

kontrollü ve uzun dönemde melatoninin salımı sağlanmıştır. Melatoninin doku iskelelerine hem yüksek miktarda yüklenebilmesi hem de hızlı bir salım sağlamak amacıyla ise melatonin-siklodekstrin inklüzyon kompleksi oluşturulmuş ve geliştirilen doku iskelelerine yüklenmiştir. İki farklı salım sistemini yapısında barındıran doku iskeleleri ile yürütülen *in vitro* hücre kültür çalışmaları sonucunda osteosarkom tedavisinde kullanılabilecek bir sistem önerisinde bulunulmuştur. Ayrıca, tez çalışması kapsamında melatoninin kemik iliği kökenli insan mezenkimal kök hücrelerinin (hMSC) proliferasyonu ve osteojenik farklılaşması üzerindeki etkilerini inceleyebilmek amacıyla ipek filmlerin yüzeyi melatonin ile modifiye edilmiştir. Melatoninin ipek filmler üzerinde kültüre edilen hMSClerin osteojenik farklılaşması üzerindeki etkileri hem büyüme hem de farklılaşma ortamında incelenmiş ve melatoninin mikromolar konsantrasyonlarının mezenkimal kök hücrelerin farklılaşma davranışları üzerindeki etkileri belirlenerek, kemik rejenerasyonu için uygun bir doku modeli ortaya konmuş ve melatoninin mezenkimal kök hücreler üzerindeki etkisi vurgulanmıştır.

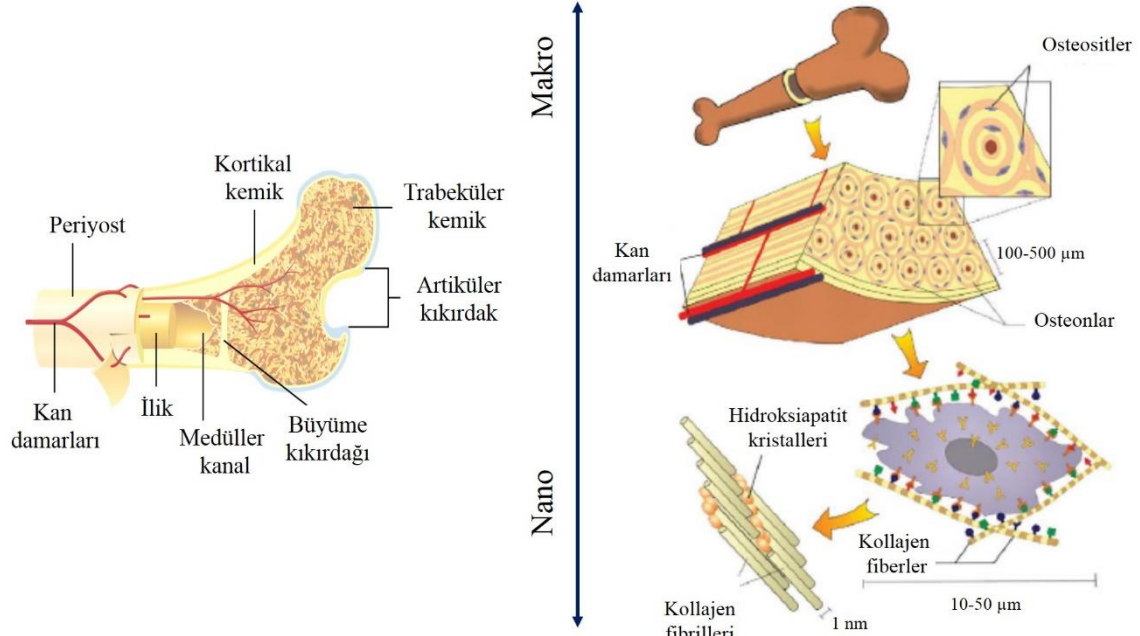
2. GENEL BİLGİLER

Bu kısımda, sunulan tez çalışmasının temelini oluşturan konularla ilgili literatür bilgisi verilmiştir. İlk olarak kemik dokusu tanımlanmış ve kemik doku mühendisliği yaklaşımının gerekliliğinden bahsedilmiştir. İkinci bölümde, melatoninin genel özelliklerine değinilmiş ve hem kemik rejenerasyonundaki hem de kanser üzerindeki etkileri detaylı bir şekilde sunulmuştur. Üçüncü bölümde bir kemik kanser türü olan osteosarkom ve melatonin arasındaki ilişkiden bahsedilmiştir. Dördüncü ve beşinci bölümlerde, sırasıyla, kontrollü salım sistemleri ve *in vitro* salım mekanizmasının nasıl belirleneceği anlatılmıştır. Altıncı bölümde ise polimerik nano/mikropartiküllerin üretim yöntemleri ve doku mühendisliğinde kullanım alanları üzerinde durulmuştur. Son kısımda ise siklodekstrinler ve inklüzyon kompleksleri ile ilgili bilgiler sunulmuştur.

2.1. Kemik Doku Mühendisliği

2.1.1. Kemiğin yapısı ve yeninden yapılanması

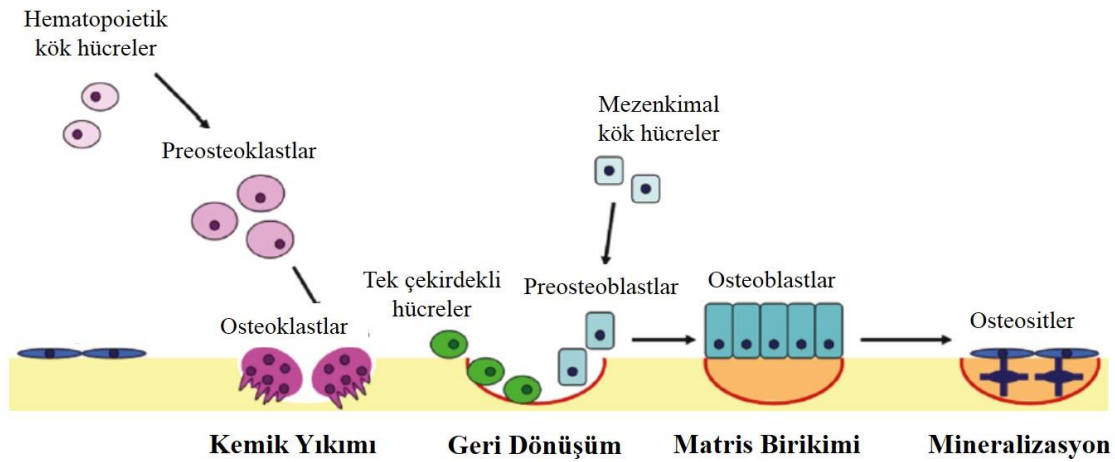
Kemik oldukça karmaşık, damarlı ve herhangi bir yara dokusu oluşmadan kendini sürekli yenileyebilen mineralize bir bağ dokudur. Kemik dokusu kortikal (kompakt) ve trabeküler (kanselöz veya süngerimsi) kemik olmak üzere iki farklı makroyapıdan oluşmaktadır. Kortikal kemik tekrar eden osteon ünitelerine sahiptir ve tüm iskelet ağırlığının yaklaşık %80'ini oluşturmaktadır. Sıkı ve sert bir yapıya sahip olan kortikal kemiğin gözenekliliği çok düşüktür (%10). Trabeküler kemik ise oldukça gözeneklidir (%50-90) ve bu özelliğinden dolayı sıkıştırma direnci kortikal kemiğinki ile kıyaslandığında 20 kat daha azdır [5, 13]. Kemiğin dışı periyost tabakası ile kaplıdır. Kemik dokusunun nanoyapısında ise hücre dışı matris bileşenleri bulunmaktadır. Kemik hücre dışı matrisi hem mineralize olmayan organik bileşenler (çoğunlukla tip 1 kollajen) hem de mineralize inorganik bileşenlerden (çoğunlukla hidroksiapatit, HAp) oluşmaktadır. Kemiğin yapısı ve hiyerarşik organizasyonu Şekil 2.1'de sunulmuştur.



Şekil 2.1. Kemiğin yapısı ve hiyerarşik organizasyonu ([1]'den değiştirilerek).

Kemik, yaşlanmış dokunun kemik yıkımından sorumlu osteoklast hücreleri tarafından ortadan kaldırılması ve kemik yapımından sorumlu osteoblast hücreleri sayesinde yeni kemiğin oluşması sonucu sürekli olarak kendini yenileyen dinamik bir dokudur. Birbiriyle ilişkili bu iki süreç, kemiğin anatomik ve yapısal bütünlüğünün devamı için gereklidir [14]. Aynı şekilde kırık veya hastalıklara bağlı olarak meydana gelen kemik hasarları da osteoblastlar ile osteoklastların sayıları ve aktiviteleri arasındaki hassas denge sayesinde iyileşmekte ve kemik dokusu bu şekilde sürekli olarak yeniden yapılanmaktadır.

Kemiğin yeniden yapılanması temel olarak 4 aşamadan meydana gelmektedir. Bu aşamalar: kemik yıkımı (rezorpsiyon), geri dönüşüm, matris birikimi ve mineralizasyondur. Bu süreçte, ilk olarak hasarlı bölgedeki hematoma içerisinde sentezlenen sitokinler osteoklast öncül hücreleri olan preosteoklastların kemik yüzeyine göç etmesine yardımcı olur ve ardından preosteoklastlar osteoklastlara farklılaşarak kemik yıkımını gerçekleştirir. Sonrasında, osteoblast öncül hücreleri olan preosteoblastlar burada çoğalıp osteoblastlara farklılaşarak kemiğin yıkıma uğrayan bölgesine yerleşirler. Son olarak osteoblastlar osteositlere farklılaşır ve mineralizasyon sonucunda yeni kemik doku oluşur [9, 15]. Kemiğin yeniden yapılanmasının şematik gösterimi Şekil 2.2'de sunulmuştur.



Şekil 2.2. Kemikğin yeniden yapılanması ([15]'ten değiştirilerek).

Kemik dokunun temel görevi vücuda yapısal destek sağlamak ve iç organları korumaktır. Bunun yanı sıra, yapısında kalsiyum ve fosfor depolayarak homeostazı sağlamakta ve kandaki temel elektrolitlerin konsantrasyonunu düzenlemektedir. Hayati derecede önem taşıyan tüm bu özelliklerinden dolayı, kemikğin yapısında meydana gelebilecek hasarlar kişinin yaşam kalitesini ciddi derecede etkilemektedir [1, 5]. Kemik oldukça yüksek bir rejenerasyon kapasitesine sahiptir ve özellikle gençlerde meydana gelen küçük kemik hasarları zamanla kendiliğinden iyileşmektedir. Ancak, yaralanma, tümör, enfeksiyon veya çeşitli hastalıklara bağlı olarak meydana gelebilecek büyük kemik hasarları için çoğunlukla cerrahi müdahaleler gerekmektedir.

2.1.2. Kemik hasarlarında kullanılan klinik yöntemler

Kemikte meydana gelen hasarlardan dolayı gerçekleştirilen cerrahi operasyonlar sonrasında oluşan açıklığa gerekli malzemelerin yerleştirilmesi, hem yeni kemik oluşumunun tetiklenmesi hem de iyileşme sürecinde mekanik destek sağlanması açısından oldukça önemlidir.

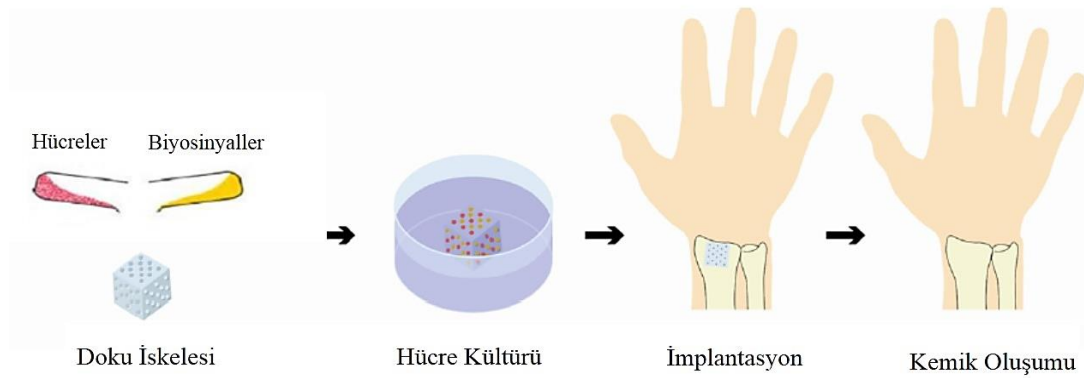
Günümüzde kemik hasarlarının tedavisinde kişinin kendisinden alınan kemik yamaları olan otogreftler, kadavradan alan kemik yamaları olan allogreftler ve hayvandan alınan kemik yaması olan zenogreftler ile bunlara alternatif olarak metal ve seramikler kullanılmaktadır [5]. Bu tedavi yöntemlerinin içerisinde klinik açıdan en avantajlı sonucu veren otogreftlerdir. Çünkü otolog kemik yamaları, kişinin yük taşımayan bölgesinden alınmakta ve hasarlı bölgeye implante edilmektedir. Bu amaçla genellikle hastanın iliak kanadındaki süngerimsi kemik kullanılabileceği gibi kortikal kemik de kullanılabilmektedir. Her ne kadar diğer yöntemlere göre başarılı olsa da, bu yöntemin kullanımı yeterli büyüklükte kemik alınamaması ile yeniden bir operasyona ve kemik hasarına neden olmasından dolayı

kısıtlıdır. Allogreftler ve zenogreftlerin ise implante edildiği kemikle bütünleşmesi otogreftler kadar iyi değildir. Aynı zamanda, kadavradan veya hayvandan alındığından bağışıklık sisteminin tepkisi ile donörden hastaya patojen aktarımı gibi olumsuz durumlar meydana gelebilmektedir. Metal ve seramiklerin de kemik hasarlarındaki kullanımında çeşitli kısıtlamalar söz konusudur. Örneğin metaller implantasyon bölgesinde doku ile yeterince bütünleşememekte ve enfeksiyona neden olabilmektedir. Seramikler ise kırılabilirlikleri ve düşük çekme dayanımına sahip olmalarından dolayı yüksek kayma gerilimine ve bükülmeye maruz kalan bölgelerde kullanılamamaktadır [5, 16, 17].

2.1.3. Kemik doku mühendisliği yaklaşımı

Kemik hasarlarının tedavisinde kullanılan yöntemlerin tümünün çeşitli dezavantajlarının olması “kemik doku mühendisliği” yaklaşımını gündeme getirmiştir. Temel hedefi yeni bir kemik yaması oluşturarak kemik onarımını ve rejenerasyonunu sağlamak olan kemik doku mühendisliği yaklaşımında bilim adamlarının, mühendislerin ve cerrahların işbirliği oldukça önemlidir.

Kemik doku mühendisliği için gerekli bazı temel bileşenler bulunmaktadır. Bu bileşenler, doğal kemiğin ekstraselüler çevresini taklit edebilecek gözenekli, biyouyumlu ve üç boyutlu bir doku iskelesi, bu doku iskelesi içerisinde üreyecek osteojenik hücreler ve hücrelerin kemik dokuya farklılaşmasını yönlendirecek biyosinyal moleküllerdir. Bunların haricinde, büyüyen dokunun yeterince beslenebilmesi için damarlanma da önemli bir parametredir [16]. Şekil 2.3’te kemik doku mühendisliği yaklaşımının şematik gösterimi verilmiştir.



Şekil 2.3. Kemik doku mühendisliği yaklaşımı ([18]’den değiştirilerek).

Kemik doku mühendisliğinde kullanılacak doku iskelelerinin sahip olması gereken özelliklerden en önemlisi osteoindüktif ve/veya osteokondüktif olmasıdır. Osteoindüktif doku iskeleleri, osteoprogenitör hücrelerin doku iskelesine tutunmasını, iskele içerisine göç etmesini, farklılaşmasını ve sonuçta yeni kemiğin oluşumunu sağlar.

Osteokondüktif doku iskeleleri ise, kemiğin kapiler yapısının oluşumunu ve hücrelerin ana dokudan malzemeye yönelenerek kemik hücrelerinin çoğalmasını destekler ve böylelikle kemiğin 3 boyutlu yapısının oluşmasını sağlarlar. [6, 19, 20]. Bu özelliklerin haricinde kullanılacak doku iskeleleri biyouyumlu, gözenekli ve biyobozunur olmalı, aynı zamanda da vücut içerisine implante edildiğinde mekanik strese maruz kalacağından yeterli mekanik dayanıma sahip olmalıdır.

Kemik doku mühendisliği uygulamalarında gözenekli ve üç boyutlu doku iskelelerinin üretiminde genellikle biyobozunur polimerler kullanılmakta ve çeşitli fabrikasyon teknikleri ile gözenekli üç boyutlu yapılar elde edilmektedir. Biyobozunur polimer olarak da çoğunlukla poli(laktik asit) (PLA), poli(glikolik asit) (PGA) ve bunların kopolimerleri (PLGA) gibi poliesterler tercih edilmektedir. Bu sentetik polimerlerin tercih edilmesinin nedenleri biyouyumlu olmaları ve *in vivo* ortamda kontrollü bir şekilde bozunmaları sonucu herhangi bir toksik bileşen oluşturmamalarıdır. Kemik yenilenmesinde kullanılan diğer bir tür malzeme ise hidroksiapatit (HAp) ve trikalsiyum fosfat (TCP) gibi seramiklerdir. Bunlar doğal kemiğin yapısında da bulunduklarından çok yüksek osteokondüktiviteye ve kemiğe bağlanma kapasitesine sahiptirler. Bu malzemelerin en önemli dezavantajı, kırılganlıkları ve işlenmelerinin zor olmasıdır. Kalsiyum fosfatların osteokondüktivitesi ile poliesterlerin biyobozunurluk özelliklerini birleştirmek için polimer/seramik kompozitleri geliştirilebilmekte ve böylece çok daha üstün özelliklere sahip doku iskeleleri elde edilmektedir [6]. Literatürde yapılan çalışmalarda, sadece polimerin kullanıldığı durumlarda kemik matrisi sadece malzemenin yüzeyinde oluşurken (<240 nm) [21], kompozit doku iskelelerindeki yeni dokunun, iskelenin ortasına kadar olan bölgede oluştuğu belirlenmiştir [22].

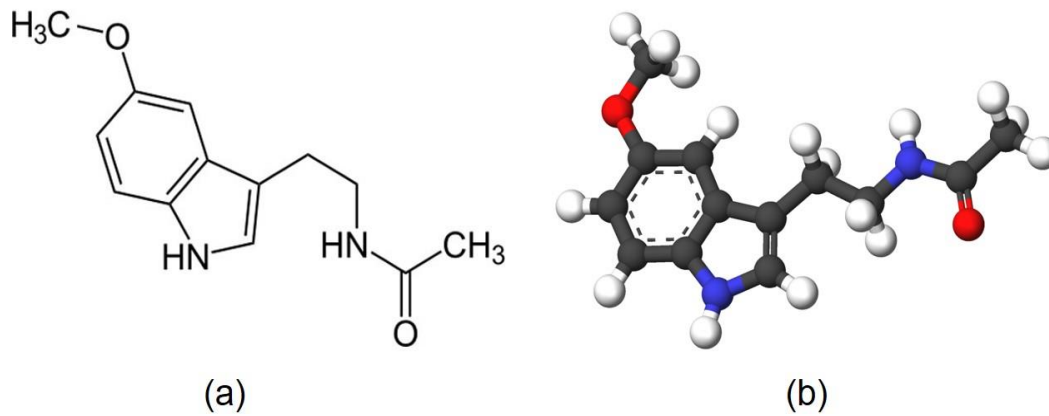
Polimer/seramik kompozit doku iskeleleri ayrıca doğal kemik dokusunu çok güzel bir şekilde taklit etmektedirler. Çünkü doğal kemiğin yapısında daha önce de bahsedildiği gibi hem organik hem de inorganik bileşenler bulunmaktadır. Kemikte bulunan nanometre boyutundaki inorganik bileşenler kemiğin mekanik özellikleri açısından oldukça önemlidir. Kemiğin yapısındaki minerallere içerik, boyut ve morfoloji olarak benzeyen sentetik nano boyuttaki HAp'in kullanıldığı çalışmalarda malzeme üzerine protein adsorpsiyonunun ve osteoblast tutunmasının diğer mikron boyuta sahip seramiklerin kullanıldığı duruma göre önemli derecede arttığı belirlenmiştir [6, 23].

2.2. Melatonin

2.2.1. Sentezi ve genel özellikleri

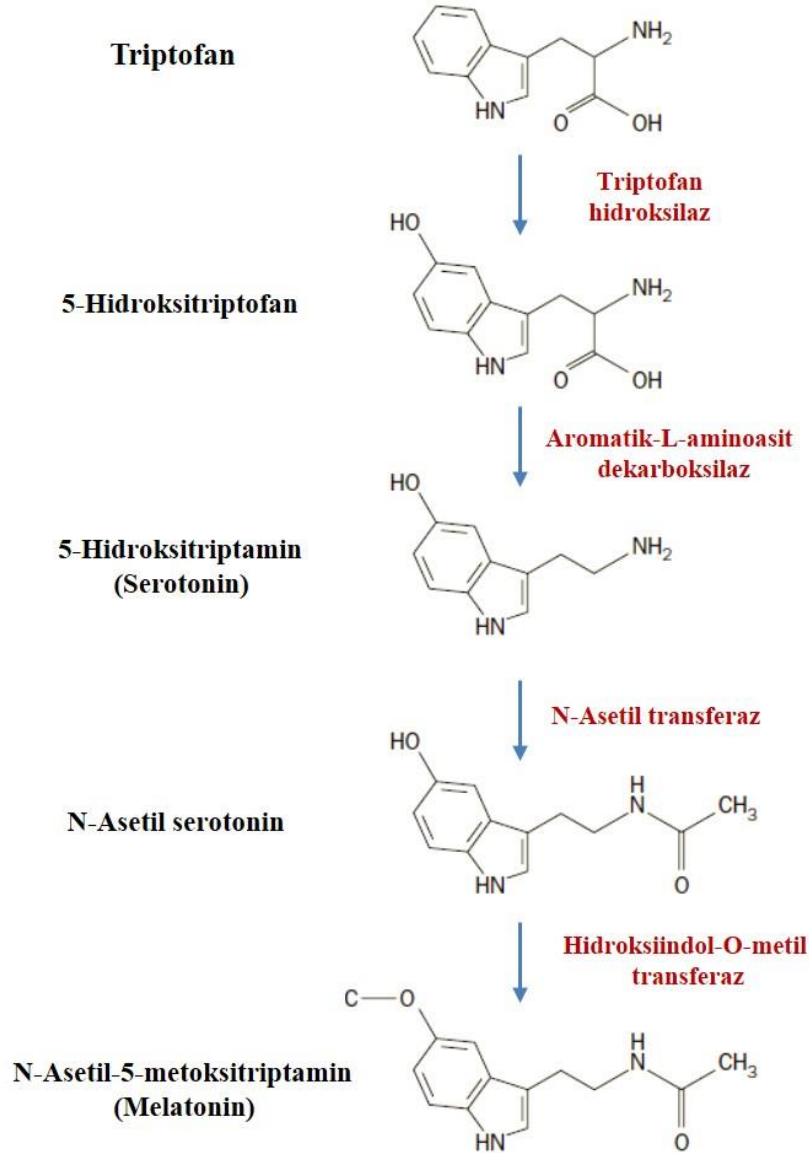
Melatonin (N-asetil-5-metoksitriptamin) memeli beynindeki epifiz bezinden (pineal gland) salgılanan, özellikle tümör büyümesinin inhibisyonu, kalp ritminin, vücut sıcaklığının ve uyku-uyanıklık döngüsünün düzenlenmesi ile bağışıklık sistemi fonksiyonları ve dokularda homeostazın sağlanması gibi oldukça önemli süreçlerde rolü olduğu düşünülen amin yapıdaki bir nörohormondur [24, 25]. Melatonin sentezi epifiz bezinin haricinde retina, kemik iliği, safra ve gastrointestinal sistemde de gerçekleşmektedir, ancak buralarda gerçekleşen sentezin plazma melatonin düzeyine etkisi oldukça azdır [25, 26].

İlk olarak 1958 yılında bir dermatolog olan Aaron Lerner tarafından keşfedilen melatoninin memelilerin haricinde, bakterilerde, bitkilerde, protistalarda, omurgalı ve omurgasız hayvanlarda bulunması, bu basit molekülün neredeyse tüm bu organizmalardaki yaşamsal süreçlerle bağlantılı önemli biyolojik aktivitelerden sorumlu olabileceğini göstermektedir [25-28]. Melatoninin kimyasal yapısı ve moleküler gösterimi Şekil 2.4’te sunulmuştur.



Şekil 2.4. Melatoninin (a) kimyasal yapısı ve (b) moleküler gösterimi.

Melatonin sentezinde birinci basamak esansiyel bir indol aminoasidi olan ve dışarıdan besinlerle alınan triptofanın epifiz bezinin endokrin hücreleri olan pineolasitler içerisine alınmasıdır. Ardından, hücre içerisine alınan triptofan, triptofan hidroksilaz aracılığıyla 5-hidroksitriptofan’a hidroksillenir. 5-hidroksitriptofan ise aromatik L-aminoasit dekarboksilaz ile 5-hidroksitriptamine (serotonin) dönüşür. Sonrasında, 5-hidroksitriptamin N-asetil transferaz enzimiyle N-asetil serotonine, ardından da hidroksiindol-O-metil transferaz enzimi ile N-asetil-5-metoksitriptamine (melatonin) dönüşür. Melatoninin sentez mekanizması Şekil 2.5’te verilmiştir [25, 29].

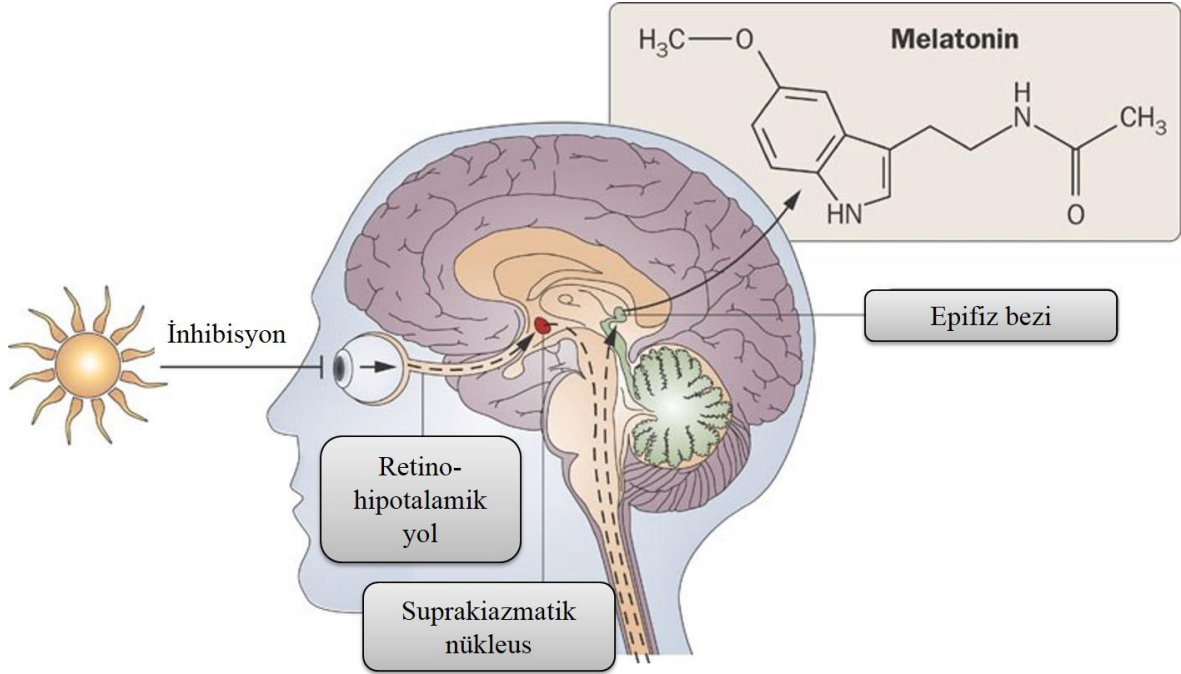


Şekil 2.5. Melatonin sentezi ([29]'dan değiştirilerek).

Sentezlenen melatonin epifiz bezinde depolanmamaktadır. Melatonin, hem epifiz bezi ve sistemik dolaşımda kan-beyin bariyeri bulunmadığından hem de amfifilik yapısından dolayı üretildikten sonra oldukça hızlı bir şekilde kana karışır ve dokulara dağılır. Kandaki yarılanma süresi yaklaşık 10-40 dk olan melatoninin büyük bir kısmı karaciğerde geri kalanı da böbrekte metabolize edilir.

Melatoninin sentezi 24 saatlik aydınlık/karanlık döngüsüne göre gerçekleşmektedir ve ışık ile doğrudan ilişkilidir. Işık gözün retinasındaki fotoreseptörler tarafından retinohipotalamik yoldan geçerek hipotalamusun suprakiazmatik nükleusuna oradan da paraventriküler nükleusa iletilir. Buradaki sinirler vasıtasıyla çıkan sinyaller önce süperior servikal ganglionu oradan da epifiz bezine ulaşır. Bu sinyallerin pinealositleri uyarıcı etkisi karanlıkta

tetiklenirken, ışık varlığında inhibe olmaktadır. Dolayısıyla melatonin sentezi ve salımı da karanlıkta artarken aydınlıkta azalmaktadır. Ayrıca, melatonin sentezini sağlayan enzimler de karanlıkta aktifleşmektedirler [25, 29-31]. Melatoninin beyindeki üretim yolağı Şekil 2.6’da gösterilmiştir.



Şekil 2.6. Melatoninin beyindeki üretim yolağı ([29]’dan değiştirilerek).

Biyolojik saat olarak da bilinen sirkadiyen ritim üzerinde melatoninin oldukça önemli bir rolü vardır. Çünkü uyku-uyanıklık döngüsü melatonin tarafından düzenlenmektedir. Plazmadaki melatonin konsantrasyonu gün boyunca düşükken (<10 pg/mL), gecenin ilerleyen saatlerinde artış göstermektedir (25-120 pg/mL) ve 8 saat kadar aynı seviyede kaldıktan sonra sabah tekrar düşüş göstermektedir [32]. Bu nedenle melatonin “drakula hormonu” veya “karanlıklar hormonu” olarak da bilinmektedir. Melatoninin, büyüme hormonunun salımını tetiklemesinin yanı sıra, ergenliği başlatıcı özellikleri de bulunmaktadır. Bu fonksiyonlarda oluşabilecek bozukluklar çeşitli enfeksiyonlara, bağışıklık sistemi hastalıklarına ve kansere yakalanma riskini arttırabilmektedir [33-36].

Çevresel, hormonal ve yaş gibi çeşitli faktörlere bağlı olarak yaygınlığı değişmekle birlikte beyin, omurilik, hipofiz bezi, retina, dalak, böbreküstü bezi, karaciğer, böbrek, kalp, akciğer, testis ve yumurtalık gibi birçok doku ve organda melatonin reseptörleri bulunmaktadır [37, 38]. Ayrıca reseptör çeşitliliği bakımından oldukça zengin olan melatoninin, hücre zarı, çekirdeği ve sitoplazmasında bulunan üç farklı reseptör türü bulunmaktadır. Hücre zarında MT₁, MT₂ ve MT₃ reseptörleri, hücre çekirdeğinde retinoid Z ve O reseptörleri, hücre

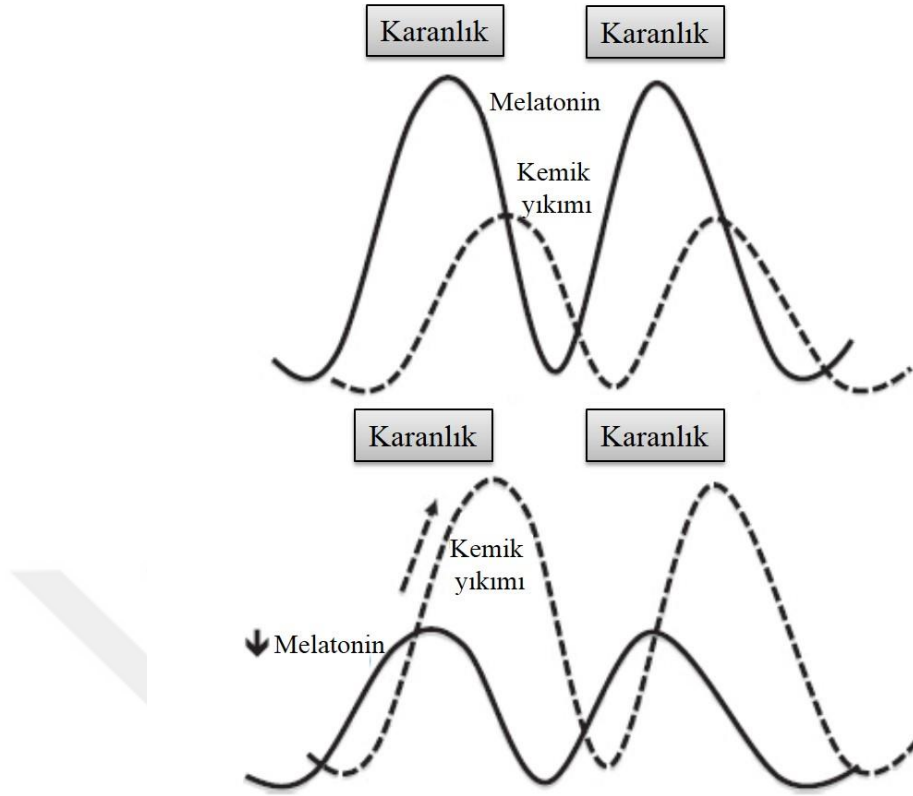
sitoplazmada ise kalsiyum-kalmodulin reseptörleri bulunmaktadır [9, 36, 39, 40]. Melatonin, bu reseptör çeşitliliği sayesinde birçok dokuda farklı işlevler gösterebilmektedir.

2.2.2. Kemik doku üzerindeki etkisi

Melatoninin kemik doku üzerinde etkisinin olduğu ilk kez epifiz bezi çıkartılan tavuklarda skolyoz görülmesi ile belirlenmiştir [41, 42]. Bu görüş aynı zamanda, civcivlerin yumurtadan çıktıktan 3-5 gün sonra omurgalarında spesifik melatonin reseptörlerinin oluşmasıyla da desteklenmiştir [25]. Kemik iliğinde bol miktarda bulunması yine melatoninin kemik doku üzerinde etkili olabileceği düşüncesini ön plana çıkarmıştır [43, 44]. Yeni doğan sıçanlarda ışık uygulaması ile melatonin sentezinin baskılanması sonucu serum kalsiyum konsantrasyonunun azaldığı belirlenmiştir [45]. Ayrıca, yaşlandıkça melatonin miktarının azalması ve kadınlarda özellikle menopozdan sonra osteoporoz görülmesine bağlı olarak gerçekleşen kemik erimesinin de melatonin ile ilişkili olduğu bilinmektedir [46].

Melatonin, osteoblastlar ve osteoklastlar üzerindeki ikili etkisinden dolayı kemiğin yeniden yapılanmasında oldukça önemli bir görev üstlenmektedir. Osteoblastlarda MT₁ ve MT₂ olmak üzere iki adet melatonin reseptörü bulunduğu ve melatoninin preosteoblast/osteoblast/osteoblast-benzeri hücrelerin üremesi ve farklılaşması üzerinde olumlu etkileri olduğu çeşitli çalışmalarla kanıtlanmıştır [10, 25]. Ayrıca, melatoninin kemiğin temel bileşenlerinden olan tip 1 kollajen ile kemik proteinlerinin (alkalen fosfataz, osteopontin, kemik sialoproteini ve osteokalsin) üretimini ve mineralize matris oluşumunu arttırdığı da bilinmektedir [9]. Bunun haricinde, melatoninin yeni kemik oluşumunda oldukça önemli süreçlerden biri olan damarlanmayı da arttırdığını gösteren çeşitli çalışmalar mevcuttur [47]. Melatoninin hem yeni kemik oluşumunu hem de osseointegrasyonu artırma özelliği sayesinde kemik implantlarının vücuda yerleştirildiği durumlarda tek başına veya diğer büyüme faktörleri ile birlikte kullanımı oldukça olumlu sonuçlar yaratmaktadır [48, 49].

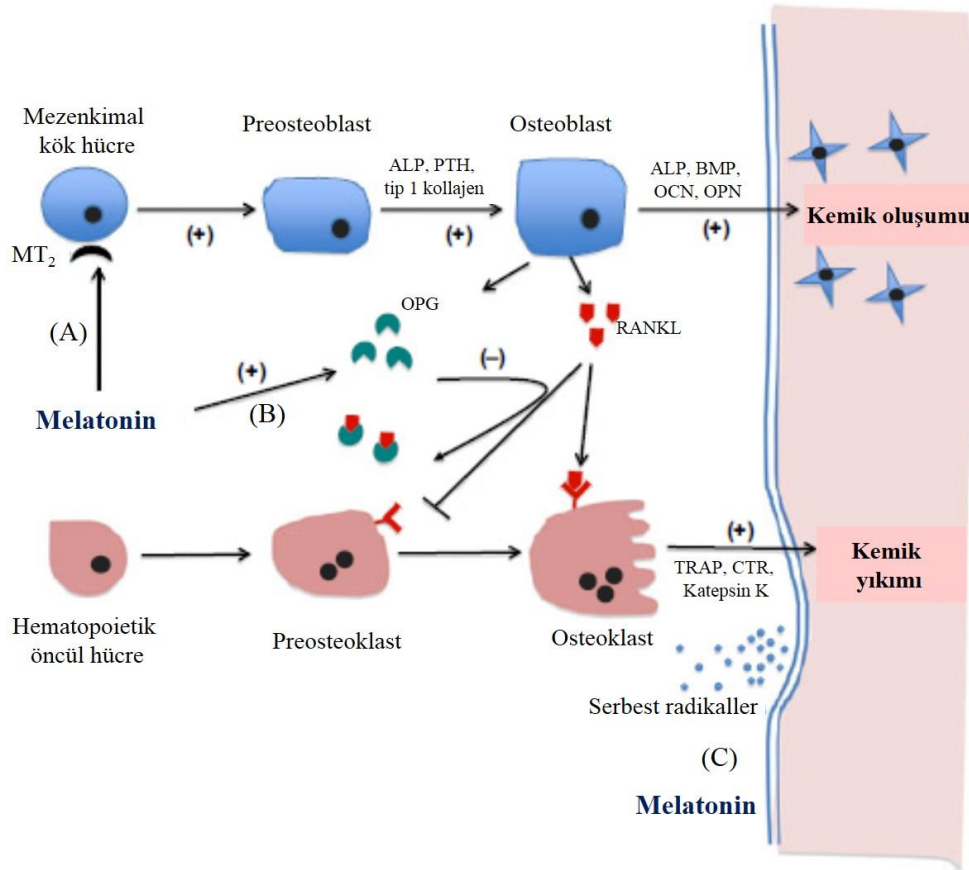
Melatoninin kemik doku üzerindeki bir diğer etkisi ise osteoklastların aktivitesini inhibe ederek kemik rezorpsiyonunu önlemesidir. Hastalığa, yaşa, hormonal duruma veya ışığa maruz kalma süresine bağlı olarak melatonin salımında değişiklikler olabilmektedir. Melatonin sentezi ve kemik yıkımı arasındaki 24 saatlik döngüde belirli bir ilişki bulunmaktadır. Bu ilişki Şekil 2.7’de gösterilmiştir.



Şekil 2.7. Melatonin seviyesi ve kemik yıkımı arasında 24 saatlik döngüdeki ilişki ([46]'dan değiştirilerek).

Melatoninin osteoklastların aktivitesini inhibe etmesi osteoprotegerin (OPG) üretimini arttırmasından kaynaklanmaktadır. OPG üretimindeki artış sonucu osteoklast farklılaşma faktörü reseptör aktivatör nükleer kappa B ligandına (RANKL) bağlanamaz ve böylelikle kemik yıkımı önlenir [8, 50]. Melatoninin RANK ve osteoprotegerin ekspresyonu üzerindeki etkisi preosteoblastik MC3T3-E1 hücreleri üzerinde incelenmiş ve 5-500 μM aralığındaki melatonin konsantrasyonunun doz bağımlı şekilde RANK mRNA'yı ve dolayısıyla OPG seviyelerini arttırdığı belirlenmiştir [51].

Bunun haricinde, osteoklastlar kemik yıkımını gerçekleştirmek için birçok kimyasal ajan kullanırlar. Bu işlemin en önemli bileşeni ise serbest radikallerdir. Osteoklastlar kemik yıkımı sırasında yüksek konsantrasyonlarda süperoksit radikalleri oluşturarak yıkıma katkıda bulunurlar. Melatonin ise antioksidan özelliği sayesinde serbest radikalleri ortadan kaldırmakta ve osteoklastların aktivitesini inhibe ederek kemik yıkımına engel olmaktadır [52]. Sonuç olarak, melatoninin farmakolojik konsantrasyonlarının, kemik yıkımını, osteoklastların aktivitesini inhibe ederek önlediği belirlenmiştir. Melatoninin osteoblastların ve osteoklastların davranışları üzerindeki etkileri Şekil 2.8'de sunulmuştur.



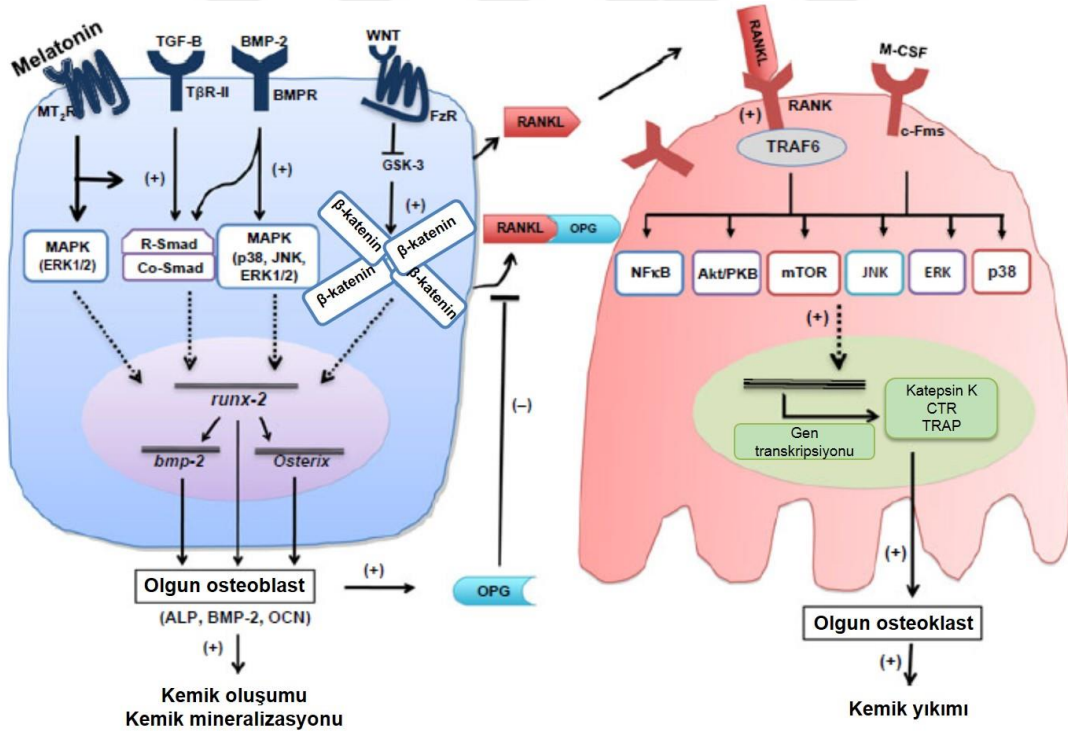
Şekil 2.8. Melatoninin kemik ve kemik hücreleri üzerindeki etki mekanizmaları: (A) MT₂ melatonin reseptörü aracılığıyla mezenkimal kök hücrelerin osteoblastlara farklılaşmasını sağlar; (B) preosteoblastlarda OPN üretimini tetikleyerek RANKL'nin preosteoklastlara bağlanmasını engeller ve osteoklast aktivitesini inhibe eder; (C) serbest radikal süpürücü ve antioksidan özelliklerinden dolayı kemik yıkımını engeller. PTH (paratiroid hormon), OPN (osteopontin), BMP (kemik morfogenetik protein), ALP (alkalen fosfataz), OCN (osteokalsin), TRAP (tartarat dirençli asit fosfataz), OPG (osteoprotegerin), CTR (kalsitonin reseptörü) ([46]'dan değiştirilerek).

Melatoninin osteoklastların aktivitesini inhibe etme özelliğinden dolayı osteoporoz tedavisinde de kullanımı mevcuttur. Bu tedavilerde kullanılan ilaçlara ek olarak melatonin kullanılması, doğrudan kemik üzerinde olumlu etkiler sağlayacağı gibi, bu ilaçlara bağlı yan etkileri de azaltmaktadır [8, 31]. Melatonin kemik gelişimi üzerinde önemli etkisi olan büyüme hormonunun salımını arttırdığı gibi [53], paratiroid hormon, kalsitonin ve östrojen gibi sistemik hormonlar ile etkileşerek kemik metabolizması üzerinde dolaylı olarak da rol oynamaktadır [9].

Şimdiye kadar yapılan çalışmalarda melatoninin preosteoblastların ve insan mezenkimal kök hücrelerinin olgun osteoblastlara farklılaşmasını başta ERK 1/2 ve Wnt/ β -katenin sinyal yolları olmak üzere çoklu yollardan gerçekleştirdiği belirlenmiştir. Şekil 2.9'da kemik

oluşumu ve yıkımının gerçekleşmesi için gerekli hücre içi sinyal yolları işaret edilmiş ve melatoninin bu süreçte ne şekilde rol aldığı gösterilmiştir. Buna göre, hücredeki melatonin reseptörüne bağlanan melatonin, MAPK (Mitojen-Aktive Protein Kinaz) aktivitesini arttırmaktadır. MAPK'ların (ERK1/2, p-38 veya JNK) aktifleştirilmesi, Runx2 ekspresyonunu arttırmakta, bu da sonrasında kemik morfogenetik protein-2 (BMP-2), osteriks ve osteokalsin gibi osteojenik gen ekspresyonlarını indüklemektedir.

Kemik morfogenetik proteinleri (BMP'ler), osteoblastik farklılaşma için hayati bir önem taşımaktadır. Şekil 2.9'da görüldüğü gibi, BMPler osteoblast hücrelerinin membranında bulunan BMP reseptörlerine bağlanarak hücre içerisine alınır ve Runx2, BMP-2 ve osteriks gibi osteojenik genlerin ekspresyonunu aktive eder. Melatonin ayrıca, osteogenezde oldukça önemli bir yeri olan Wnt/ β -katenin sinyal yolağı ile de Runx2 üretimini gerçekleştirmektedir. Bu sinyal yolağında, hücre membranındaki frizzed reseptörleri (FzR), Wnt ile aktive edilir ve bu da glikojen sentez kinazın (GSK) aktivitesini inhibe eder. Bunun sonucunda β -kateninler hücre çekirdeğine gelir ve Runx2, BMP-2, osteriks ve osteokalsin gibi osteojenik genlerin ekspresyonunu indükler [24, 46, 54, 55].



Şekil 2.9. Melatoninin kemik metabolizması üzerindeki etkisini sağlayan hücre içi sinyal yolları ([46]'dan değiştirilerek).

Literatürde melatoninin kemik doku üzerindeki etkisini inceleyen çeşitli çalışmalar bulunmakta ve tüm bu çalışmalarda melatonin konsantrasyonunun önemi vurgulanmaktadır.

Roth ve ark. [56], 50 nM konsantrasyonundaki serbest melatoninin preosteoblastik MC3T3-E1 hücrelerinin osteojenik farklılaşması üzerindeki etkisini incelemişlerdir. Sonuç olarak hücre farklılaşması ve mineralizasyonunun melatonin varlığında melatonin içermeyen gruba göre çok daha erken görüldüğünü belirtmişlerdir. Son ve ark. [57], 0-250 μ M aralığındaki melatonin konsantrasyonunun yine MC3T3-E1 hücrelerinin farklılaşması üzerindeki etkisini hipoksik koşullar altında incelemiş ve hücrelerin ALP, osteiks, kollajen tip 1 ve OCN ekspresyon seviyelerinin zaman ve konsantrasyon bağımlı olarak arttığı belirlenmiştir. Rahman ve ark. [58], osteoblast proliferasyonunda olumlu etkileri olan fibroblastik büyüme faktörü-2 (FGF-2) ile nanomolar konsantrasyondaki melatoninin sinerjik etkisinin MC3T3-E1 hücreleri üzerindeki etkilerini incelemiş ve her ikisinin birden kullanıldığı gruplarda osteojenik farklılaşmanın çok daha iyi olduğu sonucuna varmışlardır. Böylelikle, FGF-2'nin hücre üremesindeki, melatoninin ise hücre farklılaşması üzerindeki etkilerini birleştiren bir sistem geliştirilmiştir. Nakade ve ark. [59], normal insan kemik hücreleri (HOB-M) ve insan osteoblastik hücre hattı (SV-HFO) üzerinde 0-100 μ M konsantrasyon aralığındaki melatoninin etkilerini incelemişlerdir. Özellikle 50 μ M ve 100 μ M melatonin konsantrasyonunun hücrelerin osteojenik farklılaşmasını diğer konsantrasyonlara ve melatoninle etkileştirilmeyen gruplara göre çok daha fazla desteklediği görülmüştür. Satomura ve ark. [10], insan alt çene kemiğinden veya iliak kemikten izole edilen osteoblastik hücreleri üzerinde 0-200 μ M aralığındaki melatonin konsantrasyonunun etkilerini incelemişler ve hücrelerin alkalen fosfataz aktivitesi ile tip 1 kollajen, osteopontin, kemik sialoproteini ve osteokalsin ekspresyon seviyelerinin konsantrasyon bağımlı olarak arttığı sonucuna varmışlardır. Ayrıca bu çalışmada, farelere melatoninin intraperitoneal uygulaması yapılmış ve melatonin varlığının yeni oluşan kortikal kemik hacmini arttırdığı belirlenmiştir.

Osteoblastik hücreler haricinde, melatoninin mezenkimal kök hücreler üzerindeki etkilerini inceleyen çalışmalar da bulunmaktadır. Radio ve ark. [60], 50 nm melatonin konsantrasyonunun insan mezenkimal kök hücrelerinin (hMSC) ALP aktivitesini önemli derecede arttırdığı sonucuna varmışlardır. Zhang ve ark. [61], melatoninin PLGA mikrokürelere yüklemiş ve bu sistemden kontrollü bir şekilde salınan mikromolar mertebedeki melatoninin hMSClerin osteojenik farklılaşmasını önemli derecede desteklediğini belirtmişlerdir.

Literatürdeki çalışmalar incelendiğinde, melatoninin nanomolar ve mikromolar konsantrasyonlarının hem osteoblastik hücreler hem de mezenkimal kök hücrelerin osteojenik farklılaşmasında olumlu etkilerinin olduğu görülmüştür.

2.2.3. Kanser üzerindeki etkisi

Melatoninin kanser üzerindeki etkisi olduğu 1970’li yıllarda meme kanseri ve melatonin arasında bir bağlantı olduğunu gösteren çalışma ile kanıtlanmıştır [62]. Birçok vücut hücresinde reseptörü bulunan melatoninin hangi özelliklerinin kanser ile ilgili olduğu son yıllarda araştırılan bir konudur. Klinik araştırmalar sonucunda, melatoninin kanser oluşumunu önlediği ve kanser oluşumundan sonra gelişimini yavaşlattığı kanıtlanmıştır. Melatoninin doğrudan anti-kanser etkisinin yanı sıra kronobiyolojik düzenleyici, bağışıklık sistemini destekleyici ve antioksidan özellikleri de kanserle ilişkilendirilmektedir [35, 36, 63]. Melatoninin kanser üzerindeki etkileri aşağıda detaylı bir şekilde açıklanmıştır.

2.2.3.1. Kronobiyolojik düzenleyici etkisi

Melatonin, vücudun zamanlayıcısı gibi davranan bir hormon olmasından dolayı kronobiyolojik düzenleyici olarak düşünülebilmektedir. Kanserde, kanser gelişiminin ilk aşamalarında rol oynayan protoonkogenler ve tümör baskılayıcı genler arasındaki dengenin kontrolü oldukça önemlidir. Melatonin, bu iki tip gen arasındaki dengenin sağlanması açısından çok önemli bir göreve sahiptir. Bu nedenle, melatoninin sentez döngüsünü bozabilecek etmenlerin kansere eğilimi artırabileceği düşünülmektedir [35, 36, 63].

Özellikle kış aylarında, gecelerin uzun sürmesine bağlı olarak melatonin üretimi artmakta ve bu dönemlerde tümör gelişimi yavaşlamaktadır. Buna karşılık, yaz aylarında gündüzlerin uzamasından dolayı melatonin üretimi de azalmakta ve bu durum da kansere yakalanma riskini arttırmaktadır. Yapılan bir araştırmada, gece vardiyasında çalışan kadınlarda meme kanserine yakalanma oranının, gündüz çalışanlara göre daha fazla olduğu belirlenmiştir [34].

2.2.3.2. Bağışıklık sistemini kuvvetlendirici etkisi

Melatonin, bağışıklık sistem hücrelerini reseptörler aracılığı ile doğrudan ya da steroid hormonlarının salımında değişikliklere neden olarak dolaylı yoldan aktive etmektedir [64]. Melatonin sentezinin ya da salımının herhangi bir şekilde engellenmesi sonucu bağışıklık sistemi baskılanmakta ve dolayısıyla vücut hastalıklara karşı savunmasız hale gelmektedir. Bu durumda, melatonin takviyesi ile bağışıklık sistemi tekrardan aktive edilebilmektedir [65]. Melatonin özellikle yaşlanmaya bağlı gelişen bağışıklık sistemi yetersizliklerinde tedavi amacıyla da kullanılabilmektedir [66].

Melatonin, çeşitli sitokinlerin (interlökin-1, interferon- γ , vb.) salgısını arttırarak bağışıklık sisteminin en önemli bileşenlerinden olan T yardımcı lenfositleri aktive etmekte, aynı zamanda kuvvetli anti-apoptotik özelliği sayesinde granülosit ve B lenfositlerin yaşam süresini uzatmaktadır [63, 67]. Ayrıca, kansere karşı savunmada oldukça önemli bir rolü olan doğal öldürücü hücrelerin de sayıca artışına neden olmaktadır. Bunun yanı sıra, interlökin-1, interlökin-6 ve tümör nekroz edici faktör- α gibi sitokinlerin ekspresyonlarını düzenlediği ve bağışıklık hücreleri için güçlü bir apoptoz inhibitörü olduğu bilinmektedir [12, 35, 67-69].

2.2.3.3. Antioksidan etkisi

Kanser proliferatif bir hastalıktır ve tümör oluşumu sırasında hücre DNA'sında onarılamayacak hasarlar oluşması, serbest radikaller olarak ifade edilen yüksek konsantrasyonda reaktif kimyasalların açığa çıkmasına neden olmaktadır [62]. Melatoninin kanser üzerinde etkili olmasının bir diğer nedeni ise kuvvetli antioksidan özelliğidir. Çeşitli kimyasal ajanlar veya başka faktörlerle tetiklenen oksidatif stres reaksiyonları kanserleşme eğilimindeki DNA hasarlarına yol açabilmektedir. Yapılan çalışmalarda melatoninin oksidatif stresle ilişkili olduğu ve güçlü bir antioksidan etkiye sahip olmasından dolayı bu DNA hasarlarını önleyerek olası bir kanser gelişimine engel olacağı düşünülmektedir [35, 36]. Bunun yanı sıra melatoninin kanserin metastazını engellediğine yönelik çalışmalar da mevcuttur [70, 71].

Melatoninin antioksidan etkisi doğrudan ve dolaylı etki olmak üzere ikiye ayrılır. Doğrudan etkide melatonin, reseptörlerden bağımsız olarak hidroksil radikali, süperoksit, hidrojen peroksit, lipoperoksi radikali, peroksinitritler ve nitrik oksit gibi reaktif maddeleri zararsız hale getirmektedir [25, 36, 72]. Melatoninin dolaylı olarak antioksidan özellik göstermesi ise antioksidan enzimlerin aktivitesini yüksek oksidatif stres koşullarında arttırmasından kaynaklanmaktadır [73]. Ayrıca, glutatyon gibi oldukça önemli hücre içi antioksidanların sentezini de indüklemektedir. Bunun haricinde, melatonin oksidatif fosforilasyonu iyileştirerek elektron sızmasını engellemekte ve adenosin trifosfat üretimini arttırarak hücre mitokondrisi içerisinde serbest radikal oluşumunu önlemektedir [35].

Melatonin ayrıca klasik olarak bilinen E ve C vitamini ile β -karoten gibi antioksidanlardan farklıdır. Çünkü bu antioksidanlar ortadan kaldırdıkları oksidan maddelerden daha az zararlı olan prooksidan maddelere dönüşürler. Melatoninin oksidan maddelere etkisi sırasında ve sonrasında oluşan ürünler ise tamamen antioksidan özellik göstermektedir. Ayrıca, melatonin amfifilik yapısından dolayı vücut içerisindeki tüm bariyerlerden geçebilme

özelliğine sahiptir. Bu nedenle melatonin diğer klasik antioksidanlara göre çok daha güçlü bir etkiye sahiptir [36, 62, 73, 74]. Örneğin, hidroksil radikallerini temizleyici özellik gösteren glutatyondan 5 kat, suda çözünen peroksi radikallerini ortadan kaldıran E vitamininden 2 kat, radyasyon kaynaklı kromozom hasarlarını önleyen dimetil sülfoksitten 500 kat daha etkili olduğu belirlenmiştir [27].

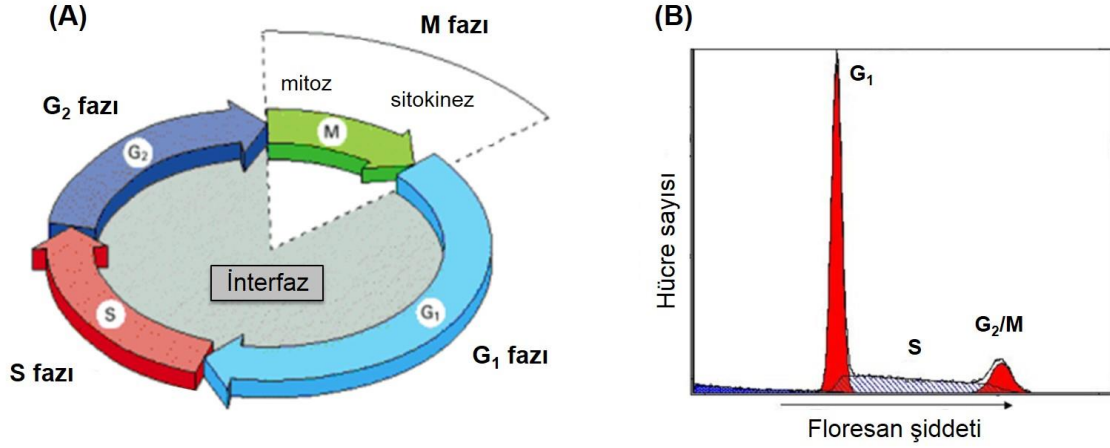
2.2.3.4. Doğrudan anti-kanser etki

Melatonin kanser tedavisinde genellikle kemoterapik ilaçların etkinliğini arttırmak ve kemoterapinin normal hücreler üzerindeki yan etkilerini azaltmak için kullanılmaktadır. Ancak melatoninin doğrudan anti-kanser ajan olarak kullanımı da söz konusudur. Çünkü melatoninin, kanser hücrelerinin gelişimi için gerekli olan faktörlerden linoleik asidin hücre içerisine girmesini engellediği gibi [35, 75], kanser hücre aktivitesinin önemli bir göstergesi olan telomerez enziminin aktivitesini azalttığı belirlenmiştir [36]. Melatonin bütün bu özellikleri sayesinde sınırsız bölünme yeteneğine sahip olan kanser hücrelerinin üremesini engellemekte ve böylece kanserin ilerlemesini durdurmaktadır.

Melatoninin kanser tedavilerinde kemoterapik ilaçlar ile kullanılmasının hem bu ilaçların etkinliğini arttırdığı hem de ilaçların neden olduğu yan etkileri azalttığı *in vitro* ve *in vivo* çalışmalarla belirlenmiştir [11, 76, 77]. Literatürde yapılan çalışmalarda, melatoninin başta meme [78, 79], yumurtalık [80], rahim [81, 82], prostat [83] ve karaciğer [84] olmak üzere çeşitli kanser türleri üzerindeki olumlu etkisi incelenmiştir. Özellikle meme kanseri üzerinde melatoninin çok önemli rolü olduğu belirlenmiştir. Yapılan bir çalışmada, melatonin düzeylerinin genelde en yüksek olduğu gece saatlerinde uyuyamayan kadınlar arasındaki meme kanseri riskinin önemli derecede artış gösterdiği belirlenmiştir [85]. Bir başka çalışmada ise meme kanserine karşı tamoksifen alan kadınlara melatonin takviyesi yapılmasının tümörlerin %28 oranında küçülmesini sağladığı belirlenmiştir [86].

Kanser ve hücre döngüsü arasında oldukça önemli bir ilişki bulunmaktadır. Hücre döngüsü temel olarak interfaz (G₁-S-G₂) ve mitotik evreden (M) oluşmaktadır. G₁ fazında hücreler DNA sentezi öncesi bir hazırlık sürecine girerler. Bu aşamada hücreler hacimce büyürler ve bölünme için gerekli RNA'ları ve proteinleri sentezlerler. S fazında ise DNA sentezi (replikasyonu) gerçekleştikten sonra, G₂ fazında hücreler büyümeye ve gerekli RNA'ları ve proteinleri sentezlemeye devam ederek mitoz hazırlanırlar. M fazında mitoz gerçekleşir ve sonuçta aynı genetik özelliğe sahip iki yeni hücre oluşur. G₀ fazı ise normalde hücre döngüsü içinde yer almayan ve döngüsünü tamamladıktan sonra döngüden çıkan hücrelerin bulunduğu fazdır. Hücreler büyüme ve bölünme sinyali almadıkları zaman ise istirahat fazı

olan G_0 fazında dururken, uyarı aldıklarında G_1 fazına girerler [87-89]. Şekil 2.10'da hücre döngüsüne ait fazlar ve tipik DNA histogramı verilmiştir.



Şekil 2.10. Hücre döngü fazları (A) ve akış sitometrisi ile belirlenmiş diploid DNA'ya ait histogramı ([89]'dan değiştirilerek).

Çeşitli nedenlerle DNA'da meydana gelen hasarlar durumunda hücrelerin G_1 'den S fazına veya G_2 'den M fazına geçişi engellenir. Hücre döngüsünde tümör oluşumunu ve gelişimini doğrudan veya dolaylı olarak etkileyen onkogenler ile tümör baskılayıcı genler arasındaki denge çok önemlidir. En önemli tümör baskılayıcı gen olan p53 geni normal hücrelerde herhangi bir DNA hasarı meydana geldiğinde hücre döngüsünü G_1 'de durdurarak hücreye DNA onarımı için zaman kazandırır. Bu genin işlevini kaybetmesi durumunda ise hücre büyümesi kontrol edilemez ve DNA tamiri gerçekleşmeden hücre döngüsü kontrolsüz bir şekilde devam eder. Aynı şekilde bir tür tümör baskılayıcı gen olan retinoblastoma geni de yine hücre döngüsünü G_1 fazında inhibe eder. Hücre döngüsü siklinler, siklin bağımlı kinazlar ve siklin bağımlı kinaz inhibitörleri tarafından kontrol edilmektedir. Bunların ekspresyonunda meydana gelebilecek bozulmalar da kansere neden olmaktadır.

Melatoninin kanser hücrelerinin hücre döngüsünde G_1 fazından S fazına geçişini geciktirdiğini, normal hücrelerle kanser hücreleri arasındaki iletişimi arttırdığını ve tümör içerisindeki damarlanmayı azalttığını kanıtlayan çeşitli çalışmalar bulunmaktadır [35, 90]. Melatoninin meme kanseri üzerindeki etkilerini inceleyen bir çalışmada, insan meme adenokarsinoma hücreleri (MCF-7) kullanılmış ve 1 nM konsantrasyondaki melatonin ile 5 gün boyunca etkileşen hücrelere ait histogramlar incelendiğinde, S fazındaki hücrelerin melatonin ile etkileştirilmeyen gruba göre %50 oranında azaldığı ve hücrelerin G_1 fazında biriktiği belirlenmiştir. Ayrıca, p53 proteininin ekspresyonunun melatonin ile etkileştirilen

hücrelerde önemli derecede arttığı görülmüştür [78]. İnsan osteosarkom hücre hattı olan MG-63 hücrelerinde 4 mM melatonin konsantrasyonunun G₁ fazındaki hücre miktarını artırırken, S ve G₂/M fazındaki hücreleri azalttığı belirlenmiştir. Ayrıca, siklin D1, siklin bağımlı kinaz-4 siklin B1 ve siklin bağımlı kinaz 1'in sentezini inhibe ettiği sonucuna varılmıştır [91].

2.3. Osteosarkom ve Melatonin-Osteosarkom İlişkisi

Osteosarkom, özellikle çocuk ve genç yetişkinlik dönemlerinde görülen kötü huylu bir tür kemik tümörüdür. En belirgin klinik belirtisi özellikle gece artan ağrıdır. Diğer belirtileri ise şişlik, ele gelen kitle, hareket kısıtlılığı ve patolojik kırıklardır. Bunların haricinde, kilo kaybı ve ateş de görülebilmektedir. Erkeklerde kadınlara oranla iki kat daha sıklıkla görülen osteosarkom, vücuttaki her organa ya da dokuya yayılabilmektedir, ancak yayılmayı ilk tercih ettiği yer akciğerlerdir [92].

Osteosarkomun tanısında bilgisayarlı tomografi ve manyetik rezonans görüntülemeye dayanmaktadır. Biyopsi işleminin ardından osteosarkom tanısı konan hasta için günümüzde uygulanan tedavi sırası önce kemoterapi, cerrahi müdahale ve sonra tekrar kemoterapi şeklindedir. Radyoterapinin ise osteosarkom tedavisinde herhangi bir etkisi bulunmamaktadır. Çünkü etkili olabilmesi için 80 gray (Gy) ve üzerindeki dozlar gerekmektedir ve bu da mümkün değildir [91, 93, 94]. Tüm bu tedavilere rağmen osteosarkom tedavisi sonrası 5 yıl yaşayabilen insan oranı yalnızca %65'tir [95]. Ayrıca, kemoterapi oldukça zorlu bir süreçtir ve sadece kanserli dokuya değil tüm vücuda etki etmektedir. Bu nedenle, daha az yan etkiye sahip yeni ilaçların geliştirilmesine ihtiyaç duyulmaktadır.

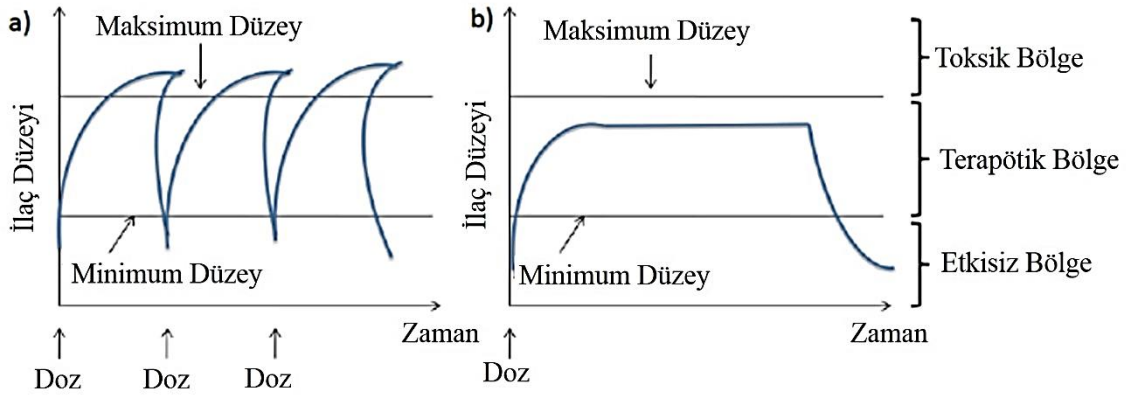
Melatoninin birçok kanser türü üzerindeki olumlu etkileri incelenmiş ve osteosarkom üzerinde de etkili olabileceği düşünülmüştür. Ergenlik döneminin başlangıcında melatonin seviyesi azalmaya başlamakta ve ergenlik boyunca da bu azalış devam etmektedir. Melatoninin kemik gelişimi üzerindeki önemli etkileri de göz önünde bulundurulduğunda, melatonin ve osteosarkom arasında bir bağlantı olabileceği ilk olarak 1997 yılında öne sürülmüştür. Ayrıca, toksik olmayışı, doğrudan anti-kanser ve antioksidan özelliklere sahip olmasından dolayı kemoterapik ilaçların yan etkilerini azaltacağından melatoninin osteosarkom tedavisi için hem kendi başına hem de diğer ilaçlarla birlikte kullanımının umut vaat edici olabileceği öngörülmüştür [96]. Ancak sonrasında osteosarkom tedavisinde melatoninin etkisini inceleyen çok sınırlı sayıda çalışmaya rastlanmıştır. Liu ve ark.'nın 2013 yılında yaptıkları çalışmada, melatoninin yüksek konsantrasyonlarının (~4-10 mM)

insan osteosarkom hücreleri olan MG-63 hücrelerinin proliferasyonunu azalttığı ancak daha düşük konsantrasyonlarının hücre üremesi üzerinde herhangi bir etkisinin olmadığı belirlenmiştir [91]. Cheng ve ark.'nın 2013 yılında yaptıkları çalışmada ise melatoninin insan osteosarkom hücreleri olan 9607 hücre hattı üzerindeki etki mekanizması incelenmiştir. Nikotinamid adenin dinükleotid (NAD^+) bağımlı deasetilaz enzimler olarak bilinen sirtuin (SIRT) ailesi genlerinin kanser üzerinde çeşitli etkilerinin olduğu belirlenmiştir. Bu çalışmada, tümör hücrelerinde fazla miktarda sentezlenen SIRT1'in melatoninin farklı konsantrasyonlarında (250 μ M, 500 μ M ve 1000 μ M) doz ve zaman bağımlı olarak azaldığı gösterilmiştir. Ayrıca, tümör baskılayıcı protein olan p53'ün de sentezinin melatonin varlığında arttığı görülmüştür. Sonuç olarak, melatoninin osteosarkom üzerindeki etkisinin SIRT1 etki mekanizması ile gerçekleştiği belirlenmiş ve osteosarkom tedavisi açısından oldukça güçlü bir ilaç olabileceği vurgulanmıştır [97].

2.4. Kontrollü Salım Sistemleri

İlaç sektöründe çeşitli hastalıkların tedavisi için yeni bir molekül geliştirmek oldukça maliyetli ve uzun zaman alan bir süreçtir. Bu nedenle, geliştirilmiş olan ilaçlardan maksimum oranda yararlanabilme isteği alternatif arayışları başlatmıştır. Burada temel amaç, ilaç dozunu azaltmak, ilaç verme aralığını uzatmak ve ilacın olası yan etkilerini azaltarak hastanın yaşam kalitesini arttırmaktır. Bu amaç doğrultusunda kontrollü salım sistemleri istenilen sonucu vermektedir [7].

Kontrollü salım sistemleri etkin maddenin istenilen konsantrasyonlarda ve belirli zaman aralıklarında salınmasını sağlayan sistemlerdir. Burada temel amaç, kan plazma konsantrasyonundaki etkin madde miktarını sabit tutmaktır (Şekil 2.11). İlaç alımında sıklıkla kullanılan klasik yöntemler ilacın sık ve tekrarlanan dozlarda ağızdan veya enjeksiyon yoluyla alınmasıdır. Bu yöntemlerde ilaç plazma konsantrasyonu etkin düzeyin altında düşebildiği gibi toksik düzeyin üstüne de çıkabilmekte ve bu durumlar hasta için olumsuz etki oluşturmaktadır. Kontrollü ilaç salımı ile tedavi edici oranda ilaç düzeyi sürekli olarak korunmakta, gerek duyulan ilaç miktarı azaltılabilmekte ve kısa yarılanma ömrüne sahip ilaçların kullanımı kolaylaşmaktadır.



Şekil 2.11. İlaç-plazma konsantrasyonunun zamana bağlı değişimi: a) standart dozaj şekli, b) kontrollü salım yapan dozaj şekli ([98]'den değiştirilerek).

Kontrollü salım sistemlerinde etkin madde salımı, taşıyıcı olarak kullanılan polimerin ve ilacın özelliklerine bağlıdır. Polimerin kontrollü salım olarak sağlayacak molekül ağırlığına sahip olması ve zamanla bozunması sonucu oluşacak ürünlerin toksik etkiye neden olmaması gerekmektedir. Kontrollü salım sistemleri uygulama yerine göre (oküler, peroral, transdermal, vb.) sınıflandırılabilirler gibi etkin maddenin salım mekanizmasına göre de sınıflandırılabilirler:

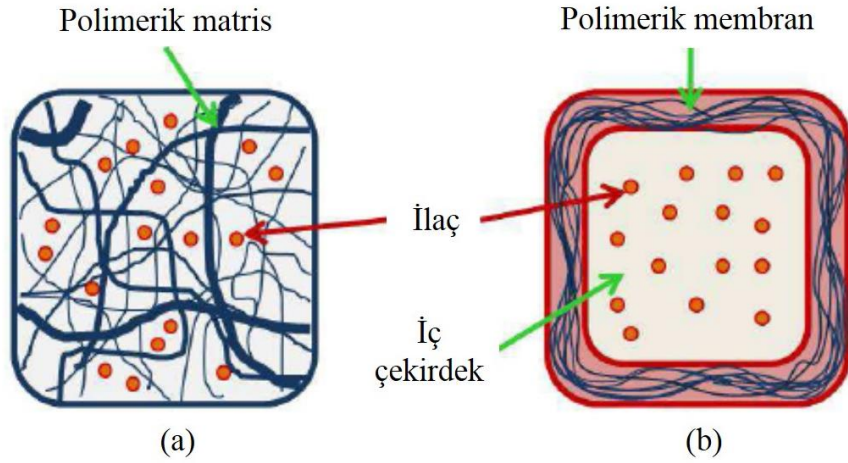
Difüzyon kontrollü sistemler: Rezervuar (membran) sistemler, monolitik (matris) sistemler

Kimyasal kontrollü sistemler: Vücutta aşınan sistemler, zincire takılan sistemler

Çözücünün harekete geçirdiği sistemler: Şişme kontrollü sistemler, ozmotik kontrollü sistemler

Diğer sistemler: Manyetik kontrollü sistemler, ultrasonik sistemler, ortama duyarlı sistemler (pH, sıcaklık)

Difüzyon kontrollü sistemler yukarıda da belirtildiği gibi rezervuar (membran) sistemler ve monolitik (matris) sistemlerden oluşmaktadır (Şekil 2.12). Bu sistemlerden etkin maddenin salımı, suda çözünmeyen bir polimerden ilacın difüzyonu ile kontrol edilmektedir. Monolitik sistemlerde etkin madde inert polimerik bir matris içerisinde homojen bir şekilde çözünmüş veya dağılmıştır. Rezervuar sistemlerde ise etkin maddeyi içeren iç çekirdek, suda çözünmeyen polimerik bir membranla kaplanmıştır.



Şekil 2.12. (a) Monolitik ve (b) rezervuar sistemlerin yapısı ([99]'dan değiştirilerek).

Rezervuar sistemlerde polimerik membran içerisinde dağılmış olan etkin madde membrandan sistemi çevreleyen ortama difüzenir ve bu sistemlerde salım hızını kontrol eden basamak, etkin maddenin polimerik membrandan difüzyonudur. Etkin maddenin rezervuar sistemlerden salımı Fick'in birinci yasasına göre gerçekleşmektedir (Eşitlik 2.1) ve etkin madde salımı sıfırıncı derece kinetik ile sağlanmakta yani maddenin sistemden salım hızı salım süresince sabit kalmaktadır.

$$J = -D \frac{dC}{dx} \quad (\text{Eşitlik 2.1})$$

J: Birim zamanda, birim alandan geçen çözünmüş etkin madde miktarı (akı) ($\text{g}/\text{cm}^2 \cdot \text{s}$)

D: Etkin maddenin difüzyon katsayısı (cm^2/s)

C: Etkin madde derişimi (g/cm^3)

x: Difüzyon mesafesi (cm)

Monolitik sistemlerde ise etkin maddenin polimerik matristen salımı önce yüzeye yakın kısımlardan, ardından matrisin iç kısımlarından gerçekleşmektedir. Bu sistemlerden salımda moleküllerin aldığı mesafeler birbirinden farklı olduğundan sıfırıncı derece salım kinetiğine ulaşamaz. Etkin maddenin salım miktarı zamanın karekökü ile orantılıdır ve salım hızı zamanla azalmaktadır.

2.5. *In Vitro* Salım Kinetiği ve Salım Mekanizmasının Belirlenmesi

İlaç salım kinetiğinin belirlenmesinde çeşitli matematiksel modellerden yararlanılmaktadır. Salım verileri bu modeller kullanılarak grafiğe geçirilir ve grafiğin lineer regresyon katsayısına (R^2) göre salımın hangi modele uyduğu belirlenir.

Sıfırıncı derece kinetik: Sıfırıncı dereceden salım hızı matematiksel olarak Eşitlik 2.2 ile ifade edilmektedir.

$$Q_t = Q_0 + K_0 t \quad (\text{Eşitlik 2.2})$$

Q_0 = başlangıçtaki ilaç miktarı

Q_t = t süre sonunda salınan kümülatif ilaç miktarı

K_0 = sıfırıncı derece salım hız sabiti

Sıfırıncı derece salım kinetiği zamanla yüzey alanı değişmeyen ve ilacı yavaş salan sistemler için uygundur. Bu sistemlere örnek olarak deriye yapıştırılan bantlar, matris tabletler ve osmotik sistemler verilebilir. Bu kinetiğe göre birim zamanda salınan ilaç miktarı konsantrasyondan bağımsız olup hep sabit kalmaktadır [100].

Birinci derece kinetik: Birinci dereceden salım kinetiği, salım hızının konsantrasyona bağlı olduğu durumlarda görülmektedir ve matematiksel olarak Eşitlik 2.3 ile ifade edilmektedir [101].

$$\log Q_t = \log Q_0 + K_1 t \quad (\text{Eşitlik 2.3})$$

K_1 = birinci derece salım hız sabiti

Bu salım kinetiğinde çözeltiye geçen ilaç miktarı matris içerisinde kalan ilaç miktarına bağlı olarak zamanla azalmaktadır. Klasik ilaç sistemlerinin çoğu ve uzatılmış etkili salım yapan sistemler bu tür salım kinetiğine uymaktadırlar [102].

Higuchi modeli: Etkin madde salımı değiştirilmiş sistemlerin çoğu matris sistemi şeklindedir. Higuchi, kontrollü salım yapan katı matrisler içerisinde disperse edilmiş etkin maddenin salım hızlarını belirleyen matematiksel ilişkileri teorik olarak incelemiştir [103]. Bu salım kinetiği Eşitlik 2.4 ile ifade edilmektedir.

$$Q_t = Q_0 + K_H t^{1/2} \quad (\text{Eşitlik 2.4})$$

K_H = Higuchi salım hız sabiti

Salınan etkin madde miktarına karşılık zamanın karekökü grafiği çizildiğinde, eğer salım difüzyon kontrollü ise eğimi Higuchi salım hız sabitine eşit olan bir doğru elde edilmektedir.

Hixson-Crowell modeli: Bu salım kinetiği salım sırasında yüzey alanında ve çapında değişim olan sistemler için kullanılmaktadır. ‘Küpkök kanunu’ olarak da bilinen salım kinetiği Eşitlik 2.5 ile gösterilmektedir [104]. Tabletler gibi çözünmenin yüzeye paralel

gerçekleştirdiği ve geometrik şeklin bozulmadan tüm yüzeyin orantılı bir şekilde küçülüp homojen bir şekilde erozyona uğradığı sistemlerde iyi sonuç vermektedir. Bu modelde ilaç salım hızını polimerik matristen difüzyonunun değil, ilaç moleküllerinin çözünme hızının belirlediği kabul edilmektedir.

$$Q_0^{1/3} - Q_t^{1/3} = K_{HC}t \quad (\text{Eşitlik 2.5})$$

K_{HC} =Hixson-Crowell salım hız sabiti

Korsmeyer-Peppas modeli: Polimerik sistemlerden etkin maddenin kontrollü salım mekanizmasını inceleyen modellerin çoğu Fick difüzyon eşitliğine dayanmaktadır. Ancak, deneysel koşullarda salım mekanizması Fick eşitliğinden sapma gösterebilmektedir. Bu nedenle, değişik geometrik şekillerdeki polimerik sistemlerin kontrollü salım verilerinin değerlendirilmesinde Korsmeyer-Peppas tarafından önerilen Eşitlik 2.6'dan yararlanılmaktadır [105].

$$\log \left(\frac{M_t}{M_\infty} \right) = \log k + n \log t \quad (\text{Eşitlik 2.6})$$

M_t = t zamanında salınan etkin madde miktarı

$M_\infty = \infty$ zamanda salınacak etkin madde miktarı

k = salım sisteminin yapısal ve geometrik özelliklerini ifade eden kinetik sabit

n = salım mekanizmasını gösteren difüzyonel sabit

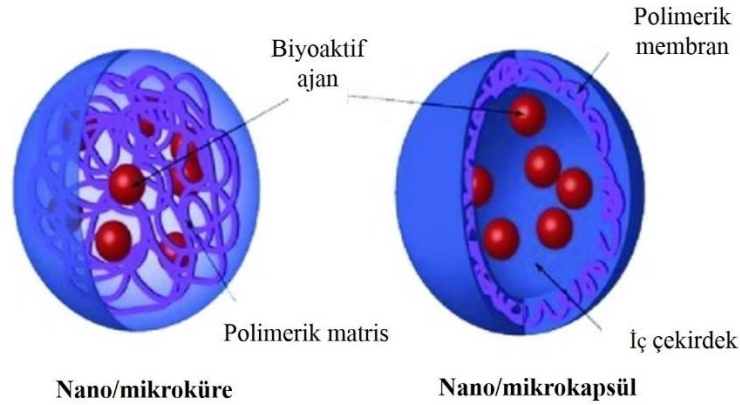
Bu model, salım mekanizmasının tam olarak bilinmediği veya birden fazla salım mekanizmasının geçerli olduğu durumlarda kullanılmaktadır. Korsmeyer-Peppas eşitliği sink koşul altında yani salım ortamının sürekli olarak tazelendiği durumda ve sistemden etkin madde salımının ilk %60'lık ($M_t/M_\infty \leq 60$) kısmı için geçerlidir. Peppas tarafından önerilen “n” değerlerinin farklı geometrik şekillerdeki sistemler için salım mekanizmasına göre değişimi Çizelge 2.1’de verilmiştir.

Çizelge 2.1. Farklı geometrik şekildeki salım sistemleri için “n” parametresinin değerleri ve salım mekanizmaları.

İnce film	Silindir	Küre	Salım mekanizması
0.5	0.45	0.43	Fick’e uygun difüzyon (Durum I)
$0.5 < n < 1$	$0.45 < n < 0.89$	$0.43 < n < 0.85$	Fick’e uymayan (Anormal geçiş)
1	0.89	0.85	Durum II
$n > 1$			Süper-durum II geçiş

2.6. Polimerik Nano/Mikropartiküller

Nanopartiküller boyutları 10-1000 nm, mikropartiküller ise boyutları 1-1000 µm arasında değişen katı parçacıklardır. Biyoaktif ajan (ilaç, biyosinyal molekül vb.) partikül içerisine enkapsüle edilebildiği gibi, yüzeye adsorplanarak veya kimyasal olarak bağlanarak partiküller ile birleştirilebilmektedir [106, 107]. Polimerik nano/mikropartiküller, **küre** ya da **kapsül** şeklinde üretilmektedirler. (Şekil 2.13). Nano/mikrokapsüller polimerik bir duvar ve bu duvarın içerisinde biyoaktif ajanın hapsedildiği bir çekirdek içeren veziküler sistemlerdir. Nano/mikroküreler ise, biyoaktif ajanın çözündüğü ve polimerik yapı içerisinde homojen bir şekilde dağıldığı matris sistemlerdir [106-108].



Şekil 2.13. Nano/mikro partiküllerin şematik gösterimi ([109]’dan değiştirilerek).

Biyoaktif ajanlar polimerik nano/mikropartiküllere iki farklı yolla yüklenebilmektedir. Birincisi, ilacın partiküllere üretim aşamasında yüklenmesi, ikincisi ise partikül üretildikten sonra partiküllerin ilaç çözeltisi içerisinde inkübasyonu ile ilacın partiküllere adsorplanması ya da kimyasal olarak bağlanmasıdır [110]. Nano/mikropartiküllerin ilaç içeriğini tayin etmenin en güvenilir yolu, partikülün uygun bir çözücüde çözülerek içerisinde bulunan ilacın doğrudan tayin edilmesi veya partiküle bağlanmayan ilacın ultrasantrifügasyon ya da jel

filtrasyon yöntemiyle partikülden uzaklaştırılıp dolaylı olarak tayin edilmesidir. Buradan yola çıkarak biyoaktif ajanın enkapsülasyon verimi aşağıdaki eşitlik (Eşitlik 2.7) kullanılarak hesaplanabilmektedir.

$$\text{Enkapsülasyon Verimi (\%)} = \frac{\text{Yüklenen ilaç miktarı}}{\text{Toplam ilaç miktarı}} \times 100 \quad (\text{Eşitlik 2.7})$$

2.6.1. Üretim yöntemleri

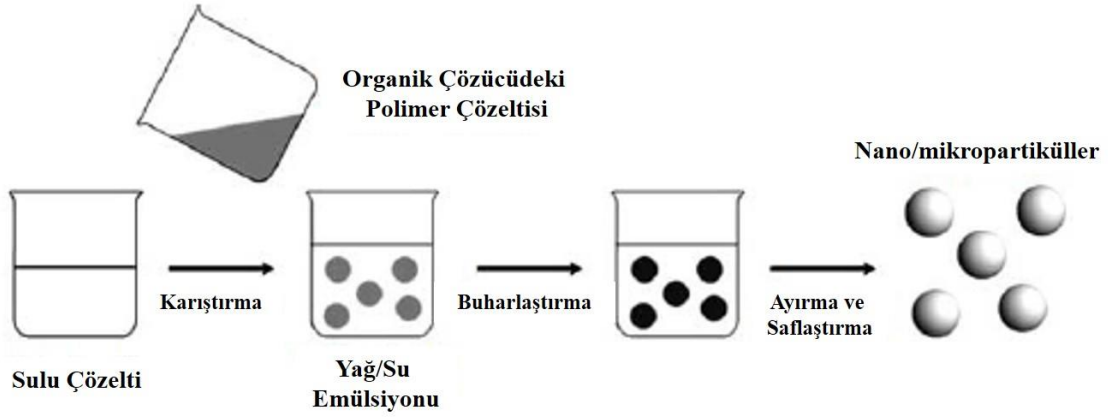
Polimerik nano/mikropartiküllerin yapısı, bileşimi ve fizikokimyasal özelliklerinin ayarlanmasına olanak sağlayan çeşitli üretim yöntemleri bulunmaktadır. Kullanılan polimerin biyouyumluluk özelliği, bozunma davranışı, uygulama yolu ile biyoaktif ajanın istenilen salım profili ve biyomedikal uygulama türü gibi parametreler polimer seçimini etkilemektedir. Oluşan partiküllerin özelliklerini ise çözücü, sıcaklık, stabilizör ve karıştırma hızı gibi birçok parametre etkilemektedir. Tüm parametreler, istenilen partikülün özelliklerine göre optimize edilmeli ve buna uygun üretim yöntemi seçilmelidir [111]. Aşağıda polimerik nano/mikropartiküllerin sentez yöntemleri detaylı bir şekilde açıklanmıştır.

2.6.1.1. Emülsiyon oluşturma/çözücü buharlaştırma yöntemi

Emülsiyon oluşturma/çözücü buharlaştırma yöntemi, polimerin organik çözücü içerisinde çözünmesi ve sonrasında bu organik fazın sulu faz ile karıştırılması ile emülsiyon oluşturulması temeline dayanmaktadır. Oluşan emülsiyon, çözücünün buharlaşması sonucu nanopartikül süspansiyonuna dönüşmektedir. Yöntem, tekli emülsiyon ve ikili emülsiyon oluşturma/çözücü buharlaştırma olmak üzere iki farklı şekilde uygulanmaktadır [106, 112].

Tekli emülsiyon oluşturma/çözücü buharlaştırma

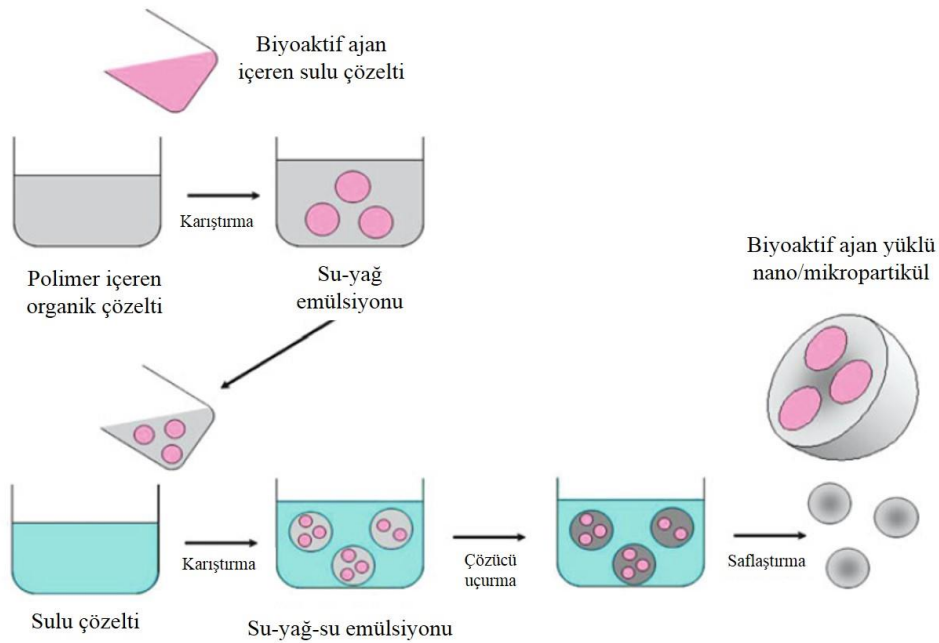
Bu yöntemde, polimer ve hidrofobik biyoaktif ajanı içeren organik faz ile yüzey aktif maddeyi ve stabilizörü içeren sulu faz vardır. Bu iki fazın karışımı sonucu emülsiyon oluşur. Yüksek hızlı homojenizasyon ile oluşan damlacıkların boyutu küçültülür ve ardından manyetik karıştırıcıda devamlı bir karıştırma sağlanarak organik çözücünün buharlaşması sonucu nano/mikropartiküllerin üretimi gerçekleşir (Şekil 2.14) [111, 112].



Şekil 2.14. Tekli emülsiyon oluşturma/çözücü buharlaştırma yöntemi ile nano/mikropartikül üretimi ([113]'ten değiştirilerek).

İkili emülsiyon oluşturma/çözücü buharlaştırma

Bu yöntem yukarıda anlatılan tekli emülsiyon oluşturma/çözücü buharlaştırma yönteminin modifiye edilmiş halidir. Genellikle peptit ya da protein gibi hidrofilik moleküllerin yükleneceği nano/mikropartiküllerin üretiminde bu yöntem tercih edilmektedir. İlk olarak biyoaktif ajan su içerisinde çözünür ve ardından bu sulu faz polimerin çözündüğü organik fazda dağıtılır. Hazırlanan su/yağ emülsiyonu genellikle stabilizör ajanı içeren sulu faza eklenir, böylece su/yağ/su ikili emülsiyonu oluşur. Organik fazın uzaklaştırılması sonucu nanopartikül süspansiyonu elde edilir (Şekil 2.15).

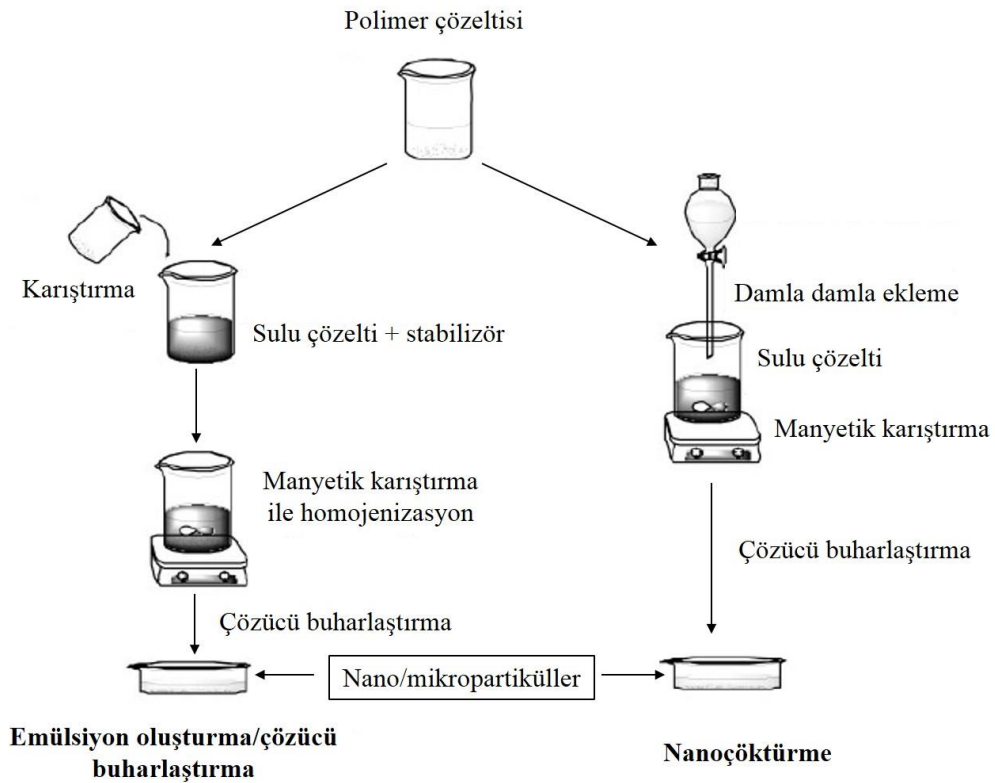


Şekil 2.15. İkili emülsiyon oluşturma/çözücü buharlaştırma yöntemi ile nano/mikropartikül üretimi ([113]'ten değiştirilerek).

2.6.1.2. Nanoçöktürme yöntemi

Nanoçöktürme yöntemi oldukça basit, hızlı ve düşük enerji gerektiren bir yöntemdir. Temel olarak, suyla karışabilen, yarı polar çözücünün yer değişimi sonucu polimerin ara yüzeyde çökmesi sonucu partikül oluşumu gerçekleşmektedir. Bu nedenle bu yöntem çözücü yer değişimi yöntemi olarak da adlandırılmaktadır [108]. Bu yöntem, birbiri ile karışan iki çözücü gerektirmektedir. Polimer ve partiküle yüklenecek biyoaktif ajanın ilk fazda çözünmesi ancak ikinci fazda çözünmemesi gerekmektedir. Bu iki fazın karıştırılması sonucunda polimeri içeren çözücü diğer faza difüzlenir ve polimer hızla katılır.

Bu yöntemdeki en büyük sorun, stabilizör yokluğundan dolayı partiküllerin bir araya gelme eğiliminde olmasıdır. Bu durum, hızlı ve etkili bir karıştırma, organik fazın sulu faza yavaş yavaş eklenmesi ve uygun çözücü sisteminin seçimi ile önlenabilmektedir [111, 114]. Emülsiyon oluşturma/çözücü buharlaştırma yöntemi ile benzerlik gösterse de ufak farklılıklar bulunmaktadır. Her iki yöntemin deneysel basamaklarının karşılaştırması Şekil 2.16'da verilmiştir.

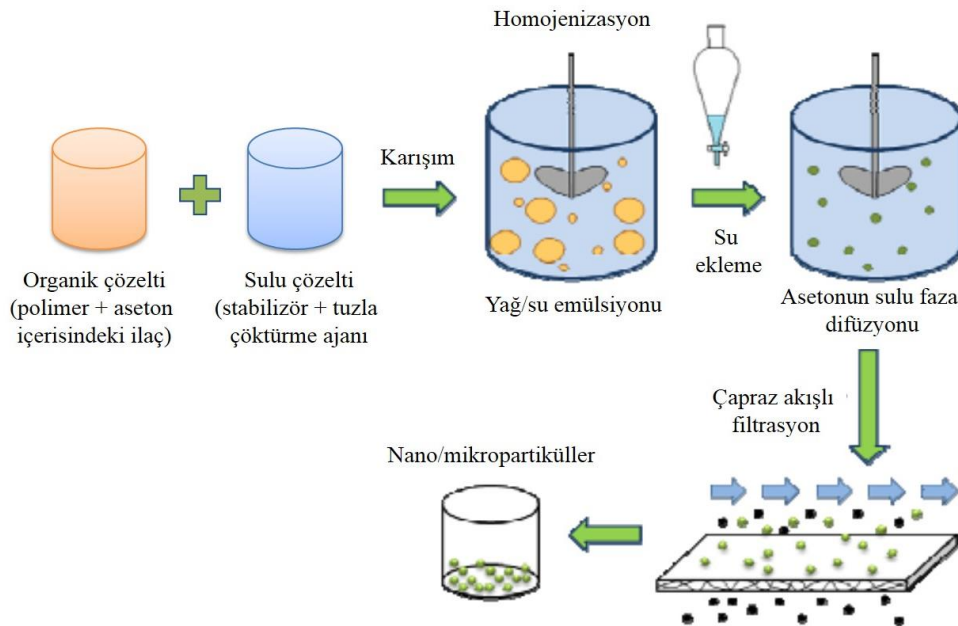


Şekil 2.16. Emülsiyon oluşturma/çözücü buharlaştırma ve nanoçöktürme yöntemi arasındaki farklılıkları gösteren deneysel basamaklar ([111]'den değiştirilerek).

2.6.1.3. Tuzla çöktürme yöntemi

Tuzla çöktürme (salting-out) yönteminde biyoaktif ajan ve polimer, aseton ya da tetrahidrofuran gibi çözücülerde çözünür. Oluşan çözelti, içerisinde “tuzla çöktürme ajanı” içeren sulu çözeltiye aktarılır. Tuzla çöktürme ajanı olarak magnezyum klorür, sodyum klorür, magnezyum asetat ve süktroz kullanılır. Sonrasında, oluşan su/yağ emülsiyonuna fazla miktarda su eklenir. Suyun emülsiyona hızlı bir şekilde eklenmesi iyonik kuvveti azaltır ve bu da organik çözücünün sulu faza difüzyonunu sağlar. Böylelikle partikül oluşumu gerçekleşir. Bu yöntemin şematik gösterimi Şekil 2.17’de sunulmuştur.

Bu yöntem genellikle yüksek miktarda polimer ve biyoaktif ajanın kullanılacağı durumlarda tercih edilmektedir. Klorlu çözücüler ve yüzey aktif maddeler kullanılmadığından avantajlı bir yöntem olmasına rağmen, kullanılan tuzların iyi bir şekilde nanopartiküllerden uzaklaştırılamaması yöntemin en önemli sorunlarından biridir [111].



Şekil 2.17. Tuzla çöktürme yöntemi ile nano/mikropartiküllerin üretimi ([99]’dan değiştirilerek).

2.6.1.4. Püskürterek kurutma yöntemi

Polimerik nano/mikropartiküllerin üretiminde kullanılan bir diğer yöntem püskürterek kurutma yöntemidir. Genellikle ilaç sektöründe kullanılan bu yöntemde partiküle yüklenecek biyoaktif ajan, polimerin çözündüğü organik fazda çözülür veya dağıtılır. Ardından sıcak hava akımına spreylenebilir. Çözücünün hızlı bir şekilde uzaklaşması sonucu nanopartiküller elde edilir.

Bu yöntemin en önemli dezavantajı oluşan partiküllerin boyutunun çok geniş bir aralıkta olmasıdır. Ayrıca işlem sırasında cihazın duvarlarına partiküllerin yapışması sonucu çok miktarda ürün kaybı olmaktadır [111].

2.6.1.5. Polimerizasyon yöntemi

Bu yöntemde diğer yöntemlerden farklı olarak polimer yerine monomer kullanılmaktadır. Emülsiyon polimerizasyonu olarak bilinen bu yöntemde, dispersiyon fazı olarak genellikle su kullanılmaktadır. Monomer, yüzey aktif madde yardımı ile bu ortamda dağıtılır. Bu ortamda ayrıca suda çözünen bir başlatıcı molekül de bulunmaktadır. Yüzey aktif madde, dispersiyon ortamı içerisinde misel denilen küçük kolloidal yapıları oluşturmak üzere toplanır ve polimerizasyon bu misel yapısı içerisinde gerçekleşir. Kısaca, monomerin ara yüzeyde polimerizasyonu ile nano/mikropartikül üretimi gerçekleştirilmektedir. Uygun yıkama ve saflaştırma işlemleri sonrasında katı haldeki partiküller elde edilir. Bu yöntemde reaksiyona girmeyen monomerler toksik etki yaratabileceğinden partiküllerin çok iyi bir şekilde yıkanması büyük önem taşımaktadır. Bu yöntemde oluşacak partikül boyutu yüzey aktif maddenin türüne ve konsantrasyonuna bağlıdır [106].

2.6.2. Nano/mikropartiküllerin doku mühendisliğinde kullanım alanları

Doku mühendisliğinde polimerik nano/mikropartiküller oldukça büyük önem taşımaktadır. Özellikle nanopartiküller, hücre içerisine kolaylıkla alınabildiklerinden hücre işaretlenmesinde tercih edilmektedirler. Viral vektörlerle kıyaslandığında bağışıklık sisteminin tepkisine neden olmamalarından dolayı gen taşınımında polimerik nano/mikropartiküllerden yararlanılmaktadır. Yapılacak çalışmanın amacına göre, geniş yüzey alanına sahip bu yapıların çeşitli malzemelerle modifiye edilerek yüzey özellikleri değiştirilebilmekte ve seçilen biyoaktif molekülün yüzeye bağlanması söz konusu olabilmektedir. Böylece nano/mikropartiküllerin sadece hedeflenen hücre ve dokularla etkileşmesi sağlanmaktadır. Bunun haricinde, büyüme faktörlerinin taşınması ve kontrollü salımında nano/mikropartiküllerden sıklıkla yararlanılmaktadır. Ayrıca, doku iskelelerinin yeterli mekanik dayanıma sahip olmaması ve farklılaşmayı uyuracak büyüme faktörlerinin yeterli miktarda sentezlenememesi gibi nedenlerden dolayı partiküllerin doku iskeleleri ile birleştirildiği çok sayıda çalışma bulunmaktadır. Bunun haricinde nano/mikropartiküllere çeşitli optik veya manyetik özellikler kazandırılarak hastalıkların tanısı için çeşitli görüntüleme tekniklerinde kullanılabilirlikleri de söz konusudur [115].

Doku mühendisliğinde biyosinyaller, hücrelerin tutunmasını, çoğalmasını ve istenilen dokuya farklılaşmasını sağlayan moleküllerdir. Bu moleküller, kültür ortamına doğrudan

eklenebildikleri gibi doku iskelelerine yüklenerek de kullanılmaktadırlar. Ancak biyosinyal moleküllerinin doğrudan kullanılması durumunda genellikle kararsız kimyasal yapıları ve yarılanma ömürlerinin kısa olması gibi olumsuzluklardan dolayı istenilen etki sağlanamamaktadır. Dolayısıyla biyoaktif ajanların çeşitli taşıyıcı sistemlere yerleştirilerek kontrollü bir şekilde ve uzun dönemde salımı oldukça büyük önem taşımaktadır. Biyobozunur polimerik nano/mikropartiküller biyouyumlu olmaları, toksik özellik göstermemeleri ve kimyasal olarak modifiye edilebilmeleri gibi avantajlı özelliklerinden dolayı çoğunlukla taşıyıcı sistemler olarak tercih edilmektedirler.

Doku mühendisliğinde biyoaktif ajanların nano/mikropartiküllerden salımında hedeflendirme oldukça büyük önem taşımaktadır. Böylelikle ilaçların kararlılığı artmakta ve vücudun diğer bölgelerinde herhangi bir istenmeyen etkileşime neden olmadan hedef bölgede istenilen düzeyde yanıt elde edilebilmektedir. Pasif ve aktif olmak üzere iki çeşit hedeflendirme yöntemi bulunmaktadır. Pasif hedeflendirmede intravenöz enjeksiyondan sonra nano/mikropartiküller taşıyıcı büyüklüğüne bağlı olarak çeşitli organ, doku veya hücreye yerleşirken, aktif hedeflendirmede taşıyıcı sistem spesifik hücrelere, dokulara veya organlara yönlendirilmektedir.

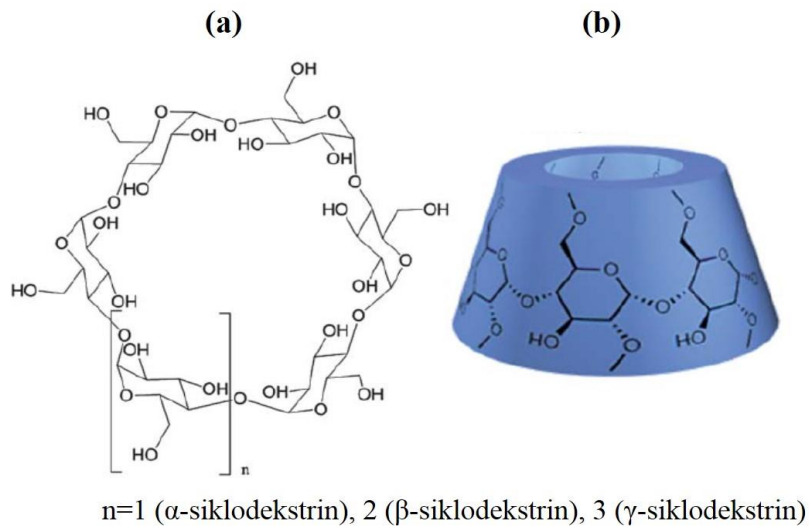
Pasif hedeflendirmede, partikülün boyutu, şekli ve yüzey özellikleri önem taşımaktadır ve mekanizması organların veya dokuların partikülü seçmesine bağlı olarak istenilen yerde tutulması temeline dayanmaktadır. Hidrofobik özelliğe sahip küçük partiküller kan dolaşımına girer girmez plazma bileşenleri tarafından hızla kaplanarak genellikle retikuloendotelial sistemde toplanırlar. Büyük partiküller (~10 µm) akciğerlerde tutulurken parçacıklar küçüldükçe böbrek, dalak, karaciğer ve diğer organlara ulaşmaktadır. Pasif olarak hedeflendirilecek ilaç taşıyıcı sistemlerin yüzey yükleri, partikül boyutları, vücuda verilmiş yolları ve yüzey hidrofobisitesi değiştirilerek farklı hedeflere yönlendirilmeleri mümkündür [7, 116, 117].

Aktif hedeflendirmede ise, doğrudan etkin maddeye veya etkin maddeyi taşıyan taşıyıcıya bağlı hedefleyici bir molekül bulunmakta ve böylece biyoaktif madde spesifik bir bölgeye ulaşmaktadır. Manyetik, ultrasonik ve ligand-reseptör aracılı olmak üzere 3 farklı aktif hedeflendirme yöntemi bulunmaktadır. Manyetik hedeflendirmede, manyetik ilaç taşıyıcısına bağlı veya taşıyıcıya enkapsüle edilmiş biyoaktif ajanın intravenöz enjeksiyondan sonra dışardan manyetik alan uygulamasıyla istenilen bölgeye yönelimi söz konusudur. Bu amaçla genellikle manyetik nanopartiküller kullanılmaktadır [118]. Ultrasonik hedeflendirmede, dışarıdan istenilen bölgeye ultrasonik dalgalar

uygulanmaktadır. Burada salım, ultrasonik dalgaların şiddet, frekans ve uygulama süresine bağlıdır [7]. Ligand-reseptör aracılı hedeflendirmede ise taşıyıcı sistemler uygun bir ligand ile modifiye edilerek hücre yüzeyindeki spesifik reseptörlere yönlendirilirler. Böylece, taşıyıcı sistem ligandın ve reseptörün yapısına bağlı olarak reseptör aracılı hücre içerisine alınmakta ve hedeflenen bölgede biyoaktif ajanın salımı gerçekleşmektedir. Bu amaçla kullanılacak olan ligand, hedeflenen hücrede bulunan reseptörün özelliklerine bağlı olarak seçilmelidir [117, 119].

2.7. Siklodekstrinler ve İnküzyon Kompleksleri

Siklodekstrinler (CD) nişastanın glikoziltransferaz enzimi ile parçalanması sonucu oluşan, birbirine α -(1,4) bağı ile bağlanmış, altı (α -siklodekstrin), yedi (β -siklodekstrin), sekiz (γ -siklodekstrin) ya da daha çok glikopiranoz ünitelerinden oluşan halkalı yapıda oligosakkaritlerdir. Sterik engellerden dolayı en az altı glikopiranoz biriminden oluşan siklodekstrin molekülünün yapısı kesik bir koniye benzemektedir ve dış tarafı hidroksil gruplarından dolayı hidrofilik, iç boşluğu ise apolar özellikteki hidrojen atomları ve glikozidik oksijenlerin varlığından dolayı hidrofobik özelliktedir [120, 121]. Siklodekstrinlerin kimyasal ve üç boyutlu moleküler yapısı Şekil 2.18’de gösterilmiştir.



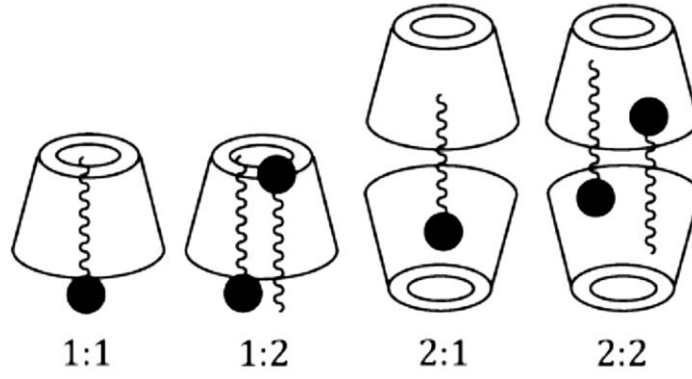
Şekil 2.18. Siklodekstrinlerin (a) kimyasal, (b) üç boyutlu moleküler yapısı ([122]’den değiştirilerek).

Siklodekstrinlerin sudaki çözünürlükleri, yapılarındaki hidroksil grupları arasındaki hidrojen bağlarının varlığından dolayı oldukça düşüktür ve çeşitlerine göre değişiklik göstermektedir. Örneğin, β -siklodekstrinlerin çözünürlüğü (1.85 g/100 mL) diğer siklodekstrinlere göre (α -siklodekstrin: 14.5 g/100 mL; γ -siklodekstrin: 23.2 g/100 mL) yaklaşık dokuz kat daha

düşüktür [123]. Düşük çözünürlük özelliği, siklodekstrinlerin çeşitli uygulamalardaki kullanımlarını kısıtlamaktadır, bu nedenle kimyasal yöntemlerle modifiye edilerek siklodekstrin türevleri oluşturulmaktadır. Bu türevler genellikle siklodekstrinlerin yapısındaki birincil ve ikincil hidroksil gruplarının aminlenmesi, esterleşmesi ve eterleşmesi ile üretilmektedirler [124]. Bir hidroksialkil β -siklodekstrin türevi olan hidroksipropil- β -siklodekstrin (HP β CD) yüksek çözünürlüğü ve inklüzyon oluşturma kabiliyetinden dolayı ilaç enkapsülasyonu için sıklıkla kullanılmaktadır [120, 125]. Ayrıca, yapılan toksisite çalışmaları HP β CD'in intravenöz ve oral uygulamalarda insan vücudu tarafından oldukça iyi bir şekilde tolere edildiğini göstermiştir [120].

Siklodekstrinlerin en önemli özelliklerinden biri çok çeşitli katı, sıvı ve gaz yapıdaki moleküller ile “inklüzyon kompleksi” oluşturabilme yeteneğidir. Bu yapı, misafir olarak ifade edilen molekülün ev sahibi siklodekstrin yapısının iç boşluğuna girmesi ile oluşmaktadır. Inklüzyon kompleksi oluşumunda siklodekstrinin iç boşluğu ile bu boşluğa girecek olan molekülün aralarındaki geometrik uyum önem taşımaktadır. Inklüzyon kompleksinin oluşabilmesi için molekülün siklodekstrinin iç boşluğuna tamamen veya kısmen girmesi gerekmektedir. Siklodekstrinlerin hidrofobik iç boşluğu uygun boyuttaki apolar yapıya sahip moleküllerin yapı içerisine girerek inklüzyon kompleksi oluşturmaya olanak sağlamaktadır [124].

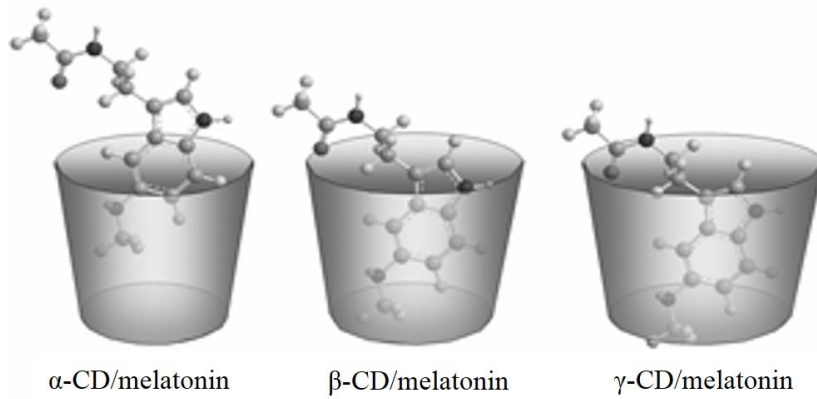
Inklüzyon kompleksi genellikle 1:1 molar oranda gerçekleşmektedir ancak bazı yapılarda 1:2, 2:1 veya 2:2 oranında da kompleks oluşumu gözlenebilmektedir. Misafir molekül siklodekstrinin iç boşluğuna tamamen uyacak büyüklükte ise 1:1 kompleksi oluşur. Ancak eğer misafir molekülün boyutu büyükse bu molekülü hapsetmek için birden fazla siklodekstrin molekülüne ihtiyaç vardır ve bu durumda 1:2 veya daha fazla sitokiyometrik oranda inklüzyon kompleksi oluşmaktadır. Eğer siklodekstrinin iç boşluğu yeterince büyükse de iki adet misafir molekül bu boşluğa girebilmekte ve dolayısıyla 2:1 sitokiyometrik oranda inklüzyon kompleksi oluşmaktadır (Şekil 2.19). Boyutları çok küçük olan moleküller siklodekstrin tarafından çevrelenmediğinden kompleks oluşumu gözlenmez. Aynı şekilde misafir molekül çok büyükse de siklodekstrin yapısı içerisine alınamayacaklarından başarılı bir inklüzyon kompleksi oluşumu gözlenmez.



Şekil 2.19. Farklı sitokiyometrik oranlardaki inklüzyon komplekslerinin şematik gösterimi ([126]'dan değiştirilerek).

İnklüzyon kompleksi oluşumunda herhangi bir şekilde kovalent bağ oluşumu ya da kırılması söz konusu değildir. Bağlanma, siklodekstrin ve misafir molekül arasındaki hidrojen bağları, van der Waals ve dipol-dipol etkileşimleri ve elektrostatik etkileşimler ile gerçekleşmektedir [124, 127]. Misafir molekülün siklodekstrine bağlanmasında dinamik bir denge söz konusudur. Hidrofobik moleküller hidrofilik moleküllere göre siklodekstrinlere daha çok ilgi göstermektedir. İnklüzyon kompleksinin oluşumu için siklodekstrinin iç boşluğundan suyun uzaklaştırılması gerekmektedir. Çünkü su ortamında, siklodekstrinin apolar iç boşluğu içerisinde bulunan polar su molekülleri siklodekstrinin iç yüzeyi tarafından itilmekte ve yapı enerjisi açısından kararsız bir konuma geçmektedir. Konuk molekülün siklodekstrin boşluğuna girmesiyle ise kararlı inklüzyon kompleksleri oluşmaktadır [124].

Amfifilik bir molekül olan melatonin, sahip olduğu lipofilik yapıdaki indol halkasından dolayı siklodekstrinlerin hidrofobik boşluğuna yerleşerek inklüzyon kompleksi oluşturma açısından oldukça uygundur (Şekil 2.20) [27, 128].



Şekil 2.20. Melatoninin çeşitli siklodekstrinler ile oluşturduğu inklüzyon komplekslerinin şematik gösterimi ([128]'den değiştirilerek).

Literatürde melatoninin çeşitli siklodekstrinler ile inklüzyon kompleksi oluşumunu inceleyen çalışmalar bulunmaktadır. Bongiorno ve ark. [27], farklı siklodekstrinler kullanarak melatonin-siklodekstrin inklüzyon kompleksleri oluşturmuş ve bu yapıların sudaki kararlılıklarının β -CD> γ -CD> α -CD şeklinde olduğunu gözlemlemişlerdir. Babu ve ark. [129], melatonin/HP β CD inklüzyon komplekslerini çözelti ve katı formda oluşturmuşlar ve oluşan yapıyı faz çözünürlük çalışmaları ile incelemişlerdir. Maeda ve ark. [130] ise melatoninin çeşitli modifiye edilmiş siklodekstrinler (β -siklodekstrin, hidroksipropil- β -siklodekstrin, metil- β -siklodekstrin, sülfobütileter- β -siklodekstrin) ile inklüzyon komplekslerini oluşturmuş ve melatoninin bu inklüzyon komplekslerindeki çözünürlüğünü incelemişlerdir. Tüm bu çalışmalarda melatonin-CD inklüzyon kompleksleri oda koşullarında gerçekleştirilmiştir. Geleneksel yöntemlerle karşılaştırıldığında, inklüzyon kompleksi oluşumunda mikrodalga teknolojisinin kullanımının reaksiyon süresinin azalması ve daha yüksek ürün veriminin elde edilmesi gibi çok önemli avantajları bulunmaktadır [131, 132].

3. DENEYSEL ÇALIŞMALAR

Bu bölümde, tez kapsamında gerçekleştirilen deneysel çalışmalara yer verilmiş ve bahsedilen konular aşağıda maddeler halinde özetlenmiştir.

- Öncelikle tezin deneysel kısmında kullanılan kimyasallar, biyolojik maddeler ve bunların temin edildikleri firmalar belirtilmiştir.
- Ardından, boş ve melatonin yüklü poli(laktik-ko-glikolik asit) (PLGA) nano/mikropartiküllerin üretimi ve karakterizasyonu detaylı bir şekilde anlatılmıştır.
- Sonrasında, MG-63 insan osteosarkom hücrelerinin karakterizasyonu için gerçekleştirilen hücre kültür çalışmalarından bahsedilmiştir.
- Bir sonraki bölümde, melatonin ve PLGA nano/mikropartiküllerin farklı konsantrasyonlarının hem MG-63 insan osteosarkom hücreleri hem de preosteoblastik MC3T3-E1 hücrelerinin proliferasyonu üzerindeki etkileri incelenmiş ve PLGA nanopartiküllerin hücre içerisine alım çalışmalarına yer verilmiştir.
- Ardından, boş ve PLGA nano/mikropartikül yüklü kitosan doku iskelelerinin üretimi ve karakterizasyonu özetlenmiş, ayrıca MC3T3-E1 hücreleri ile gerçekleştirilen ön deneme çalışmalarından bahsedilmiştir. Bu kısımda, doku iskelelerinin sterilizasyon ve nötralizasyon yöntemleri ile ekim koşullarının hücrelerin iskele içerisindeki üreme davranışını ne şekilde etkilediği incelenmiştir.
- Bir sonraki kısımda, kitosan iskelelerin hidroksiapatit (HAp) ile modifikasyonuna yer verilmiş ve üretilen kitosan/HAp iskelelere PLGA nano/mikropartiküllerin yüklenmesi ile hazırlanan doku iskelelerinden salınan melatoninin MC3T3-E1 hücrelerinin osteojenik farklılaşması üzerindeki etkisi detaylı bir şekilde anlatılmıştır.
- Ardından, en iyi sonucu veren doku iskelesinin insan mezenkimal kök hücreleri (hMSCler) üzerindeki etkilerini incelemek için yürütülen *in vitro* hücre kültür çalışmalarına yer verilmiştir.
- Bir sonraki bölümde, kitosan/HAp doku iskelelerinin MG-63 hücreleri üzerindeki etkilerini incelemek için melatonin/HP β CD inklüzyon kompleksleri üretilmiş ve kitosan/HAp doku iskelelerine yüklenerek MG-63 hücreleri ile gerçekleştirilen çalışmalar detaylı bir şekilde sunulmuştur.

- Çalışmanın son aşamasında ise, yüzeyi farklı melatonin konsantrasyonları ile modifiye edilmiş ipek filmlerin hMSClerin osteojenik farklılaşması üzerindeki etkisini belirlemek amacıyla gerçekleştirilen analizler hakkında bilgi verilmiştir.

3.1. Deneysel Çalışmalarda Kullanılan Kimyasallar ve Biyolojik Maddeler

Nano/mikropartikül hazırlanmasında kullanılan PLGA kopolimeri (PLA/PGA:50/50; molekül ağırlığı: 40,000-75,000 g/gmol), melatonin, didodesil dimetil amonyum bromür (DMAB) ve polivinil alkol (PVA; molekül ağırlığı: 85,000-124,000 g/gmol; hidroliz derecesi: %87-89) Sigma-Aldrich (Almanya) firmasından satın alınmıştır. Polimeri çözmek için kullanılan etil asetat ve diklorometan, sırasıyla, Riedel-de Haen (Almanya) ve Sigma-Aldrich (Almanya) firmalarından temin edilmiştir. Fosfat tampon çözeltisi (PBS, pH 7.4) hazırlamak için kullanılan tabletler ve sodyum azit Sigma-Aldrich (Almanya) firmasından satın alınmıştır. Hücre içerisine alım çalışmalarında kullanılan floresan izotiyosiyanat (FITC) ve dimetil sülfoksit, sırasıyla Fluka (Almanya) ve Sigma (Almanya) firmalarından temin edilmiştir.

Doku iskelesi üretiminde kullanılan farklı deasetilasyon derecelerine sahip (%75-85 ve >%85) orta molekül ağırlıklı kitosanlar Sigma-Aldrich (Almanya), kitosanı çözmek için kullanılan asetik asit ise Riedel de Haen (ABD) firmasından temin edilmiştir. Doku iskelelerinin nötralizasyonu için kullanılan etanol ve sodyum karbonat, enkapsülasyon veriminin belirlenmesinde kullanılan asetonitril ve ipek çözeltisinin hazırlanmasında kullanılan lityum bromür (LiBr) Sigma (Almanya) firmasından temin edilmiştir. Toz formdaki HAp partikülleri ($9.59 \pm 0.12 \mu\text{m}$) Sigma (Almanya), boncuk formdaki HAp partikülleri (55-110 μm) ise Science Application Industries (Fransa) firmasından satın alınmıştır.

Hücre kültür çalışmalarında kullanılan MG-63 insan osteosarkom hücre hattı Balıkesir Üniversitesi Biyoloji Bölümü'nde Prof. Dr. Feray Köçkar'ın sorumluluğundaki Moleküler Biyoloji ve Genetik Laboratuvarı'ndan temin edilmiştir. Dulbecco's fosfat tampon çözeltisi (DPBS, pH 7.4), Dulbecco's Modified Eagle's Medium (DMEM) hücre kültür ortamı, fetal sıgır serumu (FBS) ve tripsin/EDTA çözeltisi Hyclone (ABD) firmasından; penisilin-streptomisin ise Sigma-Aldrich (Almanya) firmasından satın alınmıştır. Farklılaşma ortamına eklenen β -gliserol fosfat tuzu, L-askorbik asit ve dekzametazon Sigma (Almanya); amfoterisin-B ve gentamisin ise Life Technologies (ABD) firmasından temin edilmiştir. Hücre proliferasyonunun incelenmesinde kullanılan MTT (3-[4,5-dimetiltiyazol-2-il]-difeniltetrazolyum bromür) ve izopropanol Sigma-Aldrich (Almanya); hidroklorik asit

(%37, v/v) ise Merck (Almanya) firmasından temin edilmiştir. Hücre fiksasyonunda kullanılan gluteraldehit, SEM analizinde kullanılan hekzametildisilazan (HMDS) ve Von Kossa boyamasında kullanılan gümüş nitrat Sigma-Aldrich (Almanya) firmasından satın alınmıştır. Hücre morfolojilerini incelemek amacıyla kullanılan TritonX-100, sığır serum albümin (BSA), propidyum iyodür ve kristal viyole Sigma (Almanya) firmasından; 4'-6-diamidino-2-fenilindol (DAPI) ve Alexa Fluor 488 Phalloidin konjuge F-aktin antikoru Invitrogen (ABD) firmasından alınmıştır. Alamar Mavisi çözeltisi ise Life Technologies (ABD) firmasından temin edilmiştir.

3.2. PLGA Nano/Mikropartiküllerin Üretimi ve Karakterizasyonu

3.2.1. Boş ve melatonin yüklü PLGA nanopartiküllerin üretimi

Boş PLGA nanopartiküller tekli emülsiyon oluşturma/çözücü buharlaştırma yöntemi ile üretilmiştir. Bu yöntemde, öncelikle PLGA polimerinin etil asetat içerisinde çözünmesiyle oluşturulan %2'lik (w/v) organik faz, %1'lik (w/v) DMAB içeren sulu faza eklenmiştir. Ardından, hazırlanan karışım yüksek hızlı homojenizatör (Heidolph, Almanya) kullanılarak 15,000 rpm'de 5 veya 7 dk boyunca karıştırılmıştır. Sonrasında, oluşan emülsiyona 40°C'deki distile su eklenerek organik fazın gece boyunca manyetik karıştırıcıda sabit karıştırma hızında (700 rpm) buharlaşması beklenmiştir. Ardından, nanopartikül süspansiyonu içerisindeki safsızlıkların giderilmesi amacıyla 3 kez yüksek hızda (13,000 rpm) santrifüjlenerek yıkama işlemi gerçekleştirilmiştir. Son olarak, üretilen nanopartiküller liyofilizatörde (Christ, Almanya) -80°C'de 1 gece boyunca kurutulmuşlardır.

PLGA nanopartiküllere melatonin yüklenmesi için melatoninin PLGA'ya göre oranı %10 (w/w) ve %20 (w/w) olan karışım etil asetat içerisinde çözünmüştür. Partikül oluşumu sırasında melatoninin sulu faza difüzyonunu önlemek amacıyla, sulu faza %0.1 (w/v) ve %0.2 (w/v) oranında melatonin eklenmiştir. Karşılaştırma yapabilmek amacıyla sulu faza hiç melatonin eklenmeden de üretim gerçekleştirilmiştir. Melatoninin ışığa hassasiyetinden dolayı tüm işlemler karanlıkta gerçekleştirilmiştir. Üretimin geri kalan aşamalarında boş PLGA nanopartiküllerin üretim basamakları uygulanarak melatonin yüklü PLGA nanopartiküller hazırlanmıştır.

3.2.2. Boş ve melatonin yüklü PLGA mikropartiküllerin üretimi

Boş PLGA mikropartiküller, farklı organik çözücü ve stabilizör kullanılarak nanopartiküllerin üretiminde bahsedilen tekli emülsiyon oluşturma/çözücü buharlaştırma yöntemi ile üretilmiştir. Öncelikle, PLGA kopolimeri diklorometan (DCM) içerisinde çözünerek %2'lik (w/v) organik faz oluşturulmuştur. Sulu fazın hazırlanması için stabilizör

olarak kullanılan polivinil alkol (PVA) 2 saat boyunca 80°C'deki manyetik karıştırıcıda karıştırılmış, ardından oda sıcaklığında 1 saat daha karıştırmaya devam edilerek PVA'nın su içerisinde iyice çözünmesi sağlanmıştır. Organik faz, hazırlanan PVA çözeltisine yavaş yavaş eklenmiş ve hazırlanan karışım yüksek hızlı homojenizatörde 15,000 rpm'de iyice homojenize edilmiştir. Sonrasında karışıma 40°C'deki sıcak su eklenerek DCM'in 1 gece boyunca sabit karıştırma hızında (700 rpm) buharlaşması beklenmiştir. Mikropartikül süspansiyonu, 3 kez yüksek hızda (13,000 rpm) santrifüjlenerek yıkanmıştır. Son olarak, üretilen mikropartiküller liyofilizatörde (Christ, Almanya) -80°C'de 1 gece boyunca kurutulmuşlardır.

Melatonin yüklü PLGA mikropartiküllerin üretimi için ise yukarıda anlatıldığı şekilde hazırlanan organik faz içerisine PLGA'ya oranı %10 (w/w) ve %20 (w/w) olacak şekilde melatonin eklenmiştir. Sulu faza ise, mikropartikül oluşumu sırasında melatoninin suya difüzyonunu önlemek amacıyla %0.2 (w/v) oranında melatonin eklenmiş ve çözelti 1 saat boyunca karıştırılmıştır. Üretimin ileriki aşamalarında boş PLGA mikropartikül üretimindeki işlemler uygulanarak melatonin yüklü PLGA mikropartiküller hazırlanmıştır.

3.2.3. Taramalı elektron mikroskop (SEM) ile analiz

Su içerisine eklenen PLGA nano/mikropartiküller, yüksek hızlı homojenizatörde 6,000 rpm'de iyice karıştırıldıktan sonra yüzeye damlatılıp kurutulmuş ve vakum altında altın-paladyum ile kaplanarak SEM (Zeiss Evo 50, Almanya) ile incelemiştir.

3.2.4. Partikül boyut dağılımının belirlenmesi

Su içerisinde dağıtılan nanopartiküllerin boyut ve boyut dağılımlarının belirlenebilmesi için, nanopartiküllerin bulunduğu sulu çözelti 1:10 oranında seyreltilmiş ve iyice homojenize edilerek Zetasizer (Nano series, İngiltere) ile ölçümler gerçekleştirilmiştir.

3.2.5. Fourier dönüşümlü toplam yansıması azaltılmış kızılötesi spektroskopisi (ATR-FTIR) analizi

PLGA nano/mikropartiküllerin kimyasal yapılarının belirlenebilmesi için PLGA polimerinin, melatoninin, stabilizörlerin, melatonin içeren ve içermeyen (boş) PLGA nano/mikropartiküllerin 400-4000 cm⁻¹ dalga boyu aralığında ATR-FTIR (Thermo Fisher Scientific, Nicolet iS10, Waltham, MA, ABD) ile spektrumları alınmıştır.

3.2.6. Enkapsülasyon veriminin belirlenmesi

Üretilen PLGA nano/mikropartiküllerin enkapsülasyon veriminin belirlenmesi amacıyla 6 mg melatonin yüklü PLGA nano/mikropartikül, 1.5 mL asetonitril içerisinde çözölmüştür.

Partiküllerin içerisine hapsedilen melatonin miktarı 279 nm’de NanoDrop 1000 spektrofotometre (Thermo Scientific, ABD) ile tayin edilmiştir.

3.2.7. *In vitro* salım çalışmaları ve salım kinetiğinin incelenmesi

PLGA nano/mikropartiküllerden melatonin salımının incelenmesi amacıyla, 6 mg partikül Eppendorf tüplere konduktan sonra üzerlerine %0.1 (w/v) sodyum azit içeren 1.5 mL PBS (pH 7.4) eklenmiş ve 37°C’de 70 rpm hızındaki çalkalamalı inkübatörde salım çalışmaları gerçekleştirilmiştir. Belirli zaman aralıklarında 2 µL örnek alınarak 279 nm’de NanoDrop 1000 spektrofotometre (Thermo Scientific, ABD) ile analiz edilmiş ve alınan miktar kadar taze PBS salım ortamına eklenmiştir. PBS içerisinde hazırlanan farklı melatonin çözeltilerinin absorbanslarının spektrofotometrik olarak belirlenmesiyle oluşturulan kalibrasyon grafiği Ek 1’de verilmiştir.

In vitro salım çalışmalarından elde edilen veriler, sıfırıncı derece, birinci derece, Higuchi, Hixson-Crowell ve Korsmeyer Peppas olmak üzere çeşitli salım kinetik modellerine uyarlanmıştır. Elde edilen grafiklerin lineer regresyon katsayıları (R^2) incelenerek salım davranışının uyduğu kinetik model belirlenmiştir.

3.3. MG-63 Hücrelerinin Karakterizasyonu

Melatoninin osteosarkom üzerindeki etkilerini incelemek amacıyla kullanılan MG-63 insan osteosarkom hücre hattının karakterizasyon çalışmaları için 8. pasajdaki hücreler kullanılmıştır. Hücreler, %10 (v/v) FBS ve %1 (v/v) penisilin-streptomisin içeren DMEM kültür ortamı kullanılarak, hücre kültür kaplarında 37°C sıcaklığa, %95 neme ve %5 CO₂’ye sahip inkübatörde (Heraus Instruments, Almanya) çoğaltılmıştır. Tek tabaka halinde elde edilen hücreler %0.25’lik (v/v) tripsin ile yüzeyden kaldırılmış ve santrifüjlenip hücre ekimi için tekrar süspansiyon edilmiştir. MTT analizi ve hücre sayımı için 24 gözlü kültür kaplarının her bir gözüne 1 mL ile 1×10^4 hücre/mL konsantrasyonunda hücre ekilmiş ve hücreler 18 gün boyunca kültüre edilmiştir.

3.3.1. MTT analizi

MTT analizi için kültürün belirli zamanlarında kültür kabının gözlerindeki ortam uzaklaştırılmış, ardından her bir göze 600 µL serumsuz kültür ortamı ve 60 µL MTT (2.5 mg/mL, PBS içerisinde) eklenmiştir. Örnekler, 37°C’deki inkübatörde 3 saat bekletildikten sonra, gözlerdeki MTT içeren ortam uzaklaştırılmış ve her bir göze 400 µL izopropanol çözeltisi (0.04 M HCl içeren) eklenerek oluşan mor renkli formazan kristallerinin çözünmesi sağlanmıştır. Elde edilen çözeltiden 200 µL alınarak 96 gözlü kültür kaplarına aktarılmış ve çözeltinin absorbansı 570 nm’de (690 nm referans) UV spektrofotometrede (Labomed

Double Beam UV-visible spektrofotometre, ABD) ölçülmüştür. Son olarak gözlerdeki izopropanolü uzaklaştırmak için 1 mL DPBS (pH 7.4) ile yıkama gerçekleştirilmiştir.

3.3.2. Hücre sayımı

Hücre sayımı için kültürün belirli zamanlarında gözlerdeki kültür ortamı uzaklaştırılmış ve hücreler tripsinize edilmiştir. Hücreler tamamen kültür kabının yüzeyinden kalktıktan sonra, elde edilen hücre süspansiyonu tripan mavisi ile boyanmış ve Neubauer lamı kullanılarak canlı hücrelerin hemositometrik sayımı yapılmıştır.

3.3.3. Floresan mikroskobu ile analiz

Petri kaplarında (3.5 cm çaplı) üreyen hücrelerin iskelet organizasyonları, kültürün 1., 5., 9. ve 16. günlerinde incelenmiştir. Boyamalar için öncelikle hücrelerin üzerindeki kültür ortam uzaklaştırılmış ve hücreler 3 kez PBS (pH 7.4) ile yıkandıktan sonra %4'lük (v/v) formaldehit çözeltisi ile 20 dk boyunca oda sıcaklığında muamele edilmiştir. Bu şekilde gerçekleştirilen fiksasyon işleminden sonra hücreler tekrar 3 kez PBS (pH 7.4) ile yıkanmış ve %0.1 (v/v) Triton X-100 (PBS içerisinde) ile 10 dk boyunca etkileştirilerek hücre membranının geçirgenliği artırılmıştır. Hücrelerin filamentöz aktinleri (F-aktin), %1 (w/v) sığır serum albümin (BSA) içeren PBS (PBS/A) çözeltisi içerisinde hazırlanmış %1'lik (v/v) Alexa Fluor 488 phalloidin ile, hücre çekirdeği ise %0.1'lik (v/v) DAPI çözeltisi ile 30 dk boyunca karanlıkta inkübe edilerek boyanmıştır. Örnekler floresan mikroskobu (Olympus IX71, A.B.D) kullanılarak görüntülenmiştir.

3.3.4. Kristal viyole ile boyama

Hücrelerin çekirdek ve sitoplazmasına dair bilgiler elde etmek amacıyla 6 gözlü polistiren kültür kaplarında gerçekleştirilen kültürün 1., 5., 9. ve 16. günlerinde, hücreler kristal viyole ile boyanmıştır. Bu amaçla öncelikle kültür kabında bulunan kültür ortamı uzaklaştırılmış ve PBS (pH 7.4) ile yıkama işlemi gerçekleştirilmiştir. Daha sonra 1:1 (v/v) oranında aseton/metanol karışımı ile 4°C'de 20 dk fiksasyon işlemi yapılmıştır. Fiksasyon işleminden sonra %20'lik (v/v) metanol çözeltisinin içerisinde hazırlanan %0.5'lik (w/v) kristal viyole çözeltisinden hücrelerin üzerine konulmuş ve 30 dk boyunca inkübasyon gerçekleştirilmiştir. Son olarak boyanan yüzeyler akan suyun altında iyice yıkanmış ve hücreler optik mikroskop (Olympus IX71, A.B.D) altında incelenmiştir.

3.4. Toksisite Çalışmaları

3.4.1. Melatoninin farklı konsantrasyonlarının MG-63 ve MC3T3-E1 hücreleri üzerindeki etkisinin incelenmesi

Melatoninin farklı konsantrasyonlarının insan osteosarkom hücre hattı MG-63 ve preosteoblastik MC3T3-E1 hücreleri üzerinde toksik etki gösterip göstermediğini anlamak amacıyla *in vitro* hücre kültür çalışmaları gerçekleştirilmiştir. Bu amaçla kullanılan 8. pasajdaki hücreler 24 gözlü kültür kaplarına 1 mL kültür ortamı içerisinde 2×10^4 hücre/mL yoğunlukta ekilmiştir. Kültür ortamı olarak, MG-63 hücreleri için %10 (v/v) FBS ve %1 (v/v) penisilin-streptomisin içeren DMEM; MC3T3-E1 hücreleri için ise %10 (v/v) FBS ve %1 (v/v) penisilin-streptomisin içeren α -MEM kullanılmıştır.

Hücre ekiminden 24 sa sonra 100 μ L etanol içerisinde çözülen melatonin kültür ortamı ile seyreltilerek istenilen konsantrasyona (0-8 mM) getirilmiş ve gözlere eklenmiştir. Hücre canlılığı kültürün 1., 2., 3. ve 5. günlerinde MTT analizi ile, hücre morfolojisi ise kültürün 3. gününde optik mikroskop ile incelenmiştir.

3.4.2. PLGA nano/mikropartiküllerinin farklı konsantrasyonlarının MG-63 hücreleri üzerindeki etkisinin incelenmesi

Boş ve melatonin yüklü PLGA nano/mikropartiküllerin farklı konsantrasyonlarının MG-63 hücrelerinin proliferasyonu üzerindeki etkilerini incelemek için 8. pasajdaki hücreler kullanılmıştır. Hücreler, %10 (v/v) FBS ve %1 (v/v) penisilin-streptomisin içeren DMEM kültür ortamı kullanılarak, hücre kültür kaplarında 37°C sıcaklığa, %95 neme ve %5 CO₂'ye sahip inkübatörde (Heraus Instruments, Almanya) çoğaltılmıştır. Tek tabaka halinde elde edilen hücreler %0.25'lik (v/v) tripsin ile yüzeyden kaldırılmış ve santrifüjlenip hücre ekimi için tekrar süspanse edilmiştir.

Hücreler 24 gözlü kültür kaplarına 1 mL hacimde ve 2×10^4 hücre/mL yoğunlukta ekilmiştir. Hücre ekiminden 24 sa sonra ise farklı miktarlarda (0.05, 0.5 ve 5 mg/cm²) boş ve melatonin yüklü PLGA nano/mikropartikül, 30 dk boyunca UV altında sterillenmiş ve kültür ortamı ile karıştırılıp iyice homojenize edilerek gözlere eklenmiştir. Boş PLGA nano/mikropartikül içeren gruplar ile polistiren hücre kültür kaplarında (TCPS) üreyen hücreler kontrol olarak kullanılmıştır. Hücre kültür çalışmaları 3 gün boyunca sürdürülmüştür. Hücre canlılığı MTT analizi ile, hücre morfolojisi ise optik mikroskop ile incelenmiştir.

3.4.2.1. MTT analizi

Kültür süresi boyunca her gün gözlerdeki kültür ortamı uzaklaştırılmış ve kalan partiküllerin uzaklaştırılması için gözler 2 kez kültür ortamı ile yıkanmıştır. MTT analizi için Bölüm 3.3.1’de anlatılan yöntem uygulanmıştır.

3.4.2.2. Optik mikroskop ile analiz

Boş ve melatonin yüklü PLGA nano/mikropartiküller ile etkileşen MG-63 hücrelerinin optik mikroskop görüntüleri alınmıştır. Görüntü almadan önce 24 gözlü kültür kabında bulunan partikül içeren ortam uzaklaştırılmış ve gözler 2 kez DPBS (pH 7.4) ile yıkanmıştır. Ardından hücrelerin üzerine tekrar DPBS eklenerek görüntüleme yapılmıştır.

3.4.3. PLGA nanopartiküllerinin MG-63 ve MC3T3-E1 hücreleri üzerindeki etkisinin incelenmesi

Boş ve melatonin yüklü PLGA nanopartiküllerin 0.05 mg/cm² konsantrasyonunun hem MG-63 hem de MC3T3-E1 hücreleri üzerindeki etkisini incelemek amacıyla hücre kültür çalışmaları gerçekleştirilmiştir. Hücreler 24 gözlü kültür kaplarına 1 mL içerisinde 2x10⁴ hücre/mL yoğunlukta ekildikten 24 sa sonra 0.05 mg/cm² konsantrasyonundaki boş PLGA nanopartiküller 30 dk boyunca UV ile sterililmiş, kültür ortamı ile karıştırılarak iyice homojenize edilmiş ve gözlere eklenmiştir. TCPS’te üreyen hücreler kontrol olarak kullanılmıştır. Hücre canlılığı 3 gün boyunca Bölüm 3.3.1’de anlatıldığı şekilde MTT analizi ile incelenmiştir.

3.5. PLGA Nanopartikülleri ile Yürütülen Hücre İçerisine Alım Çalışmaları

Boş PLGA nanopartiküllerin hücre içerisine alımını incelemek amacıyla öncelikle nanopartiküllerin içerisine floresan bir boya olan floresan izotiyosiyanat (FITC) yüklenmiş ve bu FITC-yüklü PLGA nanopartiküller hem MC3T3-E1 hem de MG-63 hücreleri ile 24 saat boyunca etkileştirilmişlerdir.

3.5.1. FITC yüklü PLGA nanopartiküllerin üretimi

FITC yüklü PLGA nanopartiküllerin üretimi için boş PLGA yüklü nanopartiküllerin üretimindeki yöntem izlenmiştir. Farklı olarak, 5 mg FITC 1 mL dimetilsülfoksit içerisinde çözünmüş ve hazırlanan çözelti organik faza eklenmiştir. Yıkama işlemleri sonrasında partiküller 1 gece boyunca -80°C’de dondurarak-kurutma cihazında karanlıkta kurutulmuştur.

3.5.2. MG-63 ve MC3T3-E1 hücreleri ile yürütülen çalışmalar

Hücre içerisine alım çalışmaları hem MG-63 hem de MC3T3-E1 hücreleri ile gerçekleştirilmiştir. Bu amaçla 8. pasajdaki MG-63 ve MC3T3-E1 hücreleri, %10 (v/v) FBS

ve %1 (v/v) penisilin-streptomisin içeren, sırasıyla DMEM ve α -MEM kültür ortamları kullanılarak, hücre kültür kaplarında 37°C sıcaklığa, %95 neme ve %5 CO₂'ye sahip inkübatörde (Heraus Instruments, Almanya) çoğaltılmıştır. Tek tabaka halinde elde edilen hücreler %0.25'lik (v/v) tripsin ile yüzeyden kaldırılmış ve santrifüjlenip hücre ekimi için tekrar süspanse edilmiştir.

Hücreler 24 gözlü kültür kaplarına 1 mL kültür ortamı içerisinde 2×10^4 hücre/mL yoğunlukta ekilmiştir. Hücre ekiminden 24 sa sonra, 0.05 mg/cm² olacak şekilde FITC işaretli boş PLGA nanopartiküller kültür ortamı içerisinde iyice homojenize edilerek kültür kaplarına eklenmiştir. FITC yüklü PLGA nanopartiküllerin hücre içerisine alımları 24 sa boyunca hem optik hem de floresan mikroskobu (Olympus, ABD) ile incelenmiştir. Kültürün 1., 5. ve 24. saatlerinde hücrelerin üzerindeki partikül içeren ortam uzaklaştırılmış ve gözler 2 kez DPBS ile yıkandıktan sonra hücreler optik mikroskop ile görüntülenmiştir. Floresan mikroskop ile görüntüleme için ise, hücreler DPBS ile yıkama işleminden sonra %4'lük (v/v) formaldehit çözeltisi ile 20 dk boyunca oda sıcaklığında muamele edilmiştir. Bu şekilde gerçekleştirilen fiksasyon işleminden sonra hücreler tekrar 3 kez PBS ile yıkanmıştır. Hücre çekirdeklerinin floresan mikroskobu ile görüntülenmesi için ise, fiksasyon sonrası hücre çekirdeği %1'lik (w/v) BSA içeren PBS çözeltisi (PBS/A) içerisinde hazırlanmış %0.1'lik (v/v) DAPI ile 30 dk boyunca karanlıkta inkübe edilerek boyanmıştır. Ardından, örnekler floresan mikroskobu kullanılarak görüntülenmiştir. Ayrıca, elde edilen görüntülerde 4X büyötmeye sahip olanlar kullanılarak, PLGA nanopartiküllerin hücre içerisine alım yüzdeleri belirlenmiştir.

3.6. Boş ve PLGA Nano/Mikropartikül Yüklü Kitosan Doku İskelelerinin Üretimi, Karakterizasyonu ve *In Vitro* Hücre Kültür Çalışmaları

3.6.1. Boş kitosan doku iskelelerinin üretimi

Boş kitosan doku iskelelerinin üretimi için öncelikle 0.2 M asetik asit içeren distile su kullanılarak %2'lik (w/v) kitosan (%75-85 deasetilasyon derecesi) çözeltisi hazırlanmış ve kitosanın iyice çözünmesi için hazırlanan çözelti 2 gün boyunca manyetik karıştırıcıda karıştırılmıştır. Hazırlanan çözelti içerisindeki safsızlıkların uzaklaştırılması amacıyla çözelti 0.45 μ m'lik filtreden geçirilmiş ve 24 gözlü kültür kaplarına dökülerek -20°C'de dondurulmuştur. Bu aşamadan sonra kitosan doku iskeleleri, liyofilizatör kullanılarak -80°C'de "dondurarak-kurutma" işlemine tabi tutulmuştur.

Üretilen kitosan doku iskelelerinin nötralizasyonu için iki farklı yöntem kullanılmıştır. Birinci yöntemde, iskeleler %96'lık (v/v) etanol çözeltisi içerisinde 1 gece, %70'lik (v/v) etanol çözeltisi içerisinde ise 1 sa boyunca bekletilmiştir. Ardından, doku iskeleleri

liyofilizatörde tekrar kurutulmuştur. İkinci yöntemde ise iskeleler 1 M sodyum karbonat çözeltisinde 2 sa bekletilmiştir. Ardından kalan sodyum tuzlarının uzaklaştırılması için iskeleler, yıkama çözeltisinin pH'ı 7 oluncaya kadar distile su ile yıkanmış ve -20°C'de gerçekleştirilen ön dondurma işleminin ardından liyofilizatörde 1 gece boyunca kurutulmuştur.

3.6.2. Kitosan doku iskelelerine PLGA nano/mikropartiküllerin yüklenmesi

PLGA nano/mikropartikül yüklü kitosan doku iskelelerinin üretimi için öncelikle yukarıda belirtilen oranda kitosan çözeltisi 2 gün boyunca karıştırılmıştır. Elde edilen çözelti, safsızlıklarından arındırılmak üzere filtreden geçirilmiştir. PLGA nano/mikropartiküller iki farklı yöntemle kitosan iskelelerine yüklenmiştir. Birinci yöntemde içerisinde belirlenen miktarda nano/mikropartikül bulunan sulu faz 6,000 rpm'de iyice homojenize edildikten sonra kitosan çözeltisine eklenmiş ve 3 saat boyunca manyetik karıştırıcıda karıştırılmıştır. Diğer işlemler boş kitosan doku iskelelerinin üretimindeki gibi uygulanmıştır. Böylece, PLGA nano/mikropartiküller doku iskelelerine eş zamanlı üretim-yükleme şeklinde yüklenmiştir. İkinci yöntemde ise yine distile su içerisinde 6,000 rpm'de homojenize edilen PLGA nano/mikropartiküller önceden hazırlanan ve nötralize edilen kitosan doku iskelelerine emdirilerek yüklenmiştir. Sonuç olarak, doku iskelesi başına (2 mm yükseklik, 9 mm çap) 1 ve/veya 2 mg PLGA nano/mikropartikül içeren kitosan doku iskeleleri üretilmiştir.

3.6.3. SEM analizi

Boş ve PLGA nano/mikropartikül yüklü kitosan doku iskelelerinden alınan kesitler altın-paladyum ile kaplanmış ve Zeiss (Evo-50, Almanya) taramalı elektron mikroskobu (SEM) ile incelenmiştir.

3.6.4. ATR-FTIR analizi

Boş ve PLGA nano/mikropartikül yüklü kitosan doku iskelelerinin kimyasal yapılarının belirlenebilmesi ve PLGA nano/mikropartiküllerin kitosan doku iskelelerine başarılı bir şekilde yüklendiklerini kanıtlamak amacıyla partikül içeren ve içermeyen (boş) doku iskelelerinin 400-4000 cm⁻¹ dalga boyu aralığında ATR-FTIR spektrofotometresi (Thermo Fisher Scientific, Nicolet iS10, Waltham, MA, ABD) ile spektrumları alınmıştır.

3.6.5. Termogravimetrik analiz

Çalışmada kullanılan kitosan doku iskelelerinin termal davranışı, termogravimetrik analizör (TG/DTA 6300 SII EXSTAR 6000, Seiko Instruments Inc., ABD) ile incelenmiştir. Analiz, 25-600°C sıcaklık aralığında, 10°C/dk ısıtma hızı ile azot ortamında yürütülmüştür.

3.6.6. MC3T3-E1 hücreleri ile yürütülen öncül hücre kültür çalışmaları

Melatonin yüklü PLGA nano/mikropartikülleri içeren kitosan doku iskelelerinin kemik doku mühendisliğindeki kullanım potansiyelini araştırmak amacıyla hücre kültür çalışmaları gerçekleştirilmiştir. Bu amaçla yürütülen *in vitro* hücre kültür çalışmalarında 8. pasajdaki preosteoblastik MC3T3-E1 hücre hattı kullanılmıştır. Yenidoğan fare kafatası çatısından elde edilen ve yüzeye-bağımlı olarak üreyen bu hücreler %10 (v/v) FBS, %1 (v/v) penisilin-streptomisin içeren α -MEM kültür ortamı kullanılarak tek tabakalı kültürde çoğaltılmıştır.

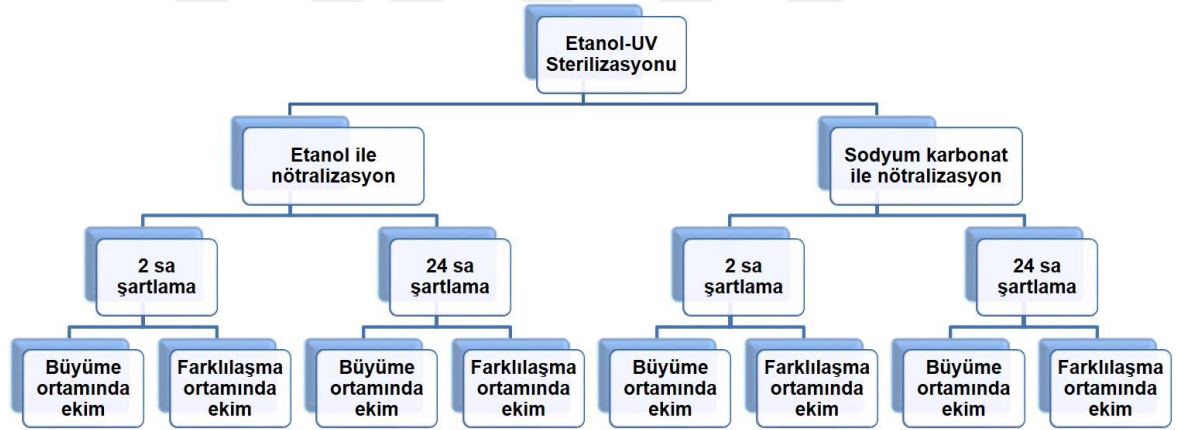
Ön deneme çalışmaları için 4 grup kitosan doku iskelesi kullanılmıştır. Bu doku iskeleleri aşağıda belirtilmiştir:

1. PLGA nano/mikropartikül içermeyen kitosan doku iskelesi: Boş kitosan
2. Melatonin yüklü PLGA nanopartiküllerin yapıya emdirme yöntemiyle katılmasıyla hazırlanan doku iskelesi: Kitosan-Np
3. Melatonin yüklü PLGA mikropartiküllerin yapıya emdirme yöntemiyle katılmasıyla hazırlanan doku iskelesi: Kitosan-Mp
4. Melatonin yüklü PLGA mikropartiküllerin yapıya üretim sırasında katılmasıyla hazırlanan doku iskelesi: Kitosan+Mp

Hazırlanan doku iskelelerinin sterilizasyonu öncelikle etilen oksit gazı ile gerçekleştirilmiştir (Point Medikal, Ostim, Ankara). Sterilizasyonun ardından, iskeleler steril PBS ile 3 defa yıkanmış ve ardından %10 (v/v) FBS, %1 (v/v) penisilin-streptomisin içeren α -MEM ortamı içerisine alınmıştır. Doku iskelelerinin serum proteinleri ile etkileşimleri için 2 sa beklenmiştir. Hücreler, 30 μ L kültür ortamı içerisinde, 1×10^5 hücre/mL olacak şekilde doku iskelelerine ekilmiştir. Kültüre edilen hücreler, %95 nem ve %5 CO₂ içeren inkübatörde (Heraus Instruments, Almanya) inkübe edilmiştir. Hücre ekiminden 3 sa sonra doku iskelelerinin üzerine 10 mM β -gliserol fosfat ve 50 μ g/mL askorbik asit içeren 1 mL osteojenik farklılaşma ortamı konulmuştur. Kültür süresi boyunca hücrelerin içerisinde bulunduğu ortam 2-3 günde bir yarı yarıya değiştirilerek tazelenmiştir. Steril ortam gerektiren tüm işlemler laminar akış kabininde (Bioair, Type II Laminer Akış Kabini, İtalya) gerçekleştirilmiştir.

Hazırlanan tüm bu iskelelerde kültüre edilen MC3T3-E1 hücrelerinin canlılığı Bölüm 3.3.1’de açıklanan MTT analizi ile incelenmiştir.

Etilen oksit gazı ile sterillenen kitosan doku iskeleleriyle gerçekleştirilen hücre kültür çalışmalarında istenilen sonuçlar elde edilememiş ve bunun nedeninin sterilizasyon sonrasında iskelelerdeki etilen oksit kalıntılarından kaynaklı olabileceği düşünülmüştür. Bu nedenle, sadece boş kitosan doku iskeleleri kullanılarak hücre kültür çalışmaları gerçekleştirilmiştir. İskeleler %70'lik etanolde 30 dk bekletildikten sonra steril PBS ile 3 kez yıkanmış ve ardından da her iki yüzü 30'ar dk boyunca UV'ye maruz bırakılmıştır. Bu çalışmada hem doku iskelelerinin hücre ekimi öncesi serumlu kültür ortamı içerisinde şartlanma süresi (2 sa ve 24 sa), hücrelerin ekim ortamı (büyüme ortamı ve farklılaşma ortamı) ve kitosanın nötralizasyon yöntemi (etanol ve sodyum karbonat ile nötralizasyon) gibi parametrelerin hücre çoğalması üzerindeki etkileri incelenmiştir. Gerçekleştirilen deneysel işlemler Şekil 3.1'de özetlenmiştir. Hücreler, 30 µL kültür ortamı içerisinde, 2×10^5 hücre/mL olacak şekilde doku iskelelerine ekilmiştir. Kültüre edilen hücreler, %95 nem ve %5 CO₂ içeren inkübatörde (Heraus Instruments, Almanya) inkübe edilmiştir.



Şekil 3.1. MC3T3-E1 hücreleri ile gerçekleştirilen öncül hücre kültür çalışmalarının şematik gösterimi.

3.7. Farklı Deasetilasyon Derecesine Sahip Kitosan Doku İskelelerinin Üretimi ve Kitosan Doku İskelelerinin Hidroksiapatit (HAp) ile Modifikasyonu

Çalışmanın bu aşamasında, kitosanın deasetilasyon derecesinin hücre yapışması ve çoğalmasına etkisinin incelenmesi amacıyla önceden üretilen ve karakterize edilen %75-85 deasetilasyon derecesine sahip kitosanın yanı sıra, >%85 deasetilasyon derecesine sahip kitosan kullanılarak da dondurarak-kurutma yöntemiyle kitosan doku iskeleleri üretilmiştir. Üretim sonrası iskelelerin nötralizasyonu sodyum karbonat ile gerçekleştirilmiştir.

Kitosan iskelelerin HAp ile modifikasyonu için ise 0.2 M asetik asit içeren distile su kullanılarak %2'lik (w/v) kitosan (DD: %75-85) çözeltisi hazırlanmış ve kitosanın iyice çözünmesi için hazırlanan çözelti 2 gün boyunca manyetik karıştırıcıda karıştırılmıştır. Elde

edilen çözelti, safsızlıklarından arındırılmak üzere filtreden geçirilmiştir. Ardından %1.5 (w/v) toz veya boncuk formdaki HAp partiküller kitosan çözeltisi içerisine eklenmiş ve 3 saat boyunca manyetik karıştırıcıda karıştırılmıştır. Bu aşamadan sonra kitosan doku iskeleleri, liyofilizatör kullanılarak -80°C’de “dondurarak-kurutma” işlemine tabi tutulmuştur. Elde edilen kitosan doku iskelelerinin nötralizasyonu için iskeleler 1 M sodyum karbonat çözeltisinde 2 saat bekletilmiştir. Ardından yıkama çözeltisinin pH’ı 7 oluncaya kadar distile su ile yıkanmış ve liyofilizatörde tekrar kurutulmuştur. Toz ve boncuk formundaki HAp eklenerek üretilen kitosan doku iskeleleri sırasıyla kitosan/toz HAp ve kitosan/boncuk HAp şeklinde ifade edilmiştir.

3.7.1. SEM analizi

Kitosanın deasetilasyon derecesinin iskele üretimi sonrasında gözenek yapısını ne şekilde etkilediğinin ve HAp partiküllerin kitosan yapısına başarılı bir şekilde katıldığına belirlenmesi amacıyla doku iskelelerinden alınan kesitler altın-paladyum ile kaplanmış ve Zeiss (Evo-50, Almanya) taramalı elektron mikroskobu (SEM) ile incelemiştir.

3.7.2. ATR-FTIR analizi

HAp’in kitosan iskelelerin yapısına başarılı bir şekilde katılıp katılmadığının belirlenmesi amacıyla boncuk formdaki HAp içeren ve içermeyen kitosan doku iskelelerinin ve boncuk formdaki saf HAp’in 400-4000 cm⁻¹ dalga boyu aralığında ATR-FTIR spektrofotometresi (Thermo Fisher Scientific, Nicolet iS10, Waltham, MA, ABD) ile spektrumları alınmıştır.

3.7.3. Mikro-bilgisayarlı tomografi (μ-CT) analizi

Kitosan/boncuk HAp doku iskelelerindeki HAp dağılımının belirlenebilmesi için iskelelerin μ-CT cihazı (Bruker, Skyscan 1272) ile görüntüleri alınmıştır. Bu analiz 60 kV ve 170 μA’de 1 ms’lik pozlama ile 4X büyütmede gerçekleştirilmiştir.

3.8. Kitosan/HAp Doku İskelelerine PLGA Nano/Mikropartiküllerin Yüklenmesi

Kitosan/HAp doku iskelelerine PLGA nano/mikropartiküller Bölüm 3.6.2’de anlatıldığı şekilde hem üretim sırasında hem de üretim sonrasında iskelelere emdirilerek yüklenmiştir. PLGA nanopartiküllerin ve mikropartiküllerin yapıya üretim aşamasında katılmasıyla hazırlanan iskeleler, sırasıyla, kitosan/HAp+Np ve kitosan/HAp+Mp; üretim sonrasında emdirilerek yüklenmesi ile hazırlanan iskeleler ise, sırasıyla, kitosan/HAp-Np ve kitosan/HAp-Mp şeklinde ifade edilmiştir. PLGA nano/mikropartiküller iskele başına 0.5 mg ve 1.0 mg olacak şekilde yüklenmişlerdir.

3.8.1. SEM analizi

Partiküllerin kitosan/HAp iskeleler içerisindeki dağılımını ve iskele gözenekliliğini ne şekilde etkilediğini belirlemek amacıyla Bölüm 3.7.1’de anlatıldığı şekilde SEM analizi gerçekleştirilmiştir.

3.8.2. *İn vitro* salım çalışmaları ve salım kinetiğinin incelenmesi

Melatonin içeren PLGA nano/mikropartikül yüklü kitosan/HAp doku iskelelerinden *in vitro* salım çalışmaları için iskele başına 0.5 mg partikül içeren 2x9 mm boyutlarındaki kitosan/HAp doku iskeleleri kullanılmıştır. Doku iskelelerinden melatonin salım çalışmaları %0.1 (w/v) sodyum azit içeren 1.5 mL PBS ortamında, 37°C’de ve 70 rpm hızındaki çalkalamalı etüvde yürütülmüştür. Belirli zaman aralıklarında 2 µL örnek alınarak 279 nm’de NanoDrop ile analiz edilmiş ve alınan miktar kadar taze PBS salım ortamına eklenmiştir.

In vitro salım çalışmaları sonucunda elde edilen veriler, sıfırıncı derece, birinci derece, Higuchi, Hixson-Crowell ve Korsmeyer-Peppas olmak üzere çeşitlik salım kinetik modellerine uyarlanmıştır. Elde edilen grafiklerin lineer regresyon katsayıları (R^2) incelenerek salım davranışının uyduğu kinetik model belirlenmiştir.

3.8.3. Hücre kültür çalışmaları

Hücre kültür çalışmalarında 5 farklı doku iskelesi kullanılmıştır. Bu iskeleler aşağıda belirtilmiştir:

1. PLGA nano/mikropartikül içermeyen doku iskelesi: Kitosan/HAp
2. Melatonin yüklü PLGA mikropartiküllerin yapıya üretim sırasında katılması ile hazırlanan doku iskelesi: Kitosan/HAp+Mp
3. Melatonin yüklü PLGA mikropartiküllerin yapıya emdirme yöntemiyle katılmasıyla hazırlanan doku iskelesi: Kitosan/HAp-Mp
4. Melatonin yüklü PLGA nanopartiküllerin yapıya üretim sırasında katılması ile hazırlanan doku iskelesi: Kitosan/HAp+Np
5. Melatonin yüklü PLGA nanopartiküllerin yapıya emdirme yöntemiyle katılmasıyla hazırlanan doku iskelesi: Kitosan/HAp-Np

Hazırlanan iskelelerin preosteoblastik MC3T3-E1 hücrelerinin osteojenik farklılaşması üzerindeki etkinliğini incelemek amacıyla 28 gün süren *in vitro* hücre kültür çalışmaları gerçekleştirilmiştir. Tüm iskeleler hücre ekimi öncesinde vakum etüvünde çöktürüldükten sonra %70’lik (v/v) etanolde 30 dk bekletilmiştir. Ardından, steril PBS ile 3 kez yıkanan

iskelelerin her iki yüzü de 30'ar dk boyunca UV'ye maruz bırakılarak sterilizasyon işlemi gerçekleştirilmiştir. Sterilizasyonun ardından, doku iskeleleri %10 (v/v) FBS, %1 (v/v) penisilin-streptomisin içeren α -MEM ortamı içerisine alınmış ve iskelelerin serum proteinleri ile etkileşimleri için 2 saat beklenmiştir. Hücreler, 30 μ L kültür ortamı içerisinde, 4×10^5 hücre/mL olacak şekilde doku iskelelerine ekilmiştir. Hücre ekiminden 3 saat sonra doku iskelelerinin üzerine 1 mL büyüme ortamı eklenmiş ve hücreler %95 nem ve %5 CO₂ içeren inkübatörde (Heraus Instruments, Almanya) inkübe edilmiştir. Kültürün 5. gününde, iskelelerin üzerindeki büyüme ortamı uzaklaştırılarak, yerine 1 mL osteojenik farklılaşma ortamı (10 mM β -gliserol fosfat ve 50 μ g/mL askorbik asit içeren α -MEM) konulmuştur. Kültür süresi boyunca hücrelerin içerisinde bulunduğu ortam 2-3 günde bir yarı yarıya değiştirilerek tazelenmiştir. Steril ortam gerektiren tüm işlemler laminar akış kabini (Bioair, Type II Laminar Akış Kabini, İtalya) gerçekleştirilmiştir.

3.8.3.1. MTT analizi

Hücrelerin doku iskeleleri içerisindeki mitokondriyal aktiviteleri kültürün farklı günlerinde incelenmiştir. Doku iskelelerinin üzerindeki kültür ortamı uzaklaştırıldıktan sonra iskeleler başka bir 24 gözlü kültür kabına aktarılmıştır. Sonrasındaki işlemler Bölüm 3.3.1'de anlatıldığı şekilde gerçekleştirilmiştir.

3.8.3.2. SEM analizi

Hücrelerin kitosan/HAP iskelelerindeki morfolojileri ile hücre-doku iskelesi ve hücre-hücre etkileşimlerini incelemek amacıyla kültürün 7., 14. ve 21. günlerinde SEM analizi gerçekleştirilmiştir. Bunun için öncelikle gözlerdeki kültür ortamı uzaklaştırılmış ve iskeleler 2 kes DPBS ile yıkanmıştır. Ardından, %2.5'luk (v/v) glutaraldehit çözeltisi ile 30 dk boyunca karanlıkta fiksasyon işlemi gerçekleştirilmiştir. Sonrasında, örnekler PBS ile 3 kez yıkanmış ve analize kadar PBS içerisinde 4°C'de saklanmıştır. SEM analizi öncesinde örnekler etanol serilerinden (%10, %30, %50, %70, %90 ve %100) geçirilerek iskeleler dehidrasyona maruz bırakılmıştır. Son olarak örnekler hekzametildisilazanda (HMDS) 5 dk bekletilmiş ve 1 gece boyunca havada kurutulmuştur. Görüntüleme öncesinde örnekler altın-palladyum ile kaplanmıştır.

3.8.3.3. Konfokal lazer taramalı mikroskop (CLSM) ile analiz

Doku iskelelerindeki hücre iskeleti organizasyonu, kültürün 21. gününde incelenmiştir. Doku iskelelerinin üzerindeki kültür ortamı uzaklaştırıldıktan sonra, iskeleler 3 kez PBS (pH 7.4) ile yıkanmış ve daha sonra PBS içerisinde hazırlanmış %2.5'luk (v/v) glutaraldehit çözeltisi içerisinde 4°C'de 10 dk boyunca karanlıkta inkübe edilmiştir. Fiksasyon işleminden

sonra, %0.1 (v/v) Triton X-100 (PBS içerisinde) ile 5 dk boyunca muamele edilerek hücre membranının geçirgenliği arttırılmıştır. Hücrelerin iskeletsel filamentöz aktinleri (F-aktin), %1'lik (w/v) PBS/A çözeltisi içerisinde hazırlanmış %2.5'luk (v/v) Alexa Fluor 488 phalloidin ile 20 dk, hücre çekirdeği ise 10 µg/mL propidyum iyodür ile 5 dk inkübe edilerek boyanmıştır. Örnekler Orta Doğu Teknik Üniversitesi Merkezi Laboratuvarı'nda bulunan konfokal lazer taramalı mikroskobu (CLSM, Zeiss LSM 510, Almanya) kullanılarak incelenmiştir.

3.8.3.4. ALP aktivitesinin tayini

MC3T3-E1 hücrelerinin erken dönem osteojenik farklılaşması, analiz kiti (Biovision, ABD) kullanılarak alkalen fosfataz (ALP) aktivitesinin tayini ile belirlenmiştir. Analizde, ALP enziminin p-nitrofenil fosfatı (pNPP), p-nitrofenol (pNP) bileşiğine dönüştürmesinden yararlanılmıştır. Hücre kültür çalışmasının 7., 14. ve 21. günlerinde, kitosan/HAp doku iskelelerinin üzerindeki kültür ortamı uzaklaştırılmış ve iskeleler DPBS (pH 7.4) ile 2 kez yıkanarak analiz yapılınca kadar -80°C'de muhafaza edilmiştir. Analizden önce, -80°C'den çıkarılan iskeleler liyofilizatörde kurutulduktan sonra küçük parçalara ayrılmış ve Eppendorf tüplerine aktarılmıştır. Örnekler 300 µL %0.1'lik (v/v) Triton X-100 çözeltisi (PBS içerisinde) ile, 4°C'de 30 dk inkübe edildikten sonra 4°C'de, 12,000 rpm hızda 10 dk boyunca santrifüjlenmiştir. Santrifüj sonrası elde edilen süpernatandan 80 µL alınarak 96 gözlü kültür kabına aktarılmış ve üzerine 50'şer µL pNPP çözeltisi (5 mM) eklenerek 25°C'de 1 saat boyunca karanlıkta inkübasyon gerçekleştirilmiştir. İnkübasyonun ardından, gerçekleşen tepkimenin sonlandırılması için, her bir göze 20 µL stop çözeltisi eklenmiştir. Tepkime sonucu oluşan pNP'nin absorbanısı, UV mikroparka okuyucuda (ASYS, Hitech UVM 340 plate reader, Avusturya) 405 nm dalga boyunda ölçülmüştür.

3.8.3.5. Kollajen analizi

Kollajenin yapısında bulunan hidroksiprolin amino asidinin miktarsal tayinine dayanan kollajen analizi, kültürün 7., 14. ve 21. günlerinde hidroksiprolin kolorimetrik analiz kiti (Biovision, ABD) kullanılarak gerçekleştirilmiştir. Kollajen analizi için, doku iskelelerinin üzerindeki kültür ortamı uzaklaştırılmış ve iskeleler 2 kes DPBS ile yıkanmıştır. Analize kadar -80°C'de saklanan örneklerin üzerine ekstraksiyonu için 100 µL ultra saf su eklenmiş ve 4°C'de 30 dk boyunca sonikatörde (Bandelin Sonorex Super 10P, ABD) homojenize edilmiştir. Ardından, her bir örneğe 100 µL 12 N HCl eklenmiş ve 3 saat boyunca 120°C'de inkübasyon gerçekleştirilmiştir. Sonrasında, örnekler iyice vortekslelendikten sonra, 10,000 rpm'de 3 dk boyunca santrifüjlenmiştir. Süpernatandan 50'şer µL alınarak 96 gözlü kültür

kabına aktarılmış ve 1 gece boyunca 60°C’de kurutulmuştur. Kuruyan örneklerin üzerine 100 µL kloramin T ajanı eklenerek 5 dk oda sıcaklığında inkübe edilmiştir. Sonrasında, her bir göze 100 µL DMAB çözeltisi eklenerek 90 dk boyunca 60°C’de ikinci bir inkübasyon gerçekleştirilmiştir. Reaksiyon sonucunda oluşan hidroksiprolinin absorbansı 560 nm dalga boyunda mikropilaka okuyucu ile ölçülmüştür. Kit içerisinde bulunan farklı konsantrasyonlardaki hidroksiprolin standartlarının absorbansları ölçülerek kalibrasyon grafiği hazırlanmış (Ek 2) ve bu grafikten yararlanılarak bilinmeyen örneklerdeki hidroksiprolin miktarları hesaplanmıştır.

3.8.3.6. Matris mineralizasyonunun incelenmesi

Doku iskelelerinin içerisindeki hücrelerin hücre dışı matrislerinde biriken kalsiyumun belirlenmesi amacıyla Von Kossa boyaması gerçekleştirilmiştir. Kültürün 28. gününde kitosan/HAP doku iskeleleri DPBS ile 2 kez yıkanmış ve ardından soğuk absolut etanol ile oda sıcaklığında 20 dk boyunca inkübasyon gerçekleştirilmiştir. Doku iskeleleri deiyonize su ile yıkandıktan sonra %5’lik (w/v) AgNO₃ ile karanlıkta inkübe edilmiştir. İnkübasyonun ardından örnekler deiyonize su ile yıkanmış ve 2 dk boyunca UV’ye maruz bırakılmıştır. Hücre içermeyen doku iskeleleri kontrol olarak kullanılmıştır.

3.8.3.7. Gerçek zamanlı polimeraz zincir reaksiyonu (RT-PCR) ile gen ifadesi analizi
Osteojenik farklılaşmanın takibi için, hücrelerin tip-1 kollajen (*Col-1*), osteokalsin (*Ocn*), osteopontin (*Opn*) ve runt-bağlantılı transkripsiyon faktörü-2 (*Runx2*) gen ekspresyon seviyeleri belirlenmiştir. Kültürün 14. ve 28. günlerinde, doku iskeleleri üzerindeki kültür ortamı uzaklaştırıldıktan sonra iskeleler 2 kere DPBS (pH 7.4) ile yıkanmış ve steril Eppendorf tüplerine aktarılmıştır. Ardından, üzerlerine 500 µL Qiazol (trizol çözeltisi) eklenmiş ve doku iskeleleri steril makas yardımıyla parçalanarak analiz edilinceye kadar -80°C’de ağzı kapaklı tüpler içerisinde saklanmıştır.

RNA izolasyonu için RNA izolasyon kitindeki (Qiagen®) talimatlar uygulanmıştır. Buna göre, örnekler vortekslendikten sonra üzerlerine 125 µL kloroform eklenmiş, elde 10-15 kez çalkalanmış ve ardından 4°C’de 10 dk 13,000 rpm’de santrifüjlenmiştir. Üstteki şeffaf RNA fazı RNA-DNA içermeyen yeni Eppendorf tüplerine aktarılmıştır. Elde edilen sulu RNA fazı kadar %70’lik (v/v) etanol tüpe eklenmiştir. Oluşan karışım RNA için seçici filtreler içeren RNeasy spin kolonuna aktararak 13,000 rpm’de 1 dk boyunca santrifüjlenmiştir. Ardından, kolonların alt kısmında toplanan sıvı uzaklaştırılmış ve her bir kolona 700 µL RW1 tamponu eklenerek 13,000 rpm’de 30 s boyunca santrifüjlenmiştir. Santrifüj sonrası kolonun altında toplanan sıvı tekrar uzaklaştırılarak her bir kolona 500 µL RPE tamponu eklenmiş ve 13,000

rpm’de 30 s boyunca santrifüjlendikten sonra son basamak tekrarlanmıştır. Kolonların altındaki tüpleri kapaksız tüplerle değiştirildikten sonra 13,000 rpm’de 1 dk boyunca santrifüjlenmiştir. Son olarak, kapaksız tüpler steril kapaklı tüpler ile değiştirilmiş ve her bir kolona 30 µL RNase içermeyen su eklenerek 13,000 rpm’de 1 dk boyunca santrifüj işlemi gerçekleştirilmiştir. Doku iskelelerinden izole edilen RNA konsantrasyonları NanoDrop ile analiz edilmiş ve her bir örneğin RNA konsantrasyonunu eşitlemek amacıyla örneklerin üzerine hesaplanan oranlarda su eklenmiştir.

RT-PCR analizleri için, Applied Biosystems Kit cDNA (ABD), SolisBioDyne’ın 5x HOT FIREPol® ve EvaGreen® qPCR Supermix çözeltileri kullanılmış ve analizler Light Cycler NanoInstrument (Roche, İsviçre) cihazı ile gerçekleştirilmiştir. cDNA sentezi reverse transkripsiyon ile 25°C’de 10 dk, 40°C’de 120 dk ve son olarak 85°C’de 5 dk olmak üzere üç aşamada gerçekleştirilmiştir. Ardından PCR analizi, aktivasyon basamağı 95°C’de 15 dk, uzatma basamağı 95°C’de 15s, 60°C’de 20s, 72°C’de 20s ve ayrılma basamağı 60°C’de 4s ve 95°C’de 20s olmak üzere 45 döngüde gerçekleştirilmiştir. Analizlerde *β-Aktin* geni referans gen (housekeeping gen) olarak kullanılmıştır. Hedef genin bağıl ifadesi, *β-Aktin* genine göre normalize edilmiş $2^{-\Delta\Delta C_t}$ yöntemi ile hesaplanmıştır. Kontrol grubu olan kitosan/Hap doku iskelelerindeki MC3T3-E1 hücrelerinin 14. gün ifade seviyeleri 1 olarak alınmış ve diğer gruplara ait gen ifadesi seviyeleri kontrol grubunun matematiksel olarak katları şeklinde verilmiştir. Genler için kullanılan primerler Metabion (Almanya) firmasından temin edilmiştir. Genlerin primer dizileri Çizelge 3.1’ de verilmiştir.

Çizelge 3.1. RT-PCR analizinde kullanılan primer dizileri.

Gen bölgeleri	Primer dizileri	
<i>β-Aktin</i>	Forward	5’-GTGCTATGTTGCCCTAGACTTCG-3’
	Reverse	5’-GATGCCACAGGATTCCATACCC-3’
<i>Col-I</i>	Forward	5’-CAAGATGTGCCACTCTGACT-3’
	Reverse	5’-TCTGACCTGTCTCCATGTTG-3’
<i>RunX2</i>	Forward	5’-GCATGGCCAAGAAGACATCC-3’
	Reverse	5’-CCTCGGGTTTCCACGTCTC-3’
<i>Ocn</i>	Forward	5’-CTTTCTGCTCACTCTGCTG-3’
	Reverse	5’-TATTGCCCTCCTGCTTGG-3’
<i>Opn</i>	Forward	5’-CACTTTCACCTCCAATCGTCCCTAC-3’
	Reverse	5’-ACTCCTTAGACTCACCGCTCTTC-3’

3.9. İnsan Kemik İliği Mezenkimal Kök Hücreleri (hMSC) ile Yürütülen Karakterizasyon ve *In Vitro* Hücre Kültür Çalışmaları

3.9.1. Hücre karakterizasyonu

İnsan kemik iliği kökenli mezenkimal kök hücreler (hMSC) aspire edilen kemik iliğinden (Lonza, ABD) izole edilmiştir. Hücrelerin tek tabakalı kültürdeki üreme davranışlarının incelenmesi amacıyla 8. pasajdaki hMSCler 24 gözlü kültür kaplarına 1 mL büyüme ortamı ile 1×10^4 hücre/mL konsantrasyonunda ekilmiş ve 7 gün boyunca kültüre edilmişlerdir. Büyüme ortamı olarak, %10 (v/v) FBS, %1 (v/v) antibiyotik çözeltisi (%0.2 ,v/v, amfoterisin B, %0.2 ,v/v, gentamisin, %0.6 ,v/v, penisilin/streptomisin) ve 2 ng/mL bFGF içeren α -MEM kullanılmıştır. MTT analizi için Bölüm 3.3.1’de anlatılan yöntem kullanılmış ve hücrelerin mitokondriyal aktiviteleri 7 gün boyunca incelenmiştir. Hücre sayım çalışmaları için ise Bölüm 3.3.2’de anlatılan yöntem uygulanmıştır.

3.9.2. Osteojenik farklılaşma çalışmaları

Osteojenik farklılaşma çalışmalarında iki farklı doku iskelesi kullanılmıştır. Bu iskeleler boş ve melatonin yüklü PLGA mikropartiküllerin doku iskelelerinin üretimi sırasında yapıya eklenmesi ile hazırlanmış ve sırasıyla, kitosan/HAp+Mp(-) ve kitosan/HAp+Mp(+) şeklinde ifade edilmiştir. Hazırlanan kitosan/HAp-bazlı doku iskeleleri, %70’lik (v/v) etanolde 30 dk bekletildikten sonra steril PBS ile 3 kez yıkanmış ve ardından da her iki yüzü 30’ar dk boyunca UV’ye maruz bırakılarak steril lenmiştir. Ardından, serumlu kültür ortamı içerisinde 2 saat boyunca gerçekleştirilen inkübasyon sonrasında hücreler, 30 μ L kültür ortamı içerisinde, 1×10^6 hücre/doku iskelesi olacak şekilde doku iskelelerine ekilmiştir. Hücrelerin doku iskelesine tutunması için 3 saat beklenmiş ve sonrasında her bir göze 1 mL büyüme ortamı eklenmiştir. Beş gün sonra ise doku iskelelerinin üzerindeki büyüme ortamı uzaklaştırılmış ve yerine 1 mL osteojenik farklılaşma ortamı (%10 ,v/v, FBS, %1 ,v/v, antibiyotik çözeltisi (%0.2 ,v/v, amfoterisin B, %0.2 ,v/v, gentamisin, %0.6 ,v/v, penisilin/streptomisin), 10 mM β -gliserol fosfat, 50 μ g/mL askorbik asit ve 10 nM dekzametazon içeren α -MEM) eklenmiştir.

Hücre davranışı 28 gün süren *in vitro* hücre kültür çalışmaları ile takip edilmiştir. Kültür süresi boyunca hücrelerin içerisinde bulunduğu ortam 2-3 günde bir yarı yarıya değiştirilerek tazelenmiştir. Steril ortam gerektiren tüm işlemler laminar akış kabini (Bioair, Type II Laminar Akış Kabini, İtalya) yürütülmüştür. Hücre canlılığı Bölüm 3.8.3.1’de anlatıldığı şekilde MTT analizi ile, hücre morfolojisi ise Bölüm 3.8.3.2’de anlatıldığı gibi SEM analizi ile incelenmiştir. Çalışmada 8. pasajdaki hücreler kullanılmıştır.

3.10. Melatonin/HP β CD İnküzyon Kompleksi Yüklü Kitosan/HAp+Mp Doku İskelelerinin Üretimi ve Karakterizasyonu

Geliştirilen doku iskelelerinin osteosarkom üzerindeki etkilerini incelemek amacıyla iskelelere yüksek miktarda melatonin yüklenmesi hedeflenmiştir. Bu amaçla, melatoninin sudaki çözünürlüğünü arttırmak için melatonin/HP β CD inküzyon kompleksi kullanılmıştır. Melatonin/HP β CD inküzyon kompleksi, daha önce grubumuz tarafından geliştirilen yöntemle mikrodalga teknolojisi kullanılarak üretilmiştir [133]. Gerçekleştirilen optimizasyon çalışmaları sonucunda, melatonin/HP β CD inküzyon kompleksinin mikrodalga teknolojisi kullanılarak üretileceği en uygun mikrodalga gücü 900 W, mikrodalga sıcaklığı 60°C ve mikrodalgaya maruz kalma süresi 90 s olarak belirlenmiştir. İnküzyon kompleksinin üretimi için 25 mg melatonin ve 157 mg HP β CD (1:1 molar oran) 2.5 mL %50'lik (v/v) etanol çözeltisinde ağzı kapaklı tüpler içerisinde iyice çözünmüş ve belirlenen mikrodalga koşullarına maruz bırakılmıştır. Ardından elde edilen çözelti 0.45 μ m'lik filtre ile süzülerek içerisindeki safsızlıklar uzaklaştırılmış ve vakum altında 3 gün boyunca 45°C'de kurutulmuştur. Sonuç olarak üretilen melatonin/HP β CD kompleksi katı formda elde edilmiştir.

Kitosan/HAp doku iskelelerine (2 mm çap, 9 mm yükseklik) ~2 mg melatonin içerecek şekilde üretilen inküzyon kompleksinin yüklenmesi için, 200 mg melatonin/HP β CD inküzyon kompleksi 2 mL distile su içerisinde çözünmüştür. Ardından 6 adet iskele çözelti içerisine daldırılmış ve 4°C'de 1 gece boyunca bekletilmiştir. Çözeltiden alınan doku iskeleleri -20°C'de 4 saat boyunca gerçekleştirilen ön dondurma işlemi sonrasında liyofilizatörde kurutulmuştur.

3.10.1. Melatonin/HP β CD inküzyon kompleksinin doku iskelelerine yüklenme veriminin belirlenmesi

Kitosan/HAp+Mp doku iskelelerine emdirilen inküzyon kompleksinin yüklenme veriminin belirlenmesi amacıyla, çözelti içerisinde kalan yani doku iskelelerine yüklenmeyen melatonin konsantrasyonu, kalibrasyon grafiği (Ek 3) kullanılarak spektrofotometrik olarak tayin edilmiştir.

3.10.2. ATR-FTIR analizi

Melatonin/HP β CD inküzyon kompleksinin kitosan/HAp+Mp doku iskelelerine başarılı bir şekilde yüklenip yüklenmediğinin belirlenmesi amacıyla Bölüm 3.7.2'de anlatıldığı şekilde spektrumları alınmıştır.

3.10.3. SEM analizi

Melatonin/HPβCD inklüzyon kompleksinin kitosan/HAp+Mp doku iskeleleri içerisindeki dağılımını ve morfolojisini belirlemek amacıyla Bölüm 3.6.3'te anlatıldığı şekilde SEM analizi gerçekleştirilmiştir.

3.10.4. *İn vitro* melatonin salım çalışmaları

Melatonin/HPβCD inklüzyon kompleksi yüklü kitosan/HAp+Mp doku iskelelerinden melatonin salımı %0.1 (w/v) sodyum azit içeren 5 mL fosfat tampon çözeltisi (PBS, pH 7.4) içerisinde 37°C'de ve 70 rpm hızındaki çalkalamalı etüvde gerçekleştirilmiştir. Beş gün süren salım çalışmasında belirlenen zamanlarda salım ortamından 200 µL örnek alınmış ve yerine alınan miktar kadar taze PBS eklenmiştir. Alınan örneğin içerdiği melatonin miktarları NanoDrop cihazı ile 279 nm'de spektrofotometrik olarak tayin edilmiştir. Salınan melatonin miktarları belirlenerek kümülatif salım profili elde edilmiştir. *İn vitro* salım çalışması 3 paralel örnek kullanılarak yürütülmüştür.

3.10.5. MG-63 hücreleri ile yürütülen hücre kültür çalışmaları

Geliştirilen doku iskelelerinden salınan melatoninin osteosarkom üzerindeki etkilerini incelemek amacıyla, daha önceden karakterizasyonu yapılmış insan osteosarkom MG-63 hücre hattı kullanılmıştır. Bu hücreler %10 (v/v) FBS ve %1 (v/v) penisilin-streptomisin içeren DMEM ortamında kültüre edilmiştir. Hücreler 24 gözlü kültür kaplarına 1 mL büyüme ortamı ile hücre yoğunluğu 2×10^4 hücre/mL olacak şekilde ekilmiştir.

Hücre kültür çalışmalarında 4 farklı doku iskelesi kullanılmış ve bu iskeleler aşağıda belirtilmiştir:

1. Boş PLGA mikropartiküllerin kitosan/HAp doku iskelelerine üretim sırasında katılması ile hazırlanan sistem: Kitosan/HAp+Mp(-)
2. Melatonin yüklü PLGA mikropartiküllerin kitosan/HAp doku iskelelerine üretim sırasında katılması ile hazırlanan sistem: Kitosan/HAp+Mp(+)
3. Kitosan/HAp+Mp(-) doku iskelelerine melatonin/HPβCD inklüzyon kompleksinin yüklenmesi ile hazırlanan sistem: Kitosan/HAp+Mp(-)/ik
4. Kitosan/HAp+Mp(+) doku iskelelerine melatonin/HPβCD inklüzyon kompleksinin yüklenmesi ile hazırlanan sistem: Kitosan/HAp+Mp(+)/ik

TCPS yüzeylerine ekilen hücrelerin 24 saat boyunca tutunmaları ve çoğalmaları sağlandıktan sonra hücrelerin üzerindeki kültür ortamı uzaklaştırılmış, ardından yerine 1 mL taze kültür ortamı eklenmiştir. Sonrasında, UV ile 20 dk boyunca her iki yüzü de sterillenen

doku iskeleleri 24 gözlü kültür kaplarının her bir gözüne yerleştirilmiş ve 3 gün boyunca 37°C sıcaklığa, %95 neme ve %5 CO₂'ye sahip inkübatörde (Heraus Instruments, Almanya) kültürasyon gerçekleştirilmiştir. Steril ortam gerektiren tüm işlemler laminar akış kabini (Bioair, Type II Laminer Akış Kabini, İtalya) yürütülmüştür.

3.10.5.1.MTT analizi

Doku iskeleleri ile dolaylı olarak etkileşen MG-63 hücrelerinin canlılığı ve metabolik aktiviteleri 3 gün boyunca MTT analizi ile incelenmiştir. Bunun için, hücrelerin üzerinde bulunan doku iskeleleri steril bir pens yardımıyla uzaklaştırıldıktan sonra her bir göze 600 µL serumsuz taze kültür ortamı ile 60 µL MTT çözeltisi eklenmiş ve 37°C'de 3 saat boyunca inkübe edilmiştir. Diğer prosedürler Bölüm 3.3.1'de anlatıldığı şekilde gerçekleştirilmiştir.

3.10.5.2.Optik mikroskop ile görüntüleme

Doku iskeleleri ile etkileşen hücrelerin morfolojilerinin belirlenmesi amacıyla kültürün her günü optik mikroskop görüntüleri çekilmiştir. Görüntüleme öncesinde hücrelerin üzerindeki kültür ortamı ve iskeleler gözlerden uzaklaştırılmış ve 2 kez DPBS ile yıkandıktan sonra hücreler optik mikroskop (Olympus, ABD) ile görüntülenmiştir.

3.10.5.3.Hücre döngü analizi

Doku iskeleleri ile 1 gün boyunca etkileşen MG-63 hücrelerinin hücre döngü analizi akış sitometrisi kullanılarak gerçekleştirilmiştir. Hücrelerin üzerindeki kültür ortamı ve tripsinizasyon ile yüzeyden kaldırılan hücreler bir tüpte toplanarak 1,500 rpm'de 5 dk boyunca santrifüjlenmiştir. Hücrelerin üzerindeki süpernatant atıldıktan sonra üzerine DPBS eklenmiş ve tekrar aynı koşullarda santrifüjlenmiştir. Süpernatant tekrar uzaklaştırıldıktan sonra hücrelerin üzerine %70'lik (v/v) soğuk etanol eklenerek hücre fiksasyonu gerçekleştirilmiş ve hücreler analize kadar -20°C'de saklanmıştır.

Hücre döngü analizi öncesinde hücreler PBS ile muamele edildikten sonra 1,500 rpm'de 10 dk boyunca santrifüjlenmiş ve süpernatant uzaklaştırılmıştır. Sonrasında, hücrelerin üzerine %0.1 (v/v) Triton X-100, 10 µg/mL propidium iyodür ve 100 µg/mL DNase-içermeyen RNase içeren çözelti eklenmiş ve 30 dk boyunca karanlıkta inkübasyon gerçekleştirilmiştir. Ardından akış sitometri cihazı (BD FACS Calibur, ABD) kullanılarak hücre döngü analizi gerçekleştirilmiş ve 20,000 çekirdek sayılarak iki değişkenli histogramdan sonuçlar değerlendirilmiştir. Hücrelerin G₀/G₁, S ve G₂/M fazları Modfit LT 3.0 analytical yazılımı kullanılarak yüzde olarak belirlenmiştir.

3.11. İpek Filmlerin Üretimi, Melatonin ile Modifikasyonu ve *In Vitro* Hücre Kültür Çalışmaları

Tez çalışmasının bu bölümünde Tufts Üniversitesi'nde (Medford, MA, ABD) Biyomedikal Mühendisliği Bölümü'nden Prof. Dr. David L. Kaplan'ın laboratuvarında gerçekleştirilen çalışmalar detaylı bir şekilde anlatılmıştır.

3.11.1. İpek çözeltisinin hazırlanması

İpek filmlerin üretimi için öncelikle ipek fibroin çözeltisi üretilmiştir. Bu amaçla, öncelikle *Bombyx mori* ipek kozaları (Tsukuba, Japonya) titanyum makas yardımıyla küçük parçalara bölünmüş ve 0.02 M Na₂CO₃ çözeltisi içerisinde 30 dk boyunca kaynatılarak yapışkan serisin proteininin fibroin proteininden uzaklaştırılması sağlanmıştır. Ardından, elde edilen ipek fibroin proteini 3 kez distile su ile yıkamanın ardından, 1 saat distile su içerisinde bekletilmiş ve sonrasında da 1 gece boyunca çeker ocakta kurumaya bırakılmıştır. Kuruyan fibroin iplikleri 9.3 M LiBr çözeltisi içerisinde 60°C'de 4-6 saat boyunca çözünmüş ve Slide-A-Lyzer diyaliz kasetleri (molecular weight cutoff: 3,500, Thermo Fisher Scientific, ABD) ile 48 saat boyunca distile suya karşı diyaliz işlemi gerçekleştirilmiştir. Diyaliz sonrasında kasetlerin içerisindeki ipek çözeltisi 9,000 rpm'de 4°C'de 20 dk boyunca iki kez santrifüjlenmiş ve elde edilen süpernatant kullanıncaya kadar 4°C'de saklanmıştır. Elde edilen çözeltinin konsantrasyonu gravimetrik olarak hesaplanmıştır.

3.11.2. İpek filmlerin üretimi ve filmlere melatonin emdirilmesi

İpek filmlerin hazırlanması için 200 µL %6-8 (w/v) ipek fibroin çözeltisi 24 gözlü kültür kaplarının her bir gözüne eklenmiş ve 60°C fırında 3-4 saat boyunca kurutulmuştur. İpek filmlerin β-tabaka miktarının artırılması için “metanol ile tavlama” ve “su ile tavlama” olmak üzere iki yöntem kullanılmıştır. Metanol ile tavlama yönteminde kuruyan ipek filmlerin üzerine 300 µL metanol eklenmiş ve filmler 1 saat boyunca 4°C'de inkübe edilmiştir. Su ile tavlama yönteminde ise, daha önce bahsedilen yöntem modifiye edilmiştir [134]. Kısaca, kuru haldeki ipek filmler 5 saat boyunca vakum altındaki nemli ortamda inkübe edilmiştir. Bunun için vakum seviyesinin yaklaşık 25 inHg (85 KPa) olduğu vakum fırını (Fisher Scientific Isotemp, ABD) kullanılmıştır.

Farklı konsantrasyonlardaki melatonin çözeltisi (0-2 mM) ipek filmlere emdirme yöntemiyle yüklenmiştir. Metanol ile tavlanan ipek filmler PBS (pH 7.4) ile 3 kez yıkandıktan sonra üzerlerine PBS içerisinde hazırlanmış steril melatonin çözeltileri eklenmiş ve 1 gece boyunca kurumaya bırakılmıştır. Su ile tavlanan ipek filmlere melatonin yüklenmesi için ise, yine farklı konsantrasyonlardaki melatonin çözeltileri ipek fibroin çözeltisi ile iyice

karıştırılarak 24 gözlüğe eklenmiş ve laminar kabin içerisinde 1 gece boyunca kurutulmuştur. Ardından, ipek filmler 5 saat boyunca vakum fırınında nemli ortamda inkübe edilmiştir.

3.11.3. *In vitro* melatonin salım çalışmaları

İpek filmlerden *in vitro* melatonin salımı 37°C'deki inkübatörde 5 gün boyunca incelenmiştir. Salım çalışmaları için her bir ipek film üzerine 300 µL PBS (pH 7.4) eklenmiş ve belirli zaman aralıklarında 150 µL çözelti alınarak salınan melatonin miktarı NanoDrop cihazında (Termo Scientific, ABD) 279 nm'de spektrofotometrik olarak tayin edilmiştir. Ardından salım ortamına 150 µL taze PBS eklenerek salım çalışmalarına devam edilmiştir. *In vitro* melatonin salım çalışmaları 4 paralel örneklerle gerçekleştirilmiştir.

3.11.4. Melatoninin hMSClerin proliferasyonuna etkisinin incelenmesi

İpek filmlere yüklenen melatoninin hMSClerin proliferasyonuna olan etkisini incelemek amacıyla 25 yaş altı, sağlıklı ve sigara içmeyen erkek bireye ait kemik iliği aspiratından elde edilen (Lonza, ABD) insan mezenkimal kök hücreleri (hMSC) kullanılmıştır. Hücreler büyüme ortamı (%10 v/v, FBS, %1 v/v, penisilin-streptomisin ve %1 v/v, non-esansiyel aminoasitler içeren α-MEM) içerisinde kültüre edilmiş ve doluluk oranı %80'e ulaştıktan sonra tripsinize edilerek yüzeyden kaldırılmıştır. Üçüncü pasajdaki hücreler, 1 saat boyunca UV ile sterilize edilen ipek filmler üzerine 5x10⁴ hücre/film olacak şekilde 300 µL büyüme ortamı ile ekilmişlerdir.

3.11.4.1. Alamar Mavisi analizi

Hücre kültürü çalışmaları boyunca hMSClerin mitokondriyal aktiviteleri Alamar Mavisi analizi ile 4 paralel örnek kullanılarak belirlenmiştir. Analiz öncesinde, ipek filmler üzerindeki kültür ortamı uzaklaştırılmış ve steril DPBS ile yıkama gerçekleştirilmiştir. Ardından, her bir örneğe %10 (v/v) Alamar mavisi içeren 200 µL büyüme ortamı eklenmiş ve örnekler 37°C'deki CO₂ inkübatöründe 3 saat boyunca inkübe edilmişlerdir. Kültür ortamından 60 µL alınan çözeltinin floresan şiddeti SpectraMax M2 Multi-Mode Mikroplaka okuyucusu (Molecular Devices, ABD) ile ölçülmüştür (560 nm eksitasyon, 590 nm emisyon). Hücre içermeyen ipek filmlerden elde edilen değerler sonuçlardan çıkarılmıştır.

3.11.5. hMSCler ile yürütülen *in vitro* hücre kültür çalışmaları

İpek filmlerden salınan melatoninin hMSClerin osteojenik farklılaşması üzerindeki etkisi 21 gün süren *in vitro* hücre kültür çalışmaları ile incelenmiştir. Farklılaşma ortamı olarak %10 (v/v) FBS, %1 (v/v) penisilin-streptomisin, %1 (v/v) non-esansiyel aminoasitler, 10 mM β-

gliserol fosfat, 0.05 mM askorbik asit ve 100 nM dekzametazon içeren α -MEM kullanılmıştır. Kontrol olması amacıyla, melatoninin hMSClerin farklılaşması üzerinde etkisi büyüme ortamında da incelenmiştir.

3.11.5.1.Hücre morfolojisinin incelenmesi

Hem büyüme hem de osteojenik ortamda kültüre edilen hücrelerin morfolojilerinin incelenmesi amacıyla kültürün 1. gününde optik mikroskop (Keyence BZ-X700, Itasca, IL, ABD) ile, kültürün 7. ve 14. günlerinde ise floresan mikroskop (Keyence BZ-X700, Itasca, IL, ABD) ile görüntüleri çekilmiştir. Optik mikroskop ile görüntüleme öncesinde hücrelerin üzerindeki kültür ortamı uzaklaştırılmış ve DPBS ile 2 kez yıkandıktan sonra görüntüleri alınmıştır. Floresan mikroskop ile görüntüleme öncesinde ise hücrelerin üzerindeki kültür ortamı uzaklaştırıldıktan sonra yine 2 kez DPBS ile yıkanmış ve her bir göze 300 μ L %4 (v/v) paraformaldehit çözeltisi eklenerek 30 dk boyunca inkübe edilmiştir. Hücre fiksasyonu sonrasında ipek filmler 3 kez PBS (pH 7.4) ile yıkanmıştır. Ardından, hücre membranının geçirgenliğini arttırmak için hücreler üzerine %0.1 (v/v) TritonX-100 çözeltisi eklenerek 15 dk boyunca oda sıcaklığında beklenmiştir. Filmler tekrar PBS ile 3 kez yıkanmış ve üzerine 200 μ L Alexa Fluor 594 phalloidin (1:200) çözeltisi eklenerek 1 saat boyunca karanlıkta inkübe edilmiştir. Hücre çekirdeğini boyamak için ise her bir göze 200 μ L DAPI (1:1000) çözeltisi eklenmiş ve 10 dk boyunca karanlıkta inkübasyon sonrasında floresan mikroskobu ile görüntüleme yapılmıştır.

3.11.5.2.ALP boyaması

Hücrelerin ALP aktivitesi kültürün 7. ve 14. günlerinde Vector Blue substrat kitindeki (Vector Laboratories, ABD) protokol uygulanarak tayin edilmiştir. İpek filmler üzerinde üreyen hücreler, kit içerisindeki çözelti içerisinde 1 saat boyunca inkübe edildikten sonra optik mikroskop (Keyence BZ-X700, Itasca, IL, ABD) ile görüntülenmiştir. Ardından, boyanan hücrelerin floresan şiddeti SpectraMax M2 Multi-Mode mikropilaka okuyucu (Molecular Devices, ABD) ile ölçülmüştür (500 nm eksitasyon, 680 nm emisyon). ALP aktivitesi 4 paralel örnek kullanılarak tayin edilmiştir.

3.11.5.3.Kristal viyole ile boyama ve DNA içeriğinin belirlenmesi

Hücrelerin DNA miktarı kristal viyole boyaması ile belirlenmiştir. Bunun için kültür ortamı uzaklaştırılmış ve ipek filmler üzerindeki hücreler DPBS ile 2 kez yıkanmıştır. Ardından, hücrelerin üzerine 150 μ L %0.5'lik (w/v) kristal viyole çözeltisi eklenmiş ve 20 dk boyunca oda sıcaklığında inkübasyon gerçekleştirilmiştir. Ardından boyanan hücreler distile su ile iyice yıkanmıştır. Boyanın ekstraksiyonu için her bir göze 300 μ L metanol eklenmiş ve

çalkalamalı inkübatörde 30 dk boyunca inkübe edilmiştir. Elde edilen çözeltinin absorbansı SpectraMax M2 Multi-Mode mikroparka okuyucu (Molecular Devices, ABD) ile 570 nm’de ölçülmüştür. Hücre içermeyen ipek filmlere ait absorbans değerleri, elde edilen değerlerden çıkarılmıştır. Bu analiz için de 4 paralel örnek kullanılmıştır.

3.11.5.4.İmmün boyama çalışmaları

İmmün boyama çalışmaları kültürün 7. ve 14. günlerinde gerçekleştirilmiştir. İpek filmler üzerindeki kültür ortamı uzaklaştırıldıktan sonra 2 kez DPBS ile yıkanmış ve her bir göze 300 µL %4 (v/v) paraformaldehit çözeltisi eklenerek 30 dk boyunca hücre fiksasyonu gerçekleştirilmiştir. Ardından, hücreler 3 kez PBS (pH 7.4) ile yıkanmış ve analize kadar 4°C’de saklanmıştır.

Analiz öncesinde, hücrelerin üzerine 200 µL %1’lik (w/v) PBS/A eklenmiş ve 2 saat boyunca oda sıcaklığında inkübasyon gerçekleştirilmiştir. Ardından, hücrelerin üzerindeki çözelti uzaklaştırılmış ve her bir göze 150 µL primer antikor çözeltileri (25 µg/mL, rat, monoklonal anti-RunX2 antikor (%1 ,v/v, PBS/A içerisinde) ve 25 µg/mL, fare, anti-osteokalsin (OCN) antikor (%1 ,v/v, PBS/A içerisinde) eklenmiş ve 4°C’de bir gece boyunca inkübe edilmiştir. Ertesi gün, hücrelerin üzerindeki primer antikor çözeltileri uzaklaştırılmış ve gözler %1’lik (w/v) PBS/A çözeltisi ile 3 kez yıkanmıştır. Ardından, her bir göze 150 µL sekonder antikor çözeltisi (floresan goat anti-rat IgG (1:200) ve floresan goat anti-fare IgG (1:200)) eklenmiş ve 2 saat boyunca karanlıkta inkübasyon gerçekleştirilmiştir. İnkübasyon sonrasında gözler yine %1’lik (w/v) PBS/A çözeltisi ile 3 kez yıkanmış ve 150 µL DAPI çözeltisi (1:1000) içerisinde 15 dk boyunca bekletilerek hücre çekirdeklerinin boyanması sağlanmıştır. Son olarak, gözler %1’lik (w/v) PBS/A ile 3 kez yıkanmış ve hücreler floresan mikroskop (Keyence BZ-X700, Itasca, IL, ABD) ile görüntülenmiştir.

3.11.5.5.Matris mineralizasyonunun incelenmesi

Matris mineralizasyonunun belirlenmesi için kültürün 21. gününde Von Kossa boyaması gerçekleştirilmiştir. Hücreler PBS (pH 7.4) ile 2 kez yıkandıktan sonra %4’lük (v/v) paraformaldehit çözeltisi içerisinde 20 dk boyunca fikse edilmiştir. Ardından, hücreler distile su ile 3 kez yıkanmış ve her bir göze 200 µL %5’lik (w/v) gümüş nitrat çözeltisi eklenmiş ve 1 saat boyunca UV ışığına maruz bırakılmıştır. Distile su ile gerçekleştirilen yıkama sonrasında, reaksiyona girmeyen gümüş nitratın uzaklaştırılması için her bir göze 200 µL %5’lik (w/v) sodyum tiyosülfat çözeltisi eklenmiş ve 3 dk sonrasında tekrar distile su ile yıkanmıştır. Son olarak hücreler üzerindeki suyun tamamen uzaklaştırılması için

gözlere mutlak etanol eklenmiş ve hücreler optik mikroskop (Keyence BZ-X700, Itasca, IL, ABD) ile görüntülenmiştir.

3.12. İstatistiksel Analiz

Çalışma kapsamında elde edilen tüm veriler GraphPad Software InStat programı kullanılarak istatistiksel açıdan değerlendirilmiştir. Veriler üç ve/veya dört deney seti için ortalama $\pm$ standart sapma değerleri ile birlikte sunulmuştur. İki grubun istatistiksel olarak karşılaştırılması için Student's t-testi, üç ve daha fazla grubun istatistiksel olarak karşılaştırılması için ise tek yönlü ANOVA yöntemi Tukey–Kramer post hoc testiyle birlikte kullanılmış ve p değerinin 0.05'ten az olduğu durumlar anlamlı kabul edilmiştir.



4. DENEYSEL SONUÇLAR ve TARTIŞMALAR

Çalışmanın bu bölümünde tez çalışması kapsamında gerçekleştirilen deneysel çalışmalar sonucunda elde edilen veriler sunulmuş ve literatürden de örnekler verilerek detaylı bir şekilde tartışılmıştır. İlk olarak, boş ve melatonin yüklü PLGA nano/mikropartiküllerin üretim parametreleri belirlenmiş ve karakterizasyon çalışmalarından elde edilen sonuçlar verilmiştir. Sonrasında MG-63 insan osteosarkom hücrelerinin karakterizasyonu yapılmış ve PLGA nano/mikropartiküllerin hem bu hücreler hem de preosteoblastik MC3T3-E1 hücreleri ile etkileşimi sonucu elde edilen veriler tartışılmıştır. Ardından, kitosan doku iskelelerinin üretimi ve karakterizasyonuna ait sonuçlar sunulmuş ve bu iskelelerle yürütülen öncül hücre kültür çalışmalarına yer verilmiştir. Bir sonraki kısımda, kitosanın kitosan/HAp doku iskeleleri üretimine, karakterizasyonuna ve MC3T3-E1 hücreleri ile yürütülen *in vitro* hücre kültür çalışmalarına ait sonuçlar sunulmuştur. Ardından, hMSClerin karakterizasyonu gerçekleştirilmiş ve bir önceki çalışmada en iyi sonucu veren doku iskelesinin hMSClerin osteojenik farklılaşması üzerindeki etkileri incelenmiştir. Sonrasında, melatonin/HPβCD inklüzyon kompleksi üretilmiş ve kitosan/HAp doku iskelelerine yüklendikten sonra karakterizasyon çalışmaları gerçekleştirilmiştir. Hazırlanan bu sistemin MG-63 hücrelerinin inhibisyonu üzerindeki etkileri incelenmiş ve osteosarkom tedavisi için uygunluğu değerlendirilmiştir. Son olarak, ipek filmlerin yüzeyi farklı konsantrasyonlardaki melatonin ile modifiye edilerek oluşturulan sistemin, hMSClerin osteojenik farklılaşma davranışları üzerindeki etkileri hem büyüme hem de farklılaşma ortamında incelenmiş ve elde edilen veriler doğrultusunda geliştirilen bu sistemin kemik doku mühendisliğinde kullanım potansiyeli değerlendirilmiştir.

4.1. PLGA Nano/Mikropartiküllerin Üretimi ve Karakterizasyonu

Biyobozunur polimerler kullanılarak üretilen nano/mikropartiküller, istenilen bölgede kontrollü ilaç salımı için oldukça uygun sistemlerdir. Nano/mikropartiküllerin içerisine ilaçların yüklenmesiyle, ilaçların kararlılıkları artmakta dolayısıyla farmakolojik etkileri daha uzun süreli olmaktadır [135]. Melatonin, birçok avantaja sahip olsa da, oksidasyona ve ışığa olan hassasiyeti ile kısa yarılanma ömrü (30-60 dk) bu molekülden yeterli biyoyararlanım sağlama açısından önemli bir sorun oluşturmaktadır [136]. Bu nedenle, polimerik taşıyıcı sistemlere yüklenerek kullanılması birçok uygulamada melatoninin kullanımı açısından oldukça avantajlıdır.

Tez çalışmasında melatoninin yüklenmesi için, laktik asit ve glikolik asit monomerlerinin kopolimerizasyonu sonucu oluşan poli(laktik-ko-glikolik asit) (PLGA) kopolimeri

kullanılmıştır. PLGA, Amerikan Gıda ve İlaç Kurumu (Food and Drug Administration, FDA) tarafından onaylı, biyouyumlu ve biyobozunur bir polimer olmasının yanında, bozunması sonucu oluşan ürünler normal hücre fonksiyonlarını etkilememektedir ve bütün bu nedenlerden dolayı, ilaç salım sistemlerinin hazırlanmasında ve doku mühendisliği uygulamalarında oldukça önemli bir yere sahiptir [137, 138]. Bu nedenle, sunulan tez çalışmasında taşıyıcı sistem olarak kullanılmak üzere tekli emülsiyon oluşturma/çözücü buharlaştırma yöntemi ile PLGA nano/mikropartikülleri üretilerek, melatoninin bu sistemlerden kontrollü ve uzun dönemde salımı hedeflenmiştir [139].

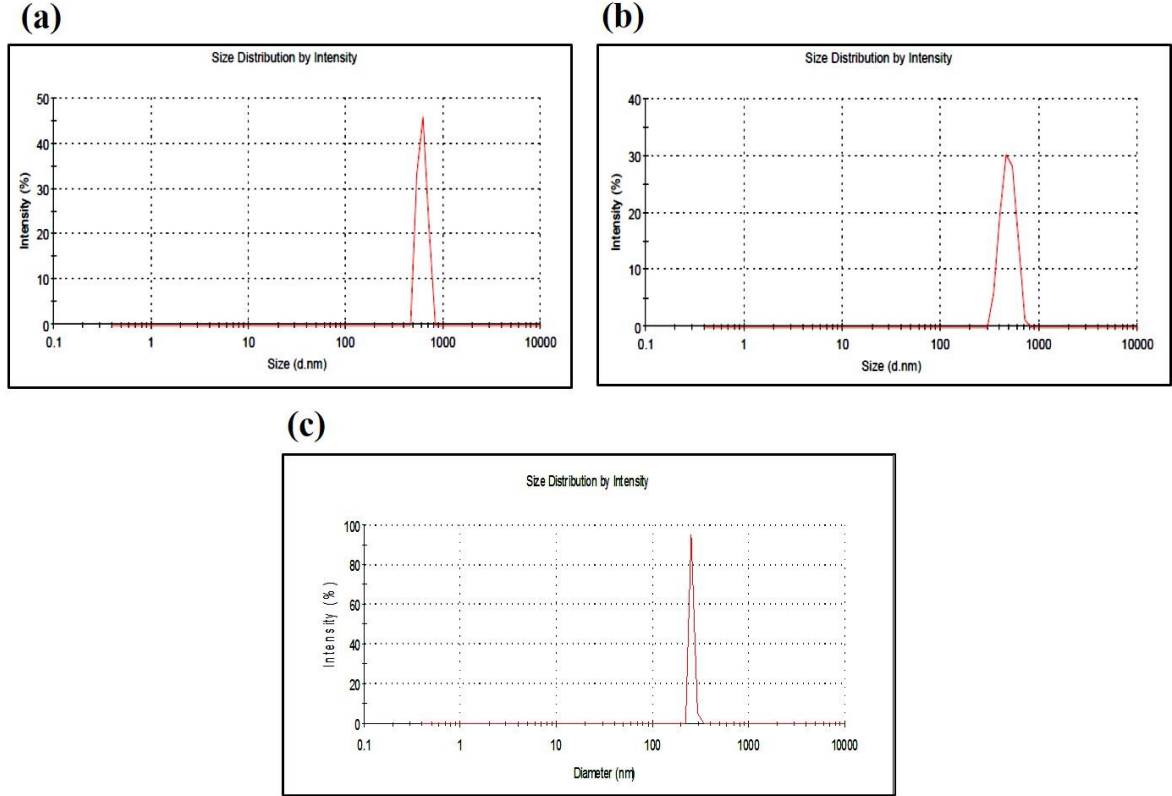
4.1.1. Boş PLGA nano/mikropartiküllerin üretim koşullarının belirlenmesi

Boş PLGA nano/mikropartiküller tekli emülsiyon oluşturma/çözücü buharlaştırma yöntemi ile üretilmiştir. Bu yöntemde polimeri ve biyoaktif ajanı içeren organik faz ile yüzey aktif maddeyi içeren sulu faz bulunmaktadır. Bu iki fazın karışımı sonucu emülsiyon oluşur ve ardından, organik çözücünün uzaklaştırılması ile nano/mikropartiküllerin üretimi gerçekleşir [111, 112]. Bu yöntemde, yüksek hızlı homojenizatör kullanılarak karıştırma sağlanır ve karıştırma hızı, partikül büyüklüğünü kontrol eden en önemli parametredir. Söz konusu yöntem hem kolay olması hem de farklı birçok maddeye uygulanabilir olması nedeniyle sıklıkla tercih edilmektedir [107].

Boş PLGA nanopartiküller, PLA/PGA oranı 50/50 olan PLGA kopolimeri kullanılarak, farklı homojenizasyon hızı (8,000 rpm ve 15,000 rpm) ve süresi (5 ve 7 dk) ile hazırlanmışlardır. Bu üretim koşullarının partiküllerin üretim verimi, ortalama boyutu ve boyut dağılımı gibi özelliklerini ne şekilde etkilediği Çizelge 4.1’de özetlenmiştir. Partiküllerin boyut ve boyut dağılımlarını gösteren grafikler ise Şekil 4.1’de sunulmuştur.

Çizelge 4.1. Üretim koşullarının boş PLGA nanopartiküllerin üretim verimine ve ortalama çapına olan etkisi (partikül sayısı=100).

Homojenizasyon hızı (rpm)	Homojenizasyon süresi (dk)	Üretim verimi (%)	Ortalama partikül çapı (nm)	Çoklu dağılım endeksi (PDI)
8,000	5	85.8 ± 2.62	667.0 ± 299.2	0.646 ± 0.018
8,000	7	82.9 ± 3.78	596.3 ± 305.7	0.685 ± 0.046
15,000	7	99.2 ± 1.83	212.9 ± 65.6	0.117 ± 0.035

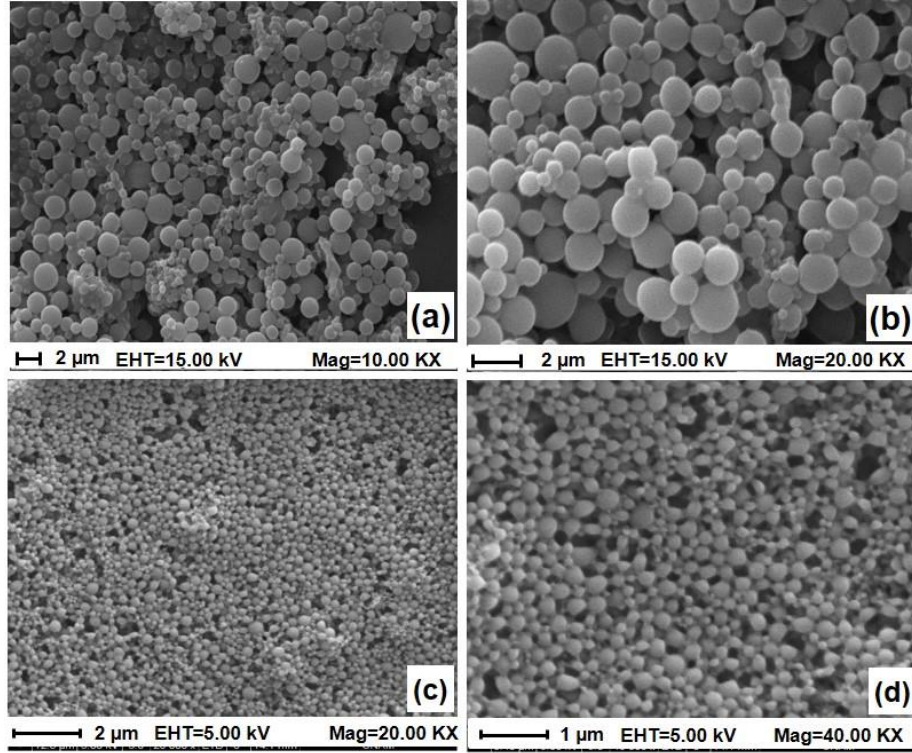


Şekil 4.1. PLGA nanopartiküllerin boyut ve boyut dağılımlarını gösteren grafikler: (a) homojenizasyon hızı: 8,000 rpm, homojenizasyon süresi: 5 dk, (b) homojenizasyon hızı: 8,000 rpm, homojenizasyon süresi: 7 dk ve (c) homojenizasyon hızı: 15,000 rpm, homojenizasyon süresi: 7 dk.

Homojenizasyon hızının 8,000 rpm olduğu koşulda, organik fazın buharlaşması sonrası çözelti içerisinde nanopartikül oluşumuna katılmayan polimerin veya boyutça büyük partiküllerin bir araya gelerek dibe çökmesinden kaynaklanan yapılar olduğu görülmüş ve bu durumun da üretim verimini düşürdüğü belirlenmiştir. Bu nedenle, aynı homojenizasyon hızında (8,000 rpm), homojenizasyon süresi artırılarak sorun çözülmeye çalışılmıştır. Ancak, homojenizasyon hızının 5 dk'dan 7 dk'ya çıkarılmasının üretim verimi üzerinde herhangi bir iyileşme sağlamadığı belirlenmiştir. Ayrıca, homojenizasyon süresinin artırılmasının partikül çapı üzerinde de çok belirleyici bir etkisinin olmadığı görülmüştür. Bu nedenle homojenizasyon hızının arttırılmasına karar verilmiştir. Homojenizasyon hızının 8,000 rpm'den 15,000 rpm'e çıkarıldığı durumda, üretim veriminin önemli derecede arttığı belirlenmiştir. Ayrıca, homojenizasyon hızının arttırılması sonucu partikül çapının yaklaşık olarak 3 kat azaldığı ve nanopartiküllerin eş boyut dağılımına sahip olmasına bağlı olarak çoklu dağılım endeks (PDI) değerinin azaldığı gözlemlenmiştir (Çizelge 4.1).

Farklı homojenizasyon koşullarının PLGA nanopartiküllerin morfolojisini ne şekilde etkilediğini belirlemek amacıyla SEM analizi gerçekleştirilmiştir. Her iki koşulda (8,000

rpm, 5 dk ve 15,000 rpm, 7 dk) üretilen nanopartiküllerin düzgün küresel yapıda oldukları ve yüzeylerinde herhangi bir kırık ya da çatlak bulunmadığı görülmüştür. Ayrıca, homojenizasyon hızının artması sonucu partikül çaplarının azaldığı ve partiküllerin daha eş boyut dağılımına sahip olduğu belirlenmiştir (Şekil 4.2). Çizelge 4.1’de verilen ortalama partikül çap değerleri Şekil 4.2’de verilen SEM görüntüleri kullanılarak Image J (NIH, Bethesda, MD, ABD) programında hesaplanmıştır.

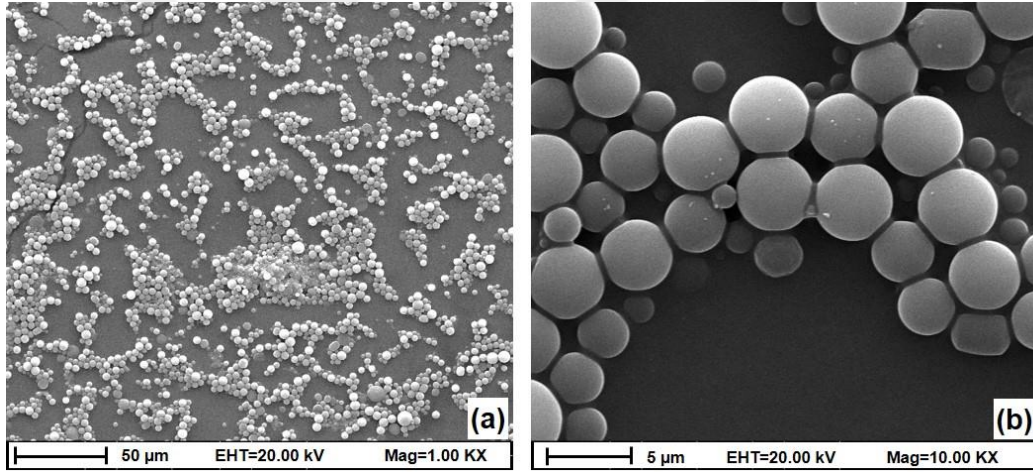


Şekil 4.2. Farklı homojenizasyon koşullarında üretilen boş PLGA nanopartiküllerin SEM görüntüleri: (a) homojenizasyon hızı: 8,000 rpm ve homojenizasyon süresi: 5 dk (10,000 X), (b) homojenizasyon hızı: 8,000 rpm ve homojenizasyon süresi: 5 dk (20,000 X), (c) homojenizasyon hızı: 15,000 rpm ve homojenizasyon süresi: 7 dk (20,000 X) ve (d) homojenizasyon hızı: 15,000 rpm ve homojenizasyon süresi: 7 dk (40,000 X).

Homojenizasyon hızının ve süresinin değiştirilmesi sonucu elde edilen PLGA nanopartiküllerin özellikleri literatür ile de uyumludur. Anarjan ve ark.’nın [140] yaptığı çalışmada homojenizasyon süresinin partikül boyutu üzerinde çok belirleyici bir etkisinin olmadığı, ancak homojenizasyon hızının partikül boyutu ile ters orantılı olduğu belirtilmiştir. Lee ve ark. [141] da PLGA nanopartiküllerin üretiminde homojenizasyon hızının nanopartikül boyutu üzerinde oldukça önemli bir etkisi olduğunu vurgulamışlardır. Homojenizasyon hızı arttıkça birim zamanda meydana gelen yüksek kayma gerilimi sonucu emülsiyon damlacıklarının boyutu azalmakta, dolayısıyla çok daha küçük boyuta sahip partiküller elde edilebilmektedir.

Sonuç olarak, PLGA nanopartiküllerin üretimi sırasında safsızlıkların bulunmaması, homojen bir nanopartikül süspansiyonu elde edilmesi ve buna bağlı olarak yüksek üretim verimine ulaşılması göz önünde bulundurulduğunda, hem boş hem de melatonin yüklü PLGA nanopartiküllerin hazırlanmasında homojenizasyon hızı ve süresi, sırasıyla 15,000 rpm ve 7 dk olarak belirlenmiştir.

Boş PLGA mikropartiküller, nanopartikül üretiminde belirlenen homojenizasyon koşulları (15,000 rpm homojenizasyon hızı ve 7 dk homojenizasyon süresi) kullanılarak üretilmiştir. PLGA mikropartiküllerin üretiminde PLGA nanopartiküllerin üretiminden farklı olarak, organik çözücü olarak diklorometan, stabilizör olarak ise PVA kullanılmıştır. Şekil 4.3'te verilen SEM görüntülerinde, boş PLGA mikropartiküllerin küresel morfolojide oldukları ancak partikül boyut dağılımlarının boş PLGA nanopartiküllerde olduğu kadar homojen olmadığı belirlenmiştir. Ortalama partikül boyutu SEM görüntüleri kullanılarak Image J (NIH, Bethesda, MD, ABD) programında $3.20 \pm 1.03 \mu\text{m}$ olarak hesaplanmıştır.



Şekil 4.3. Boş PLGA mikropartiküllerin farklı büyütme ölçeklerindeki SEM görüntüleri: (a) 1,000 X, (b) 10,000 X.

Boş PLGA nano/mikropartiküllerin SEM görüntülerinden de anlaşıldığı üzere, stabilizör türünün partikül boyutu üzerinde oldukça belirleyici bir etkisinin olduğu görülmüştür. Stabilizör olarak DMAB kullanıldığında nanometre mertebesinde çapa sahip partiküller üretilmişken, PVA kullanıldığında partikül boyutu yaklaşık 15 kat kadar artarak mikrometre mertebesinde çapa sahip partiküller elde edilmiştir. DMAB çift kuyruklu katyonik bir yüzey aktif madde olduğundan PVA'ya göre daha düşük kritik misel konsantrasyonuna sahiptir ve bu nedenle çok düşük konsantrasyonlarda bile bir araya gelerek misel oluşturabilmektedir. Bu durum da misel yapıları arasındaki ara yüzey gerilimini azaltarak daha küçük boyutta partiküllerin üretimine olanak sağlamaktadır [139, 142, 143].

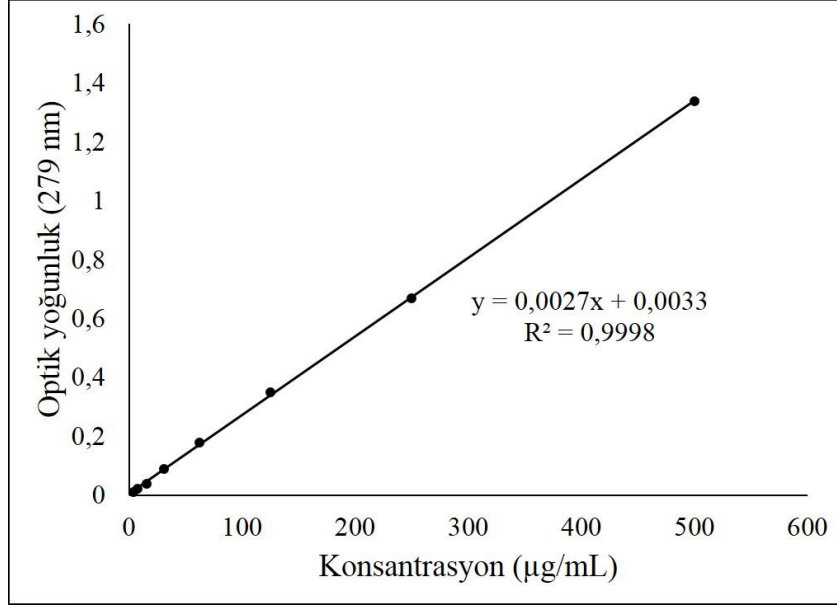
4.1.2. Melatonin yüklü PLGA nano/mikropartiküllerin üretimi ve karakterizasyonu

Melatonin yüklü PLGA nano/mikropartiküllerin üretimi için de tekli emülsiyon oluşturma/çözücü buharlaştırma yöntemi kullanılmıştır. PLGA nano/mikropartiküllerin üretimi sırasında organik faza, polimere göre ağırlıkça oranı %10 ve %20 olacak şekilde melatonin eklenmiş ve bu şekilde üretilen nanopartiküller, sırasıyla PLGA nano-10 ve PLGA nano-20 olarak ifade edilmiştir. Organik faza %10 ve %20 (w/w) melatonin eklenerek üretilen mikropartiküller ise, sırasıyla PLGA mikro-10 ve PLGA mikro-20 olarak ifade edilmiştir.

Melatoninin amfifilik yapısından dolayı, organik faz ve sulu fazın karıştırılması sırasında sulu faza difüzyonunu engellemek amacıyla, sulu faza bir miktar melatonin eklenerek de üretimler gerçekleştirilmiştir. Böylelikle, hazırlanan partiküllerin daha yüksek verimle melatoninini enkapsüle etmesi hedeflenmiştir. Bu amaçla, PLGA nanopartiküllerin üretimi için sulu faza %0.0, %0.1 ve %0.2 (w/v) oranında, PLGA mikropartiküllerin üretimi için ise %0.2 (w/v) oranında melatonin eklenmiştir.

4.1.2.1. Enkapsülasyon veriminin belirlenmesi

PLGA nano/mikropartiküllerin üretimi sırasında organik fazda bulunan melatoninin ne kadarının partiküller tarafından hapsedildiğinin belirlenebilmesi amacıyla partiküller saf asetonitril içerisinde çözünmüş ve partikül içerisine hapsedilen melatoninin konsantrasyonu NanoDrop 1000 Spectrophotometer (Thermo Scientific, ABD) cihazı kullanılarak 279 nm dalga boyunda spektrofotometrik olarak tayin edilmiştir. Enkapsülasyon veriminin belirlenebilmesi için öncelikle farklı miktarlardaki melatonin saf asetonitril içerisinde çözünmüş ve absorbans değerleri NanoDrop cihazı ile 279 nm’de belirlenmiştir. Şekil 4.4’te enkapsülasyon veriminin hesabında kullanılan kalibrasyon grafiği verilmiştir.



Şekil 4.4. Melatoninin enkapsülasyon verimi hesabında kullanılan kalibrasyon grafiği.

Üretilen PLGA nano/mikropartiküllerin enkapsülasyon verim yüzdeleri ve partiküllere yüklenen melatonin miktarları Çizelge 4.2’de verilmiştir. PLGA nano-10 için, sulu faza hiç melatonin eklenmediği durumda enkapsülasyon veriminin oldukça düşük olduğu belirlenmiştir (~%1). Sulu faza %0.1 (w/v) oranında melatonin eklenmesinin de enkapsülasyon verimini belirgin derecede arttırmadığı gözlenmiş (~%3) ve bu nedenle sulu faza eklenen melatonin miktarının iki katına çıkarılmasına karar verilmiştir. Melatoninin sulu faza %0.2 (w/v) oranında eklendiği durumda, PLGA nanopartiküllerin enkapsülasyon verimi hiç melatonin eklenmeyen duruma göre yaklaşık 10 kat artmıştır. Melatonin amfifilik yapıya sahip bir molekül olduğundan [144] suda da bir miktar çözünmekte ve dolayısıyla partikül oluşumu sırasında sulu faza difüzlenme eğilimi göstermektedir. Bu durumu önlemek amacıyla, sulu faza %0.2 (w/v) oranında melatonin eklenmesi ile organik fazda bulunan melatoninin partikül üretimi sırasında sulu faza difüzyonu bir miktar engellenmiştir. Dolayısıyla PLGA nanopartiküllerin enkapsülasyon verimi artmıştır.

Çizelge 4.2. Melatonin yüklü PLGA nano/mikropartiküllerin enkapsülasyon verim değerleri (n=3).

PLGA nano/mikropartiküller	% Melatonin		Enkapsülasyon verimi (%)	Yüklenen miktar (μg melatonin/mg partikül)
	organik faz	sulu faz		
PLGA nano-10	10	0.0	1.7 ± 0.7	$1.7. \pm 0.4$
	10	0.1	3.2 ± 1.5	3.2 ± 1.2
	10	0.2	14.2 ± 3.1	14.2 ± 3.2
PLGA nano-20	20	0.2	10.3 ± 4.4	20.4 ± 2.1
PLGA mikro-10	10	0.2	27.2 ± 2.8	27.2 ± 5.6
PLGA mikro-20	20	0.2	17.3 ± 3.4	34.0 ± 4.3

Musumeci ve ark.'nın [145] yaptıkları çalışmada polimere göre oranı %5 (w/w) olacak şekilde melatonin eklenerek çözücü yer değiştirme yöntemi ile PLGA nanopartikülleri üretilmiş ancak oldukça düşük enkapsülasyon verim değerleri elde edilmiştir (~%5). Bu nedenle, amfifilik bir polimer olan polietilen glikol (PEG) kullanılarak PLGA-PEG nanopartikülleri üretilmiş ve enkapsülasyon verimi artırılmıştır (~%25). Sonuç olarak, tez çalışmasında elde edilen düşük enkapsülasyon verim değerleri literatür ile uyumludur ve sadece sulu fazın melatonin konsantrasyonunu arttırmak gibi basit bir yöntemle enkapsülasyon verim değeri iyileştirilebilmiştir.

PLGA nano-10 ve PLGA nano-20 partiküllerinin enkapsülasyon verim değerleri sırasıyla, %14.2 ve %10.3 olarak belirlenmiştir. PLGA mikro-10 ve PLGA mikro-20'nin enkapsülasyon verimleri ise, sırasıyla %27.2 ve %17.3 olarak hesaplanmıştır. PLGA nano/mikropartiküllerin üretiminde organik faza eklenen melatonin miktarının artmasıyla enkapsülasyon veriminin azaldığı, buna karşın mg partikül başına düşen toplam melatonin miktarının arttığı görülmektedir. Musumeci ve ark.'nın [145] yaptıkları çalışmada da organik faza eklenen melatonin miktarı arttıkça enkapsülasyon veriminin azaldığı görülmüştür. Dolayısıyla elde edilen sonuçlar literatürle uyumludur.

Nanopartiküllerle kıyaslandığında mikropartiküllerin enkapsülasyon verimi, stabilizör olan PVA ve organik çözücü olan diklorometanın sinerjik etkisinden dolayı yaklaşık iki kat kadar artış göstermiştir. Sahana ve ark. [143], organik çözücünün özelliklerinin enkapsülasyon verimi üzerindeki etkisini incelemek amacıyla emülsiyon oluşturma/çözücü buharlaştırma yöntemi ile estradiol yüklü PLGA nanopartikülleri üretmişler ve çözücü olarak diklorometan kullanıldığında, etil asetat göre çok daha yüksek enkapsülasyon verim değerlerine ulaşmışlardır. Çünkü nanopartikül oluşumu sırasında polimerin katılaşarak çökme hızı ilaç enkapsülasyonunu etkileyen önemli bir parametredir [146]. Etil asetatın buhar basıncı

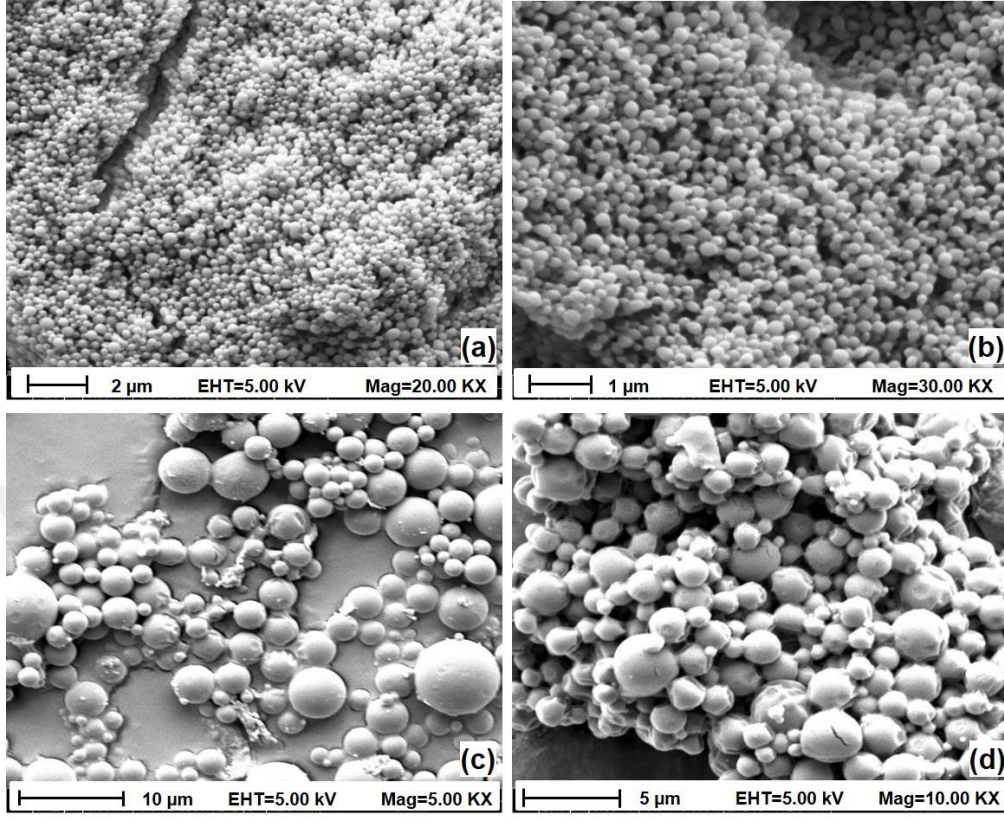
diklorometanın buhar basıncından çok daha düşük olduğundan, organik faz daha yavaş bir şekilde partikülleri içeren süspansiyondan uzaklaşmakta ve dolayısıyla ilacın sulu faza difüzlenme ihtimali artacağından enkapsülasyon verimi azalmaktadır. Diklorometanın sudaki çözünürlüğü etil asetata göre az olmasına rağmen buhar basıncı çok daha yüksek olduğundan hızlı bir şekilde partikülleri içeren süspansiyondan uzaklaşmakta ve böylece partiküller ortamdaki ilacın sulu faza difüzlenmesine fazla fırsat vermeden katılarak çökmektedirler [143]. Bu durum da enkapsülasyon verimini arttırmaktadır. Cooper ve ark.'nın [147] yaptığı çalışmada diklofenak yüklü PLGA nanopartikülleri emülsiyon oluşturma/çözücü buharlaştırma yöntemi ile üretilmiştir. Bu çalışmada DMAB ve PVA'nın nanopartikül özellikleri üzerine etkisi incelenmiş ve stabilizör olarak PVA kullanıldığı durumda daha yüksek enkapsülasyon verimine ulaşılmıştır. Sahana ve ark.'nın [143] yaptığı çalışmada ise estradiol yüklü PLGA nanopartiküller yine aynı yöntemle üretilmiş ve PVA'nın stabilizör olarak kullanıldığı koşulda daha yüksek enkapsülasyon verimi elde edilmiştir. Bu durum da estradiolün PVA çözeltisi içerisindeki çözünürlüğünün DMAB çözeltisi içerisinede göre daha düşük olmasına bağlanmıştır.

Sonuç olarak, literatürdeki çalışmalar da göz önünde bulundurulduğunda, organik çözücünün fiziksel özelliklerinin yanı sıra, emülsiyon oluşturma/çözücü buharlaştırma yöntemi ile partikül üretiminde kullanılan stabilizör çeşidinin de enkapsülasyon verimini etkileyen oldukça önemli bir parametre olduğu belirlenmiştir. Her ne kadar nanopartiküllerin yüzey alanı mikropartiküllerden fazla olsa da, tez çalışmasında melatonin yüklü PLGA mikropartiküllerin üretiminde organik faz olarak diklorometanın, stabilizör olarak da PVA'nın kullanılmasının enkapsülasyon verimi üzerinde belirleyici olduğu ve dolayısıyla PLGA mikropartiküllerin enkapsülasyon veriminin PLGA nanopartiküllerinkinden çok daha yüksek olduğu görülmüştür.

4.1.2.2. SEM analizi

Üretilen melatonin yüklü PLGA nano/mikropartiküllerin boyutlarının ve morfolojik özelliklerinin belirlenmesi amacıyla SEM görüntüleri çekilmiştir (Şekil 4.5). Boş PLGA nanopartiküllerde olduğu gibi (Şekil 4.2-c,d), melatonin yüklü nanopartiküllerin de küresel bir morfolojiye sahip oldukları ve yüzeylerinde herhangi bir pürüzün yer almadığı görülmektedir (Şekil 4.5-a,b). Melatonin yüklü PLGA nanopartiküllerin ortalama çap ve çoklu dağılım endeks (PDI) değerleri sırasıyla, 238.6 ± 69.5 nm ve 0.098 ± 0.012 olarak belirlenmiştir. Yapıya melatonin katılmasının nanopartikül morfolojisi üzerinde belirgin bir etkiye neden olmadığı ve ortalama partikül çapının boş PLGA nanopartiküllere (212.9 ± 65.6

nm) göre biraz daha arttığı görülmüştür. Ayrıca, boş PLGA nanopartiküllerde olduğu gibi, melatonin yüklü PLGA nanopartiküllerin de eş boyut dağılımına sahip olduğu belirlenmiştir.



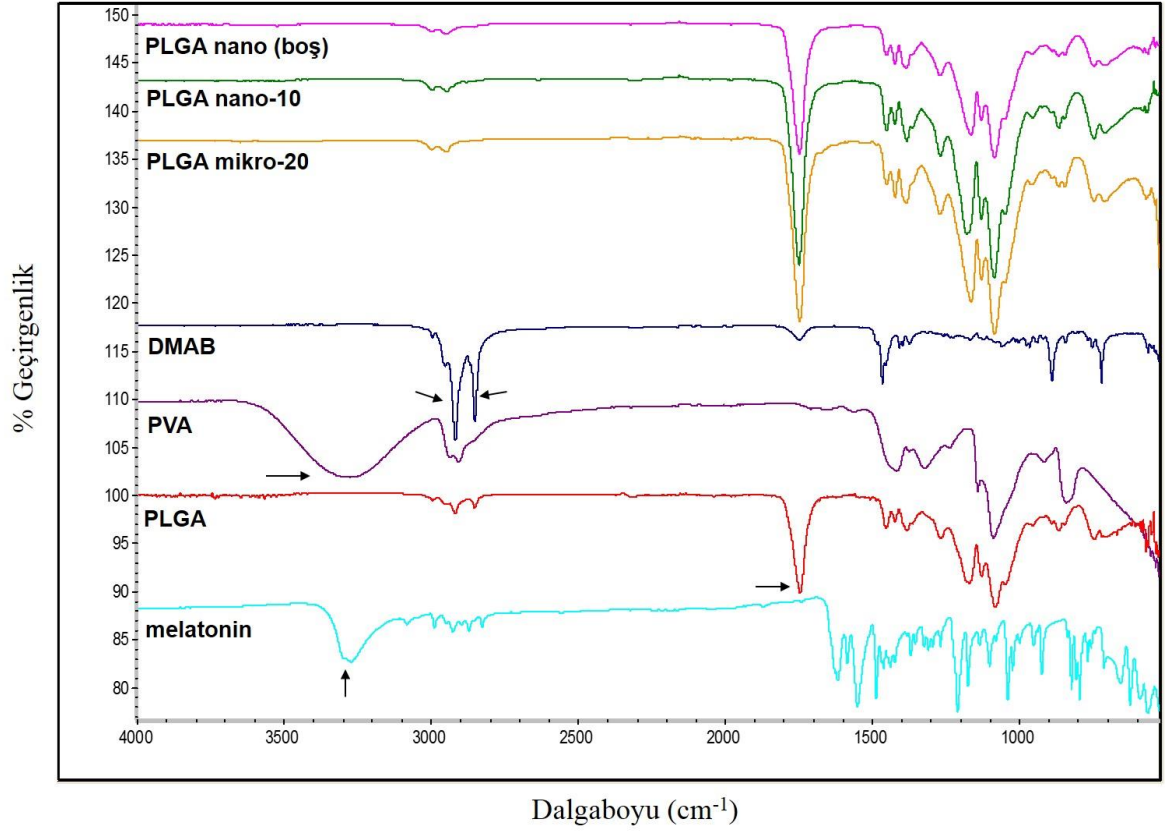
Şekil 4.5. Ağırlıkça %10 melatonin yüklü PLGA nanopartiküllerin farklı büyütmelerdeki SEM görüntüleri: (a) 20,000 X ve (b) 30,000 X; ağırlıkça %20 melatonin yüklü PLGA mikropartiküllerin farklı büyütmelerdeki SEM görüntüleri: (c) 5,000 X ve (d) 10,000 X.

Melatonin yüklü PLGA mikropartiküllerin (Şekil 4.5-c,d), boş PLGA mikropartikülleri (Şekil 4.3-a,b) gibi küresel morfolojide oldukları ve boyut dağılımlarının nanopartiküllerdeki gibi homojen olmadığı belirlenmiştir. Boş PLGA mikropartiküllerden farklı olarak, melatonin yüklü PLGA mikropartiküllerin yüzeyinde bazı kırıklar olduğu görülmüştür. SEM görüntüleri Image J programı (NIH, Bethesda, MD, ABD) ile değerlendirilmiştir. Melatonin yüklü PLGA mikropartiküllerin ortalama çap değeri $3.67 \pm 1.64 \mu\text{m}$ olarak belirlenmiş ve boş PLGA mikropartiküllerin ortalama çap değeri ($3.21 \pm 1.03 \mu\text{m}$) ile kıyaslandığında, yapıya melatonin katılması sonucu partikül boyutunun bir miktar arttığı görülmüştür.

4.1.2.3. ATR-FTIR analizi

Üretilen PLGA nano/mikropartiküllerin hem kimyasal yapılarının incelenmesi hem de stabilizör olarak kullanılan DMAB ve PVA'nın üretim sonrası partiküllerden uzaklaştırılıp uzaklaştırılamadığının belirlenmesi amacıyla ATR-FTIR analizi gerçekleştirilmiştir. PLGA

kopolimerine, bu kopolimerle hazırlanmış boş ve melatonin yüklü PLGA nanopartiküllere, melatonin yüklü PLGA mikropartiküllere, saf DMAB'ye, saf PVA'ya ve saf melatonine ait spektrumlar Şekil 4.6'da verilmiştir.



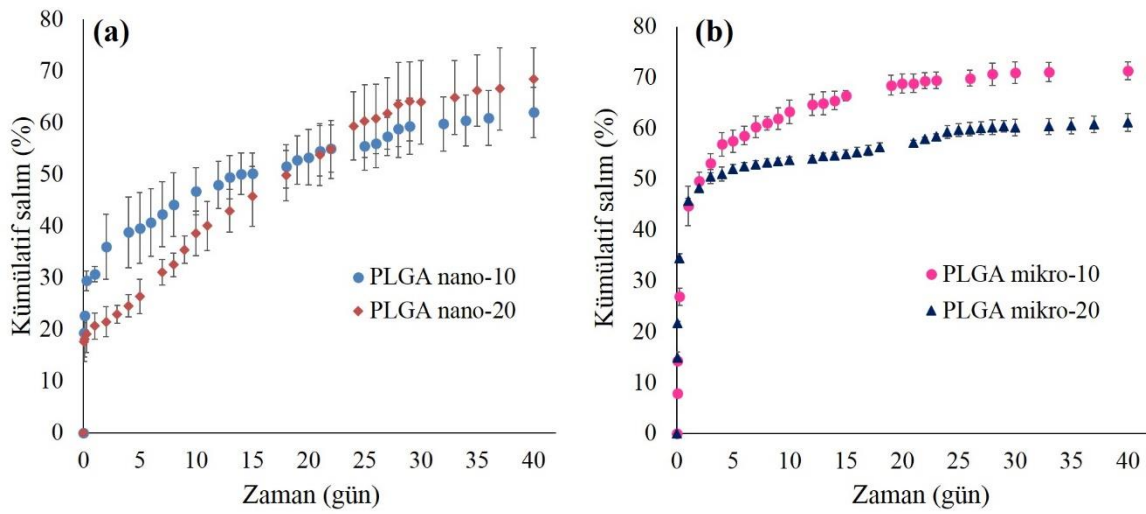
Şekil 4.6. PLGA nano/mikropartikül üretiminde kullanılan bileşenlere ve PLGA nano/mikropartiküllere ait ATR-FTIR spektrumları.

PLGA kopolimerine özgü 1760 cm^{-1} dalga boyundaki C=O gerilmesine ait pikin [148], hem boş PLGA nanopartiküllere hem de melatonin yüklü PLGA nano/mikropartiküllere ait spektrumda olduğu, dolayısıyla polimerin partikül formuna gelirken kimyasal yapısında herhangi bir değişimin olmadığı görülmüştür. Saf DMAB'ye ait $2835\text{-}2940\text{ cm}^{-1}$ dalga boyundaki alifatik C-H piklerinin [149], üretilen nanopartiküllere ait spektrumlarda yer almadığı gözlenmiş ve böylece PLGA nanopartiküllerin üretim sonrasında gerçekleştirilen yıkama işlemi ile DMAB'nin nanopartiküllerden tamamen uzaklaştırıldığı belirlenmiştir. Saf melatoninin 3305 cm^{-1} 'deki NH_2 gerilmesine ait pike, melatonin yüklü PLGA nano/mikropartiküllerin spektrumunda rastlanmamıştır. Bu durumun eklenen melatoninin polimere göre oranının düşük olmasından kaynaklandığı düşünülmüştür. PVA'ya ait 3270 cm^{-1} dalga boyunda görülen O-H gruplarına ait karakteristik piklerin [150], melatonin yüklü PLGA mikropartiküllere ait spektrumlarda yer almadığı gözlenmiş ve böylece üretim

sonrasında gerçekleştirilen yıkama ile PVA'nın partiküllerden tamamen uzaklaştırıldığı belirlenmiştir.

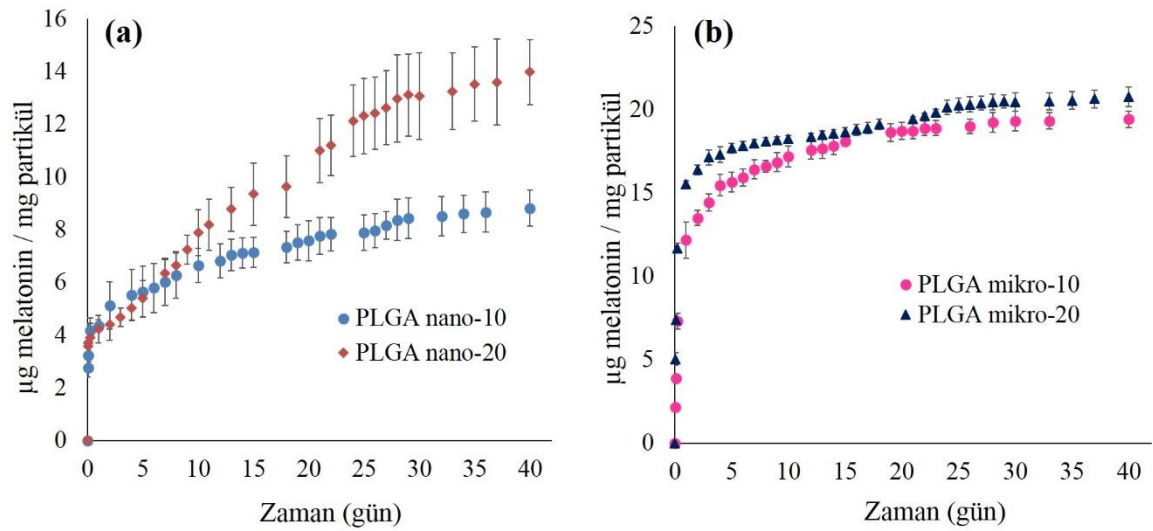
4.1.2.4. *In vitro* melatonin salımı ve salım kinetiğinin matematiksel analizi

In vitro melatonin salım çalışmaları PLGA nano-10, PLGA nano-20, PLGA mikro-10 ve PLGA mikro-20 partikülleri kullanılarak 40 gün boyunca 3 paralel örnek ile gerçekleştirilmiştir. PLGA nano/mikropartiküllerden yüzde kümülatif melatonin salım davranışlarını ve mg partikül başına salınan melatonin miktarlarını gösteren grafikler, sırasıyla, Şekil 4.7 ve Şekil 4.8'de verilmiştir. Ayrıca, PLGA nano/mikropartiküllerden farklı sürelerde partikül başına salınan melatonin miktarları Çizelge 4.3'te sunulmuştur.



Şekil 4.7. (a) PLGA nanopartiküllerden ve (b) PLGA mikropartiküllerden kümülatif yüzde melatonin salımı.

Melatoninin PLGA nano-10 ve PLGA nano-20'den sırasıyla, %30 ve %20'sinin ilk 24 sa içerisinde ani patlama etkisi (burst effect) ile salındığı belirlenmiştir. Ani patlama etkisi ile salım, partikül yüzeyine elektrostatik etkileşimlerle bağlanan biyoaktif ajanın salım ortamında partikül yapısından uzaklaşması sonucu gerçekleşmektedir. Kırk günlük salım çalışmaları sonunda ise partiküllerin içerisinde bulunan melatoninin yaklaşık %65'inin difüzyon mekanizması ile kontrollü bir şekilde salındığı görülmüştür (Şekil 4.7-a). PLGA nanopartiküllerden salınan toplam melatonin miktarı, mg partikül başına PLGA nano-10 ve PLGA nano-20 için sırasıyla, yaklaşık 9 µg ve 14 µg olarak hesaplanmıştır (Şekil 4.8-a).



Şekil 4.8. a) PLGA nanopartiküllerden, b) PLGA mikropartiküllerden kümülatif salınan melatonin miktarı.

PLGA mikropartiküllerde ise nanopartiküllere kıyasla çok daha yüksek bir ani patlama etkisinin ardından melatoninin kontrollü salımı gözlenmiştir (Şekil 4.7-b). İlk 24 sa içerisinde PLGA mikro-10 ve PLGA mikro-20 partikülleri tarafından enkapsüle edilen melatoninin sırasıyla, yaklaşık %27 ve %35'i ani patlama etkisi ile ortama salınmıştır. Yüksek miktarda ani patlama etkisi ile salım, mikropartikül yüzeyinde bulunan melatonin moleküllerinin nanopartiküllere göre çok daha fazla olması ile açıklanabilir. Kırk günlük salım süresinin sonunda PLGA mikro-10 ve PLGA mikro-20 partiküllerinden difüzyon mekanizması ile salınan melatoninin sırasıyla, yaklaşık %70 ve %60 olduğu belirlenmiştir. Mikropartiküllerden salınan toplam melatonin miktarı mg partikül başına PLGA mikro-10 ve PLGA mikro-20 için sırasıyla yaklaşık 19 µg ve 21 µg olarak hesaplanmıştır (Şekil 4.8-b).

Çizelge 4.3. PLGA nano/mikropartiküllerden salınan kümülatif melatonin miktarları.

Salınan miktarlar (µg melatonin/mg partikül)						
Partiküller	1. sa	1. gün	5. gün	10. gün	20. gün	40. gün
PLGA nano-10	2.76 ± 0.34	4.37 ± 0.21	5.65 ± 0.97	6.66 ± 0.64	7.59 ± 0.77	8.83 ± 0.69
PLGA nano-20	3.60 ± 0.76	4.23 ± 0.53	5.40 ± 0.69	7.90 ± 0.88	11.00 ± 1.22	13.99 ± 1.23
PLGA mikro-10	2.17 ± 0.10	12.18 ± 1.07	15.64 ± 0.59	17.20 ± 0.62	18.71 ± 0.51	19.41 ± 0.48
PLGA mikro-20	5.05 ± 0.39	15.55 ± 0.17	17.68 ± 0.29	18.25 ± 0.21	19.42 ± 0.15	20.77 ± 0.59

PLGA mikropartiküllerden beşinci güne kadar salınan kümülatif melatonin yüzdesi PLGA mikro-10 ve PLGA mikro-20 için hemen hemen aynı olmasına rağmen, salımın beşinci gününden itibaren bir fark meydana gelmiştir (Şekil 4.7-b). PLGA mikro-20 içerisine hapsedilen melatonin miktarı PLGA nano-10 içerisine hapsedilenden daha fazla olduğundan, melatonin moleküllerinin bir araya gelmesi sonucu moleküller arası etkileşim artmış ve dolayısıyla difüzyon kısıtlanmıştır. Bu nedenle PLGA mikro-20 partiküllerden daha az yüzde ile melatonin salımı gerçekleşmiştir. Ayrıca, farklı miktarlarda enkapsüle edilen melatonin, partiküllerin mikroyapısını değiştirmiş olabileceğinden farklı difüzyon hızlarının gözlenmiş olabileceği de düşünülmüştür [139].

Literatürde farklı ilaçlar ve polimerler kullanıldığında mikropartiküllerden ilaç salım hızının ilaç yükleme miktarı ile değişiklik gösterdiğine dair çeşitli sonuçlar bulunmaktadır. Budhian ve ark.'nın [151] yaptığı çalışmada hidrofobik bir ilaç olan haloperidol yüklü PLGA nanopartikülleri üretilmiş ve yüklenen ilaç miktarı arttıkça ani patlama etkisi ile salınan ilaç miktarının azaldığı belirlenmiştir. Bu durumun ilaç miktarının artmasına bağlı olarak ilacın partikül içerisinde daha düzensiz bir şekilde dağılmasından dolayı gerçekleştiği düşünülmüştür. Farklı ilaçlar kullanılarak üretilen çeşitli nano/mikropartiküler sistemlerde de benzer sonuçlar elde edilmiştir [152, 153]. Sonuç olarak, tez çalışmasında elde edilen salım davranışlarının literatür ile uyumlu olduğu görülmüştür.

Kırk günlük salım süresi sonunda PLGA nano/mikropartikülleri tarafından enkapsüle edilen melatoninin yaklaşık olarak %70'inin difüzyon mekanizması ile salındığı belirlenmiştir. Geri kalan melatoninin de polimerin tamamen bozunmasının ardından salınacağı düşünülmektedir. Bunun haricinde, nanopartiküllerin yüzey alanı mikropartiküllere göre daha yüksek olduğundan nanopartiküllerden ani patlama etkisi ile salınan melatoninin mikropartiküllere göre daha yüksek olması beklenirken tam tersi bir durum görülmüştür. Şekil 4.5-c,d'de verilmiş olan PLGA mikropartiküllere ait SEM görüntülerinde, mikropartikül yüzeyinde bazı kırıkların olduğu belirlenmişti. Dolayısıyla ani patlama etkisi ile salınan melatoninin nanopartiküllere oranla mikropartiküllerde çok daha fazla olması mikropartikül yüzeyinde bulunan bu kırıklarla açıklanabileceği gibi, mikropartikül duvarının nanopartiküllere göre daha ince olma ihtimalinden kaynaklanmış olması da söz konusudur. Hua ve ark.'nın [154] yaptıkları çalışmada ortalama çap değerleri 221 nm ve 1.5 µm olan siprofloksazin yüklü PLGA nano/mikropartikülleri üretilmiştir. Üretilen bu nanopartiküllerin teorik yüzey alanının mikropartiküllere göre 7 kat daha fazla olduğu, dolayısıyla ilacın nanopartiküllerden çok daha hızlı bir şekilde salınacağını belirtmişlerdir.

Ancak *in vitro* salım çalışmaları sonucunda salınan siprofloksazin yüzdesinin, PLGA nano ve mikropartiküllerde bariz şekilde farklı olmadığı görülmüştür. Bu durumun PLGA nano/mikropartiküllerin morfolojik incelemeleri sonucunda belirlenen mikropartikül yüzeyindeki kırıklardan kaynaklanmış olabileceği açıklanmıştır. Tez çalışmasında da benzer bir durum söz konusudur. Sonuç olarak hem PLGA nanopartiküllerin hem de PLGA mikropartiküllerin melatoninin kontrollü ve uzun dönemli salımı için uygun olduğu belirlenmiştir.

PLGA nano/mikropartiküllerden kümülatif melatonin salım verileri çeşitli ilaç salım modelleri (sıfırıncı derece, birinci derece, Higuchi, Hixson-Crowell, Korsmeyer-Peppas) kullanılarak matematiksel olarak analiz edilmiştir. Elde edilen grafiklerin lineer regresyon katsayıları (R^2) 1'e en yakın olan model, salım kinetiğini ifade eden model olarak belirlenmiştir (Çizelge 4.4).

Çizelge 4.4. PLGA nano/mikropartiküllerden melatonin salım kinetiği ve mekanizması.

Partikül	Sıfırıncı derece		Birinci derece		Higuchi		Hixson-Crowell		Korsmeyer-Peppas		
	R^2	K_0 ($\mu\text{g}\cdot\text{sa}^{-1}$)	R^2	K_1 (sa^{-1})	R^2	K_H ($\mu\text{g}\cdot\text{sa}^{-1/2}$)	R^2	K_{HC} ($\text{sa}^{-1/3}$)	R^2	K (sa^{-n})	n
PLGA nano-10	0.9447	0.0244	0.9107	0.0138	0.9900	0.9774	0.9624	0.0007	0.9817	0.1551	0.2011
PLGA nano-20	0.9514	0.0681	0.8873	0.0304	0.9873	2.6944	0.9769	0.0008	0.9795	0.1597	0.1998
PLGA mikro-10	0.7921	0.0357	0.7571	0.0719	0.9130	1.4468	0.9079	0.0007	0.9067	0.3190	0.1229
PLGA mikro-20	0.9371	0.0276	0.9272	0.0058	0.9697	1.0909	0.9437	0.0005	0.9500	0.3483	0.0815

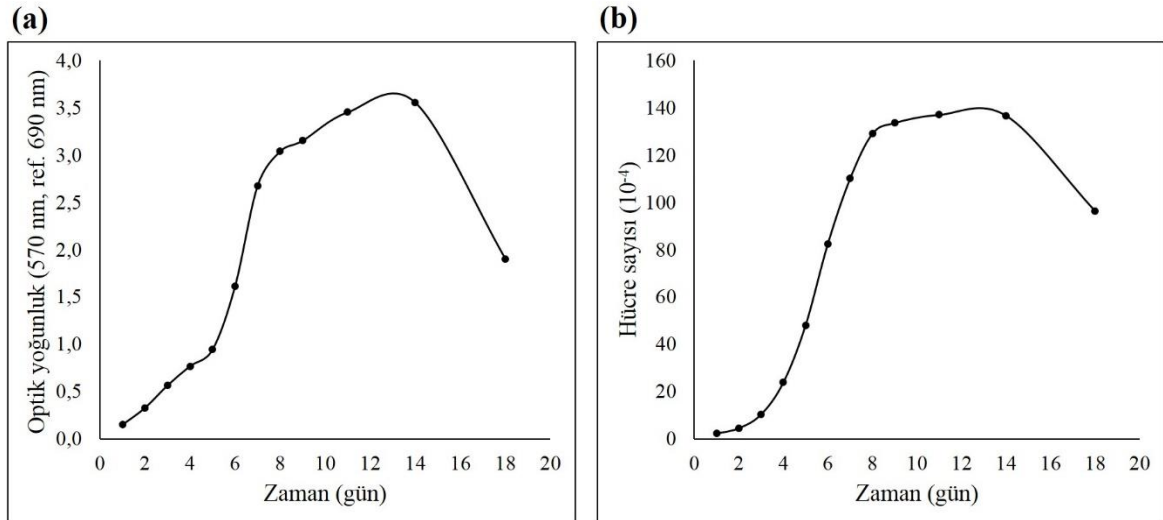
PLGA nano/mikropartiküllerden salım mekanizması pek çok parametreye bağlıdır. Nano/mikropartiküllerde genellikle difüzyon kontrollü bir mekanizma gözlenebileceği gibi, polimerin yapısı, kristalinitesi ve biyobozunurluk özelliği de salım mekanizmasını etkileyen önemli faktörlerdendir. Elde edilen salım verileri sonucunda, hem PLGA nanopartiküllerden hem de PLGA mikropartiküllerden melatonin salım mekanizmasının en çok Higuchi salım modeline uyduğu belirlenmiştir. Dolayısıyla melatoninin PLGA nano/mikropartiküllerden ağırlıklı olarak difüzyon mekanizmasıyla salındığı belirlenmiştir [103]. Korsmeyer-Peppas modeline göre ise n değerinin 0.45'ten küçük olduğu, dolayısıyla difüzyonun Fick yasasına uyduğu söylenebilir.

4.2. MG-63 Hücrelerinin Karakterizasyonu

İnsan osteosarkom hücre hattı olan MG-63 hücreleri, fibroblastik morfolojide, hipotriploid karyotipe sahip ve yüzeye bağımlı olarak üreyen tümör hücreleridir. Bu hücrelerin karakterizasyonu için 18 gün süren *in vitro* hücre kültür çalışmaları gerçekleştirilmiştir. MG-63 hücrelerinin üreme davranışları ve morfolojileri 24 gözlü polistiren kültür kaplarında izlenmiştir. Tümör hücreleri hızlı çoğaldığından başlangıç hücre konsantrasyonu 2×10^4 hücre/cm² olarak belirlenmiş ve gerçekleştirilen tüm karakterizasyon çalışmalarının sonuçları aşağıda detaylı bir şekilde sunulmuştur.

4.2.1. MTT analizi ve hücre sayımı

Hücrelerin inkübasyon süresince MTT analizinden elde edilen optik yoğunluk değerleri (Şekil 4.9-a) ve hemositometrik sayım sonucu hesaplanan hücre sayısı değerlerinin (Şekil 4.9-b) zamana karşı grafikleri çizilmiş ve hücre büyüme eğrisinin gecikme fazı (lag fazı), aktif üreme fazı (log fazı), durgun ve ölüm fazları gösterilmiştir. Şekil 4.9-a ve b’de gösterilen grafiklerin benzer profilde olduğu, dolayısıyla kültürün belirli günlerindeki hücre sayısına karşılık elde edilen MTT değerlerinin birbiriyle uyumlu olduğu belirlenmiştir.



Şekil 4.9. (a) MTT analizi sonucu elde edilen MG-63 hücre üreme grafiği, (b) hemositometrik sayım sonucu elde edilen üreme grafiği.

MG-63 hücreleri tümör hücreleri olduğundan çok yüksek mitokondriyal aktiviteye sahiplerdir. MTT analizi sonucunda da artan zamanla birlikte beklenildiği üzere oldukça yüksek optik yoğunluk değerleri elde edilmiştir (Şekil 4.9-a). Şekil 4.9-b’de yer alan üreme grafiğinde, hücrelerin kültürün 4. gününde üstel üreme fazına (logaritmik faz) girdiği görülmektedir. Hücre üremesi üstel üreme fazındaki hücre üreme hızı ve hücre ikilenme süresi ile karakterize edilmektedir. Üstel üreme fazındaki hücreler için üreme hızı Eşitlik 4.1

ile ifade edilmektedir. Üstel üreme fazındaki hücrelerin ikilenme süresi ise Eşitlik 4.2 kullanılarak hesaplanmıştır.

$$dx/dt=\mu x \quad (\text{Eşitlik 4.1})$$

Burada x , hücre sayısını, μ , özgül üreme hızını ve t de zamanı ifade etmektedir. Bu eşitlik düzenlendiğinde;

$$\ln x=\mu t \quad (\text{Eşitlik 4.2})$$

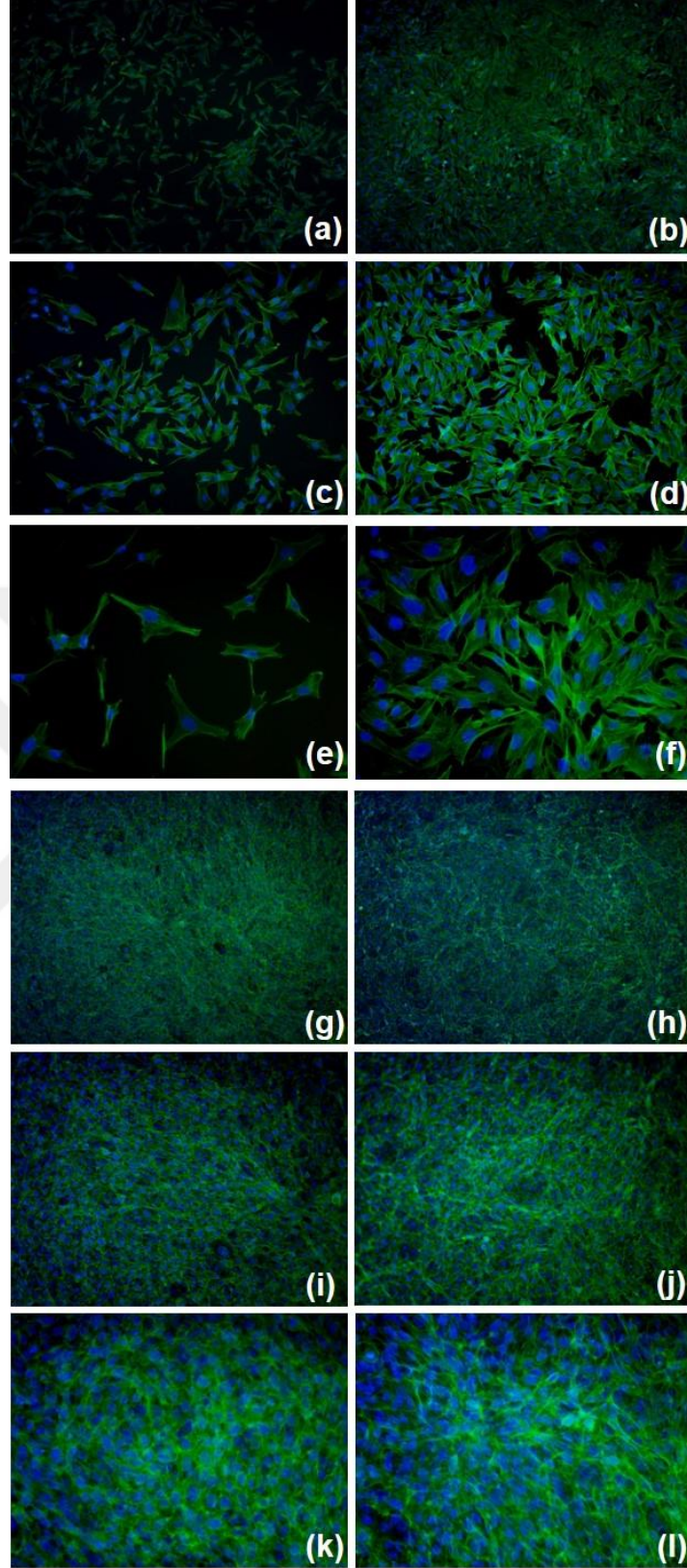
ifadesine dönüşmektedir. Hücrelerin ikilenme süresinin (t_d) hesaplanması için ise Eşitlik 4.3 kullanılmıştır.

$$t_d=\ln(2)/\mu \quad (\text{Eşitlik 4.3})$$

Eşitlik 4.2'den anlaşılabacağı üzere $\ln x$ 'e karşılık zaman (t) grafiği çizildiğinde, grafiğin eğimi hücrelerin özgül üreme hızını (μ) vermektedir. Çalışmada kullanılan MG-63 hücrelerinin özgül üreme hızı 0.026 sa^{-1} , ikilenme süresi ise 27 sa olarak hesaplanmıştır. Literatürdeki çalışmalar incelendiğinde MG-63 hücrelerinin ikilenme süresinin 24-30 sa civarında olduğu belirtilmiştir, dolayısıyla yapılan karakterizasyon çalışmaları sonucu elde edilen ikilenme süresinin literatürde belirtilen aralıkta olduğu görülmüştür [155, 156].

4.2.2. Floresan mikroskobu ile analiz

Alexa Fluor 488 phalloidin ve DAPI ile yapılan ikili boyama sonucunda floresan mikroskobu ile çekilen görüntülerde hücre çekirdeği mavi, aktin filamentler ise yeşil olarak görülmektedir. Şekil 4.10'da kültürün 2., 4., 7. ve 14. günlerine ait farklı büyütmelelerdeki hücrelerin floresan mikroskop görüntüleri verilmiştir.

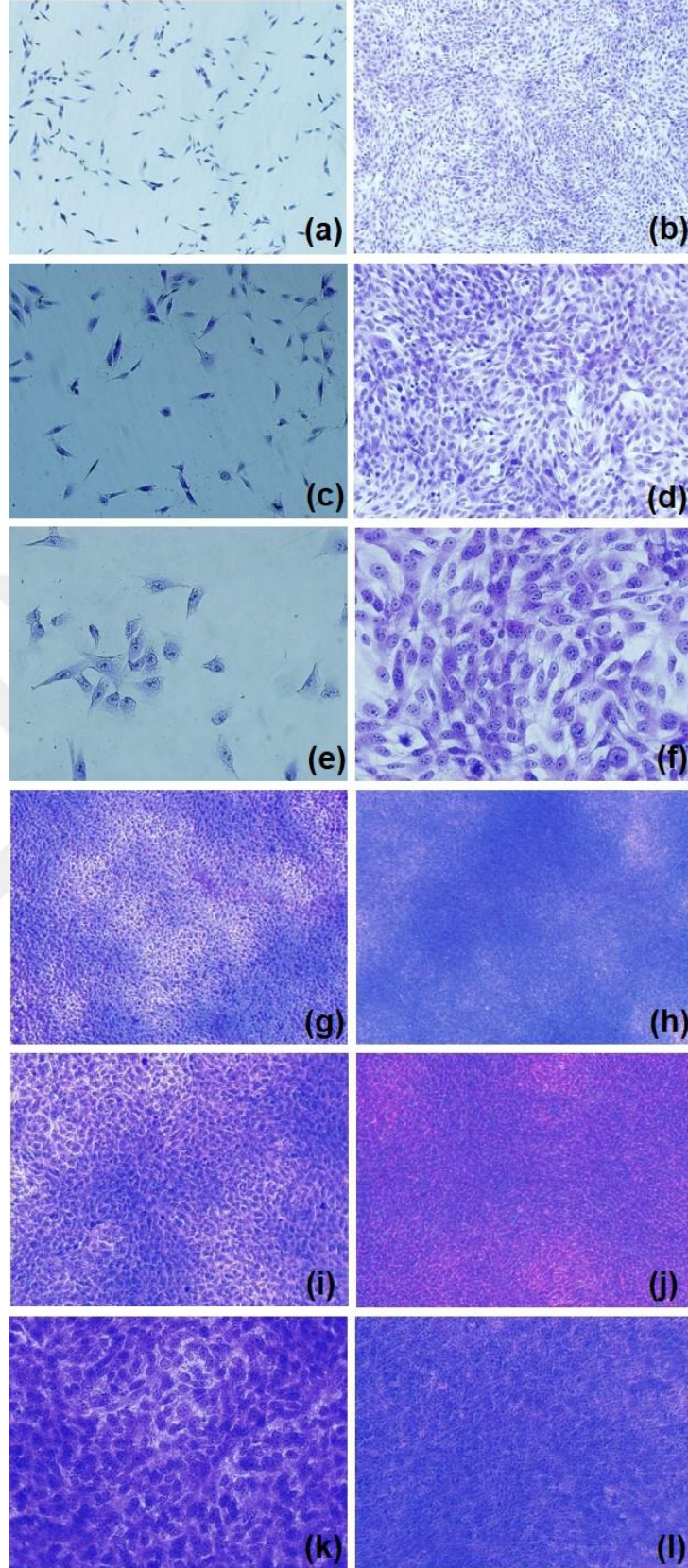


Şekil 4.10. MG-63 hücrelerinin floresan mikroskop görüntüleri: (a) 2. gün (10 X), (b) 4. gün (10 X), (c) 2. gün (20 X), (d) 4. gün (20 X), (e) 2. gün (40 X), (f) 4. gün (40 X), (g) 7. gün (10 X), (h) 14. gün (10 X), (i) 7. gün (20 X), (j) 14. gün (20 X), (k) 7. gün (40 X), (l) 14. gün (40 X). (Fotoğraflardaki mavi renk hücre çekirdeklerini, yeşil renk ise hücre iskeletlerini göstermektedir).

Tümör hücreleri çok çekirdekli bir yapıya sahip olduklarından ortamdaki hücre konsantrasyonu arttıkça çekirdek sayısı da artmakta ve dolayısıyla boyama sonrası görüntü alınırken kültürün ilerleyen günlerinde çekirdeği boyayan DAPI sinyalinin güçlendiği görülmektedir (Şekil 4.10-a-f). Bu duruma karşılık, hücre iskeleti yapıları olan aktin filamentleri daha az görülebilmekte ve buna bağlı olarak kültür süresi uzadıkça Alexa Fluor sinyalinin azaldığı gözlenmektedir. Ayrıca, kültür süresi arttıkça hücrelerin çok hızlı bir şekilde ürediği ve kültürün 7. gününden itibaren kültür kabının tüm yüzeyini kapladıkları görülmektedir (Şekil 4.10-g-l).

4.2.3. Optik mikroskop ile analiz

Karakterizasyon çalışmaları sırasında kültürün 1., 5., 9. ve 16. günlerindeki kristal viyole ile boyanan MG-63 hücrelerine ait farklı büyütmelerdeki görüntüleri Şekil 4.11’de verilmiştir. Elde edilen görüntülerde hücrelerin fibroblast benzeri bir morfolojiye sahip oldukları ve hücre çekirdeklerinin hücre sitoplazmasına göre daha koyu boyandığı görülmektedir. Ayrıca, hücrelerin kısa sürede yüzeye tutunduğu ve çoğalmaya başladığı tespit edilmiş; aynı zamanda çok çekirdekli bir yapıya sahip oldukları ve yer yer uzantılarının olduğu gözlenmiştir. Kültürün 16. gününde ise artık hücrelerin kültür kabını tamamen kaplayıp üremesinden dolayı hücre çekirdeği ve iskeletinin ayırt edilemeyecek şekilde boyandığı belirlenmiştir.



Şekil 4.11. Kristal viyole ile boyanan MG-63 hücreleri (a) 1. gün (10 X), (b) 5. gün (10 X), (c) 1. gün (20 X), (d) 5. gün (20 X), (e) 1. gün (40 X), (f) 5. gün (40 X), (g) 9. gün (10 X), (h) 16. gün (10 X), (i) 9. gün (20 X), (j) 16. gün (20 X), (k) 9. gün (40 X), (l) 16. gün (40 X).

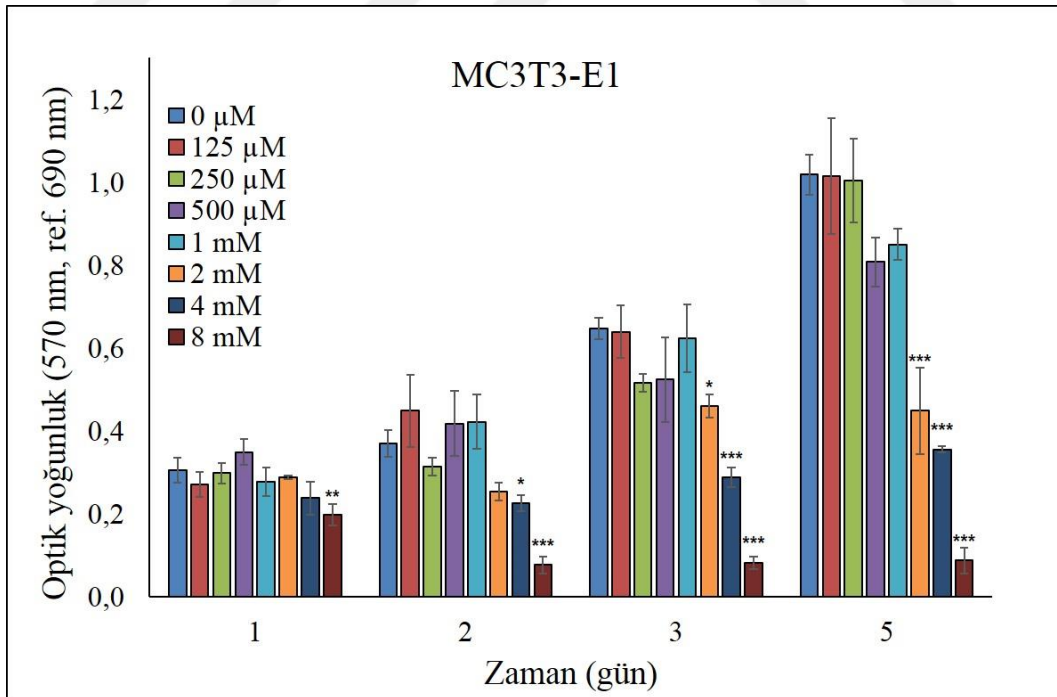
4.3. Toksisite Çalışmaları

Toksisite çalışmalarında MG-63 insan osteosarkom hücreleri ve preosteoblastik MC3T3-E1 hücreleri kullanılmıştır. Daha önce grubumuz tarafından gerçekleştirilen karakterizasyon çalışmaları sonucunda, MC3T3-E1 hücrelerinin fibroblastik morfolojide olduğu belirlenmiştir. Hücrelerin özgül üreme hızı ve ikilenme süresi ise sırasıyla, 0.019 sa^{-1} ve 36 sa olarak hesaplanmıştır [157].

4.3.1. Melatonin farklı konsantrasyonlarının MG-63 ve MC3T3-E1 hücrelerinin canlılığı üzerindeki etkisinin incelenmesi

MC3T3-E1 hücreleri fare kafatasından elde edilmiştir ve yüzeye bağımlı olarak üreme davranışı göstermektedir. Melatoninin normal hücre ve kanser hücreleri üzerindeki etkisini incelemek amacıyla sırasıyla, preosteoblastik MC3T3-E1 hücreleri ve MG-63 insan osteosarkom hücreleri kullanılmıştır. Farklı konsantrasyonlardaki melatoninin (0-8 mM) MC3T3-E1 ve MG-63 proliferasyonu üzerindeki etkisini incelemek amacıyla 5 gün süren *in vitro* hücre kültür çalışmaları gerçekleştirilmiştir.

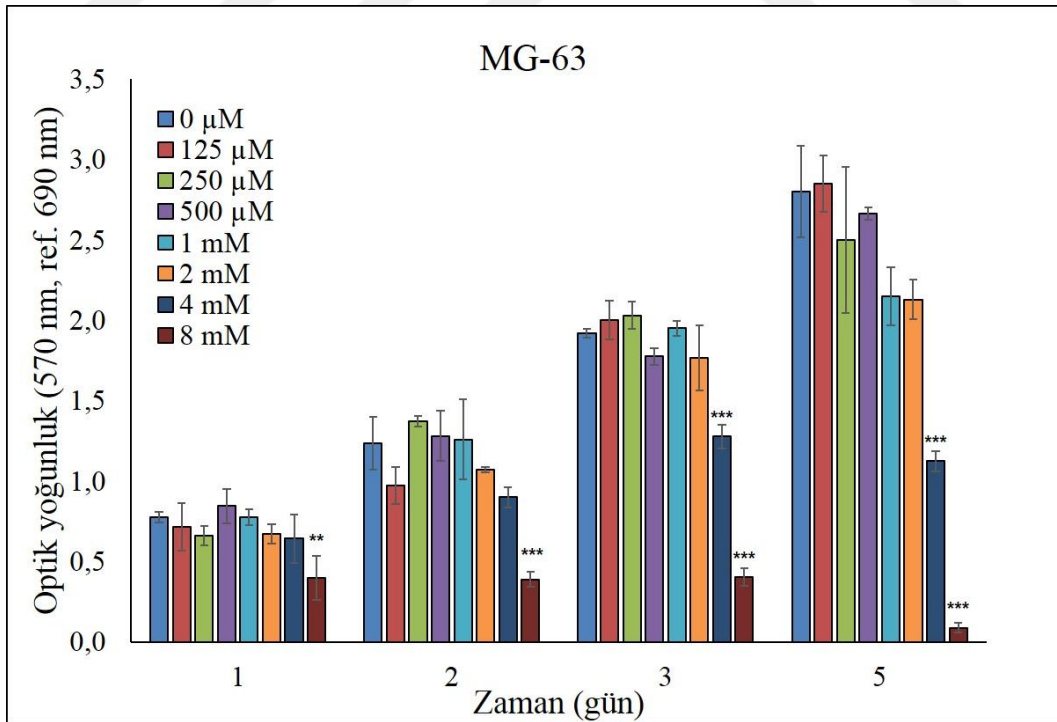
MTT analizi ile belirlenen hücre canlılığı değerleri MC3T3-E1 ve MG-63 hücreleri için sırasıyla, Şekil 4.12 ve Şekil 4.13'te verilmiştir. Melatonin içermeyen (0 μM) kültür ortamı ile etkileştirilen hücreler kontrol grubu olarak kullanılmıştır.



Şekil 4.12. MC3T3-E1 hücrelerinin farklı melatonin miktarlarını içeren kültür ortamlarındaki MTT grafikleri. (İstatistiksel olarak anlamlı farklar: 0 μM melatonin içeren grup kontrol iken: * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$).

Şekil 4.12’de verilen MC3T3-E1 hücrelerine ait MTT değerlerine bakıldığında, kültürün tüm günleri için 0-1 mM melatonin konsantrasyon aralığının hücre canlılığı üzerinde belirgin bir etkisinin olmadığı anlaşılmış ($p>0.05$) ve bu melatonin konsantrasyonları ile etkileşen hücrelerin MTT değerlerinin kültür süresi boyunca arttığı gözlenmiştir. Buna karşın, 8 mM melatonin konsantrasyonunun MC3T3-E1 hücreleri üzerinde toksik etki gösterdiği ve kontrol grubuna göre hücre canlılığını kültürün ilk gününden itibaren istatistiksel olarak anlamlı derecede azalttığı belirlenmiştir ($p<0.001$). Ayrıca, 2 mM melatonin konsantrasyonunun kültürün 3. ve 5. günlerinde hücre canlılığını belirgin bir şekilde azalttığı görülmüştür ($p<0.05$ ve $p<0.001$).

Literatürde farklı melatonin konsantrasyonlarının osteoblastik hücrelerin proliferasyonu üzerindeki etkisini inceleyen çeşitli çalışmalar bulunmaktadır. Bu çalışmaların birinde, 0-250 μM aralığındaki melatonin konsantrasyonlarının MC3T3-E1 hücrelerinin proliferasyonu üzerinde belirgin bir etkisinin olmadığı vurgulanmıştır [57]. Bir başka çalışmada ise 0-1 mM aralığındaki melatonin konsantrasyonlarının insan osteoblast hücreleri olan hFOB hücrelerinin proliferasyonu üzerindeki etkisi incelenmiş ve 0-100 μM konsantrasyon aralığının hücre canlılığı üzerinde belirgin bir etkisinin olmadığı ancak, 1 mM melatonin konsantrasyonunun hücrelerin üremesini yavaşlattığı belirtilmiştir [158].

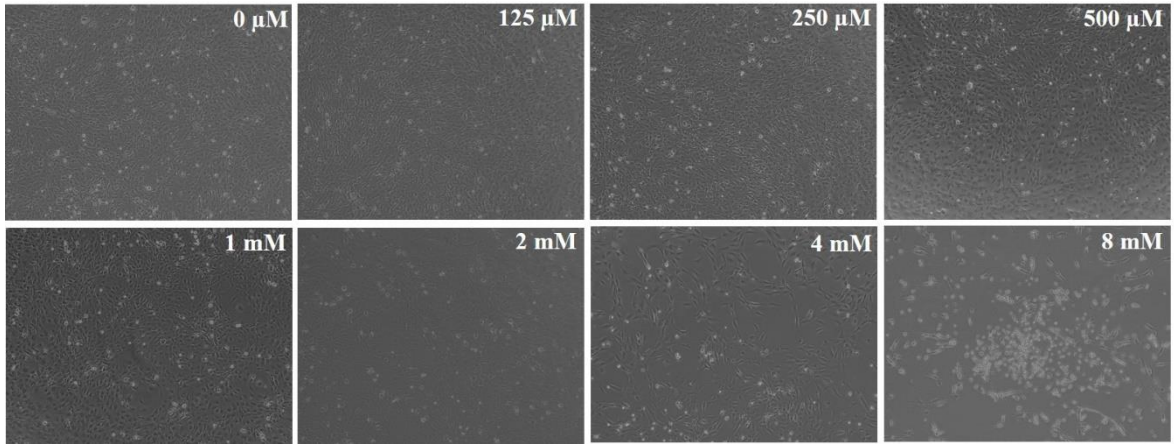


Şekil 4.13. MG-63 hücrelerinin farklı melatonin miktarlarını içeren kültür ortamlarındaki MTT grafikleri. (İstatistiksel olarak anlamlı farklar: 0 μM melatonin içeren grup kontrol iken: * $p<0.05$, ** $p<0.01$, *** $p<0.001$).

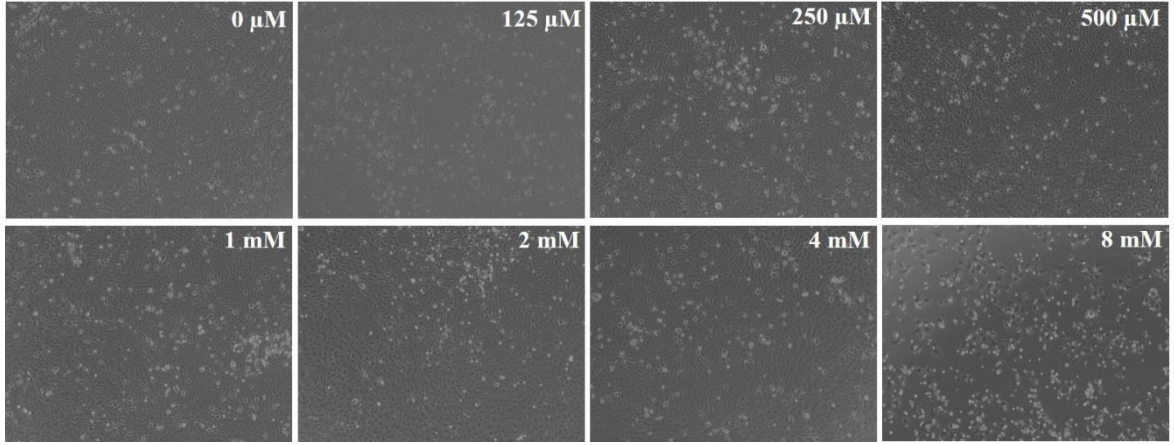
Şekil 4.13'te verilen MG-63 hücrelerinin MTT değerleri incelendiğinde, 0-2 mM konsantrasyon aralığındaki serbest melatoninin kültür süresi boyunca hücre üremesi üzerinde herhangi bir olumsuz etkiye neden olmadığı görülmüştür ($p>0.05$). Aynı zamanda, bu melatonin konsantrasyonları ile etkileşen hücrelerin mitokondriyal aktivitelerinin zamanla arttığı belirlenmiştir. Buna karşılık, kültürün ilk gününden itibaren 8 mM melatonin konsantrasyonunun hücrelerin canlılığını istatistiksel olarak önemli derecede azalttığı ($p<0.001$), kültürün 3. ve 5. günlerinde ise, 4 mM melatonin konsantrasyonu ile etkileşen hücrelerin MTT değerlerinin anlamlı derecede düştüğü görülmüştür ($p<0.001$).

Serbest melatoninin MG-63 hücrelerinin proliferasyonu üzerindeki etkisini inceleyen bir çalışmada, hücreler 0-10 mM konsantrasyon aralığındaki melatonin ile etkileştirilmiştir. 0-4 mM konsantrasyon aralığındaki melatoninin hücreler üzerinde herhangi bir toksik etki göstermediği ancak, 4-10 mM melatonin konsantrasyonunun hücre proliferasyonunu önemli derecede inhibe ettiği belirlenmiştir [91]. Tez çalışmasında elde edilen verilerin literatür ile de uyumlu olduğu görülmüştür.

Farklı melatonin konsantrasyonları ile etkileşen MC3T3-E1 ve MG-63 hücrelerinin morfolojilerinin nasıl etkilendiğinin belirlenmesi amacıyla kültürün 3. gününde çekilen optik mikroskop görüntüleri, sırasıyla Şekil 4.14 ve Şekil 4.15'te verilmiştir.



Şekil 4.14. Melatoninin farklı konsantrasyonları ile etkileşen MC3T3-E1 hücrelerinin kültürün 3. gününe ait optik mikroskop görüntüleri (10 X).



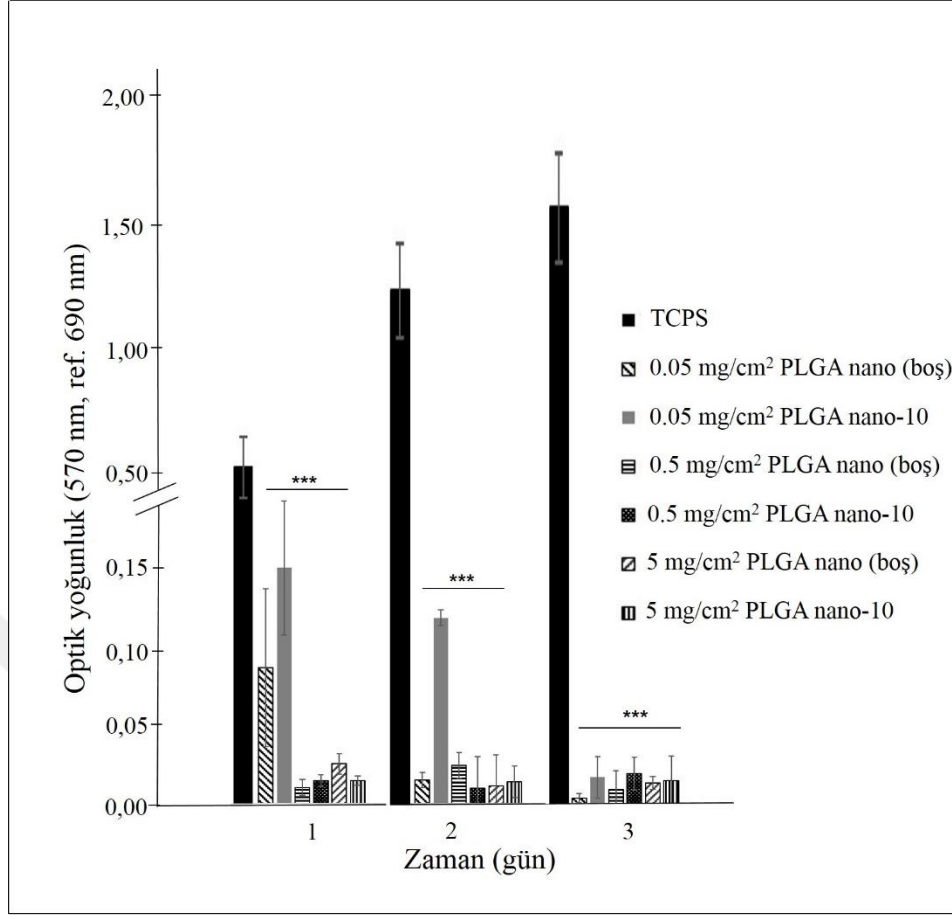
Şekil 4.15. Melatoninin farklı konsantrasyonları ile etkileşen MG-63 hücrelerinin kültürün 3. gününe ait optik mikroskop görüntüleri (10 X).

Hücrelerin optik mikroskop görüntüleri incelendiğinde, MC3T3-E1 hücrelerinin morfolojileri 2 mM melatonin konsantrasyonundan itibaren bozulurken (Şekil 4.14), MG-63 hücrelerinin morfolojilerinin ise 4 mM melatonin konsantrasyonundan itibaren bozulduğu görülmektedir (Şekil 4.15). Ayrıca, her iki hücre tipi için de 8 mM melatonin konsantrasyonunun hücreler üzerinde toksik etki gösterdiği belirlenmiştir. Kültürün 3. gününe ait optik mikroskop görüntüleri elde edilen MTT verileri ile de uyumludur. Sonuç olarak, MG-63 insan osteosarkom hücrelerinin preosteoblastik MC3T3-E1 hücrelerine göre yüksek melatonin konsantrasyonuna karşı biraz daha dirençli oldukları belirlenmiştir. Kanser hücreleri normal hücrelere göre çok daha yüksek çoğalma kapasitesine sahip olduğundan elde edilen sonuçlar anlamlıdır.

4.3.2. Boş ve melatonin yüklü PLGA nano/mikropartiküllerin MG-63 hücreleri ile etkileşimi

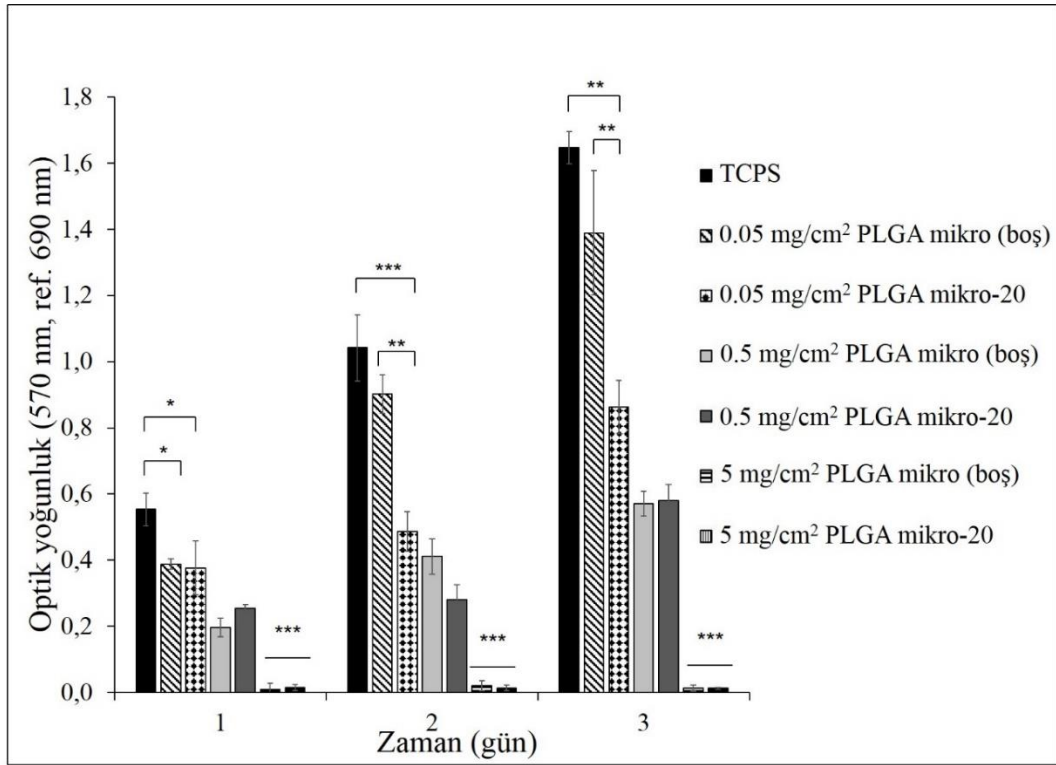
Boş PLGA nano/mikropartiküllerin ve melatonin yüklü nano/mikropartiküllerden salınan melatoninin MG-63 insan osteosarkom hücrelerinin proliferasyonu üzerindeki etkilerini incelemek amacıyla 3 gün süren *in vitro* hücre kültür çalışmaları gerçekleştirilmiştir.

Farklı miktarlardaki (0.05, 0.50 ve 5.00 mg/cm²) PLGA nanopartikülleri ve PLGA mikropartiküllerin MG-63 hücreleri ile etkileştirilmesi sonucu elde edilen MTT sonuçları sırasıyla, Şekil 4.16 ve Şekil 4.17’de verilmiştir. Boş PLGA nano/mikropartiküllerle etkileşen ve TCPS yüzeyinde üreyen hücreler kontrol olarak kullanılmıştır.



Şekil 4.16. Boş ve melatonin yüklü PLGA nanopartikülleri ile etkileştirilen MG-63 hücrelerinin MTT sonuçlarını gösteren grafik. (İstatistiksel olarak anlamlı farklar: TCPS kontrol grubu iken: * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$).

Kültürün ilk gününden itibaren, hem boş hem de melatonin yüklü PLGA nanopartiküllerin üç farklı miktarı ile etkileştirilen hücrelerin canlılığında, TCPS'te üreyen hücreler ile kıyaslandığında önemli derecede bir düşüş ($p < 0.001$) meydana gelmiştir (Şekil 4.16). Buna neden olarak, PLGA nanopartiküllerin boyutlarından dolayı MG-63 hücreleri üzerinde toksik etki yaratmış olabileceği düşünülmüştür. Dolayısıyla, PLGA nanopartiküllerden salınan melatoninin hücreler üzerindeki etkisi incelenememiştir.



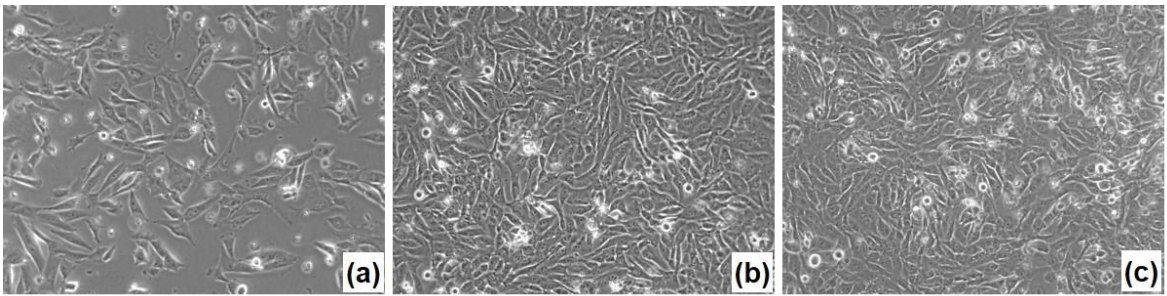
Şekil 4.17. Boş ve melatonin yüklü PLGA mikropartikülleri ile etkileştirilen MG-63 hücrelerinin MTT sonuçlarını gösteren grafik. (İstatistiksel olarak anlamlı farklar: TCPS kontrol grubu iken: * $p<0.05$, ** $p<0.01$, *** $p<0.001$).

Şekil 4.17’de verilen sonuçlar incelendiğinde, mikropartikül miktarının artmasına bağlı olarak tüm gruplarda hücre canlılığında azalış meydana gelmiştir. Özellikle 5 mg/cm² partikül eklendiği durumda, hem boş hem de melatonin yüklü PLGA mikropartiküllerle etkileşen hücrelerin MTT değerlerinin, TCPS’te üreyen hücrelerinkinden istatistiksel olarak anlamlı derecede düşük olduğu belirlenmiştir ($p<0.001$). Bu durumun yüksek partikül konsantrasyonuna bağlı olarak hücrelerin ortamdaki besin ve oksijenden yeterince yararlanamamalarından kaynaklandığı düşünülmüştür. Diğer gruplardan farklı olarak, 0.05 mg/cm² PLGA mikro (boş) grubuna ait MTT değerleri ile TCPS grubunun değerleri arasında istatistiksel olarak anlamlı bir fark olmadığı belirlenmiştir ($p>0.05$). Kültürün ilk gününde 0.05 mg/cm² miktardaki boş ve melatonin yüklü PLGA mikropartikülleri ile etkileşen hücrelerin absorbans değerlerinde belirgin bir fark olmamasına rağmen ($p>0.05$), ilerleyen günlerde boş PLGA mikropartiküller ile etkileşen hücrelerin canlılık değerlerinin melatonin yüklü PLGA mikropartiküllere etkileşen hücrelerin canlılık değerlerine göre istatistiksel olarak anlamlı derecede yüksek olduğu belirlenmiştir ($p<0.01$). PLGA mikro-20 partikülleri ile etkileşen hücrelerin canlılığındaki bu azalmanın partiküllerden ani patlama etkisi ile salınan melatoninden kaynaklandığı düşünülmüştür.

In vitro salım çalışmalarında da ifade edildiği gibi PLGA mikropartiküllerden ani patlama etkisi ile melatonin salımı ilk 24 saatte gerçekleşmektedir (Şekil 4.7-b). Dolayısıyla, ilk 24 saatte salınan melatonin hücreler ile etkileşerek kültürün ikinci gününden itibaren hücre canlılığını istatistiksel olarak anlamlı derecede azaltmıştır ($p<0.01$). Boş PLGA mikropartikülleri ile kıyaslandığında, melatonin yüklü PLGA mikropartiküllerden salınan melatonin, 0.05 mg/cm^2 partikül konsantrasyonunda MG-63 hücrelerinin üremesini belirgin şekilde inhibe etmesine rağmen hücrelerin tamamen ölümüne neden olmamıştır.

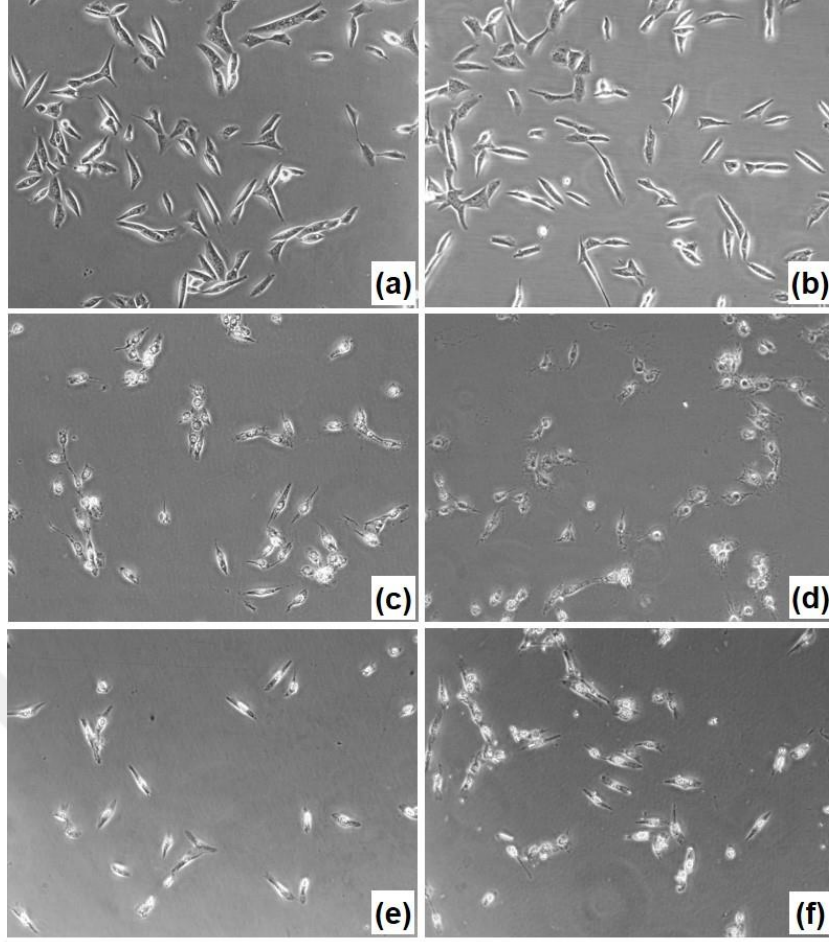
Literatürde serbest melatoninin çeşitli insan osteosarkom hücreleri (MG-63 ve SOSP-9607) üzerindeki etkisi incelenmiş ve melatoninin milimolar (mM) konsantrasyonları hücrelerin üremesini önemli derecede inhibe ederken, mikromolar (μM) konsantrasyonlarının hücre canlılığını bir miktar azalttığı belirtilmiştir [91, 97]. Tez çalışmasında PLGA mikropartiküllerden hücre kültürüne salınan melatonin konsantrasyonu da mikromolar mertebededir. Her ne kadar melatonin yüklü PLGA mikropartiküllerin 0.05 mg/cm^2 miktarı ile etkileşen hücrelerin canlılığında kontrole göre önemli derecede azalma görülse de, kültür ortamına salınan melatonin miktarının ($\sim 1.7 \text{ mg}$) hücre canlılığını tamamen inhibe etmek için yeterli olmadığı belirlenmiştir.

PLGA nano/mikropartikülleri ile etkileşen MG-63 hücrelerinin kültür süresince morfolojilerini incelemek amacıyla optik mikroskop görüntüleri çekilmiştir. TCPS'te üreyen hücrelerin kültürün her günündeki görüntüleri Şekil 4.18'de, PLGA nanopartikülleri ve PLGA mikropartikülleri ile etkileştirilen hücrelerin kültürün 2. gününe ait görüntüleri ise sırasıyla, Şekil 4.19 ve Şekil 4.20'de verilmiştir.



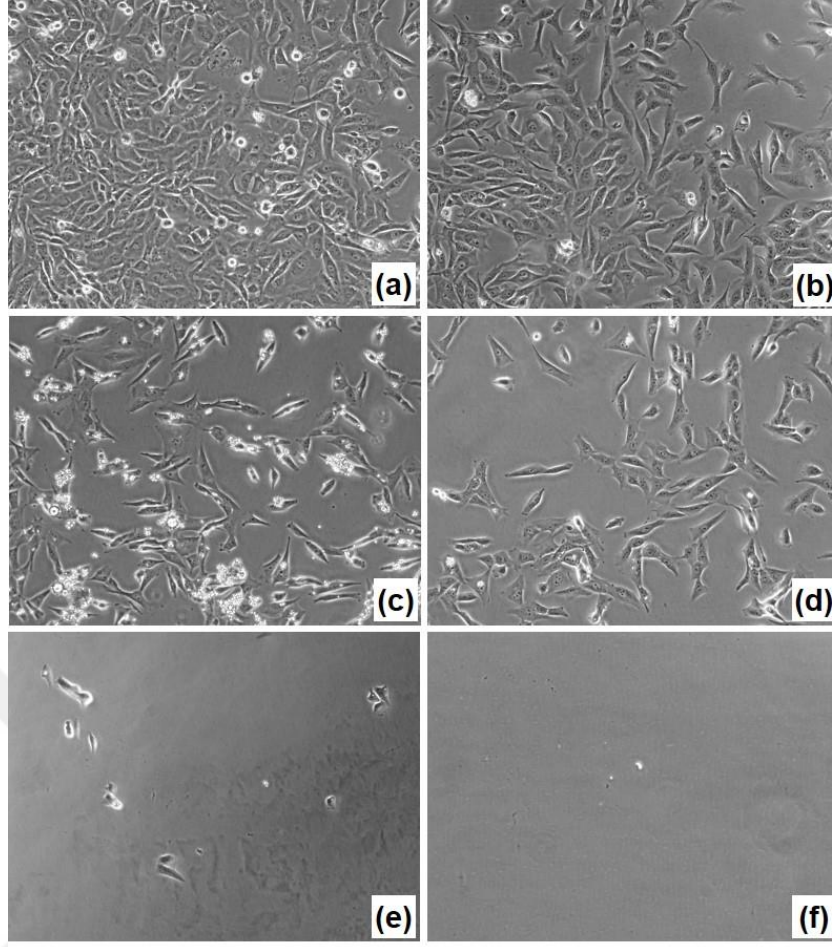
Şekil 4.18. TCPS'te üreyen MG-63 hücrelerinin optik mikroskop görüntüleri (20 X): (a) 1. gün, (b) 2. gün ve (c) 3. gün.

Şekil 4.18'de TCPS'te üreyen MG-63 hücrelerinin zamana bağlı olarak hızlı bir şekilde çoğaldığı ve 3. günün sonunda kültür kabının neredeyse tamamını kapladıkları görülmektedir. Hücre karakterizasyon çalışmalarında MG-63 hücrelerin ikilenme süresi 27 sa olarak belirlendiğinden, hücrelerin hızlı bir şekilde çoğalması beklenen bir durumdur.



Şekil 4.19. Farklı miktarlarda PLGA nanopartikülleri ile etkileşen MG-63 hücrelerinin kültürün 2. gününe ait optik mikroskop görüntüleri (20 X): (a) 0.05 mg/cm² PLGA nano (boş), (b) 0.05 mg/cm² PLGA nano-10, (c) 0.5 mg/cm² PLGA nano (boş), (d) 0.5 mg/cm² PLGA nano-10, (e) 5 mg/cm² PLGA nano (boş), (f) 5 mg/cm² PLGA nano-10.

Melatonin içeren ve içermeyen PLGA nanopartiküllerin her üç farklı konsantrasyonu ile etkileşen MG-63 hücrelerinin sayısının önemli derecede azaldığı ve morfolojisinin bozulduğu belirlenmiştir (Şekil 4.19). Optik mikroskop görüntülerinden elde edilen sonuçlar MTT verileri ile de uyumludur.



Şekil 4.20. Farklı miktarlarda PLGA mikropartikülleri ile etkileşen MG-63 hücrelerinin kültürün 2. gününe ait optik mikroskop görüntüleri (20 X): a) 0.05 mg/cm² PLGA mikro (boş), b) 0.05 mg/cm² PLGA mikro-20, c) 0.5 mg/cm² PLGA mikro (boş), d) 0.5 mg/cm² PLGA mikro-20, e) 5 mg/cm² PLGA mikro (boş), f) 5 mg/cm² PLGA mikro-20.

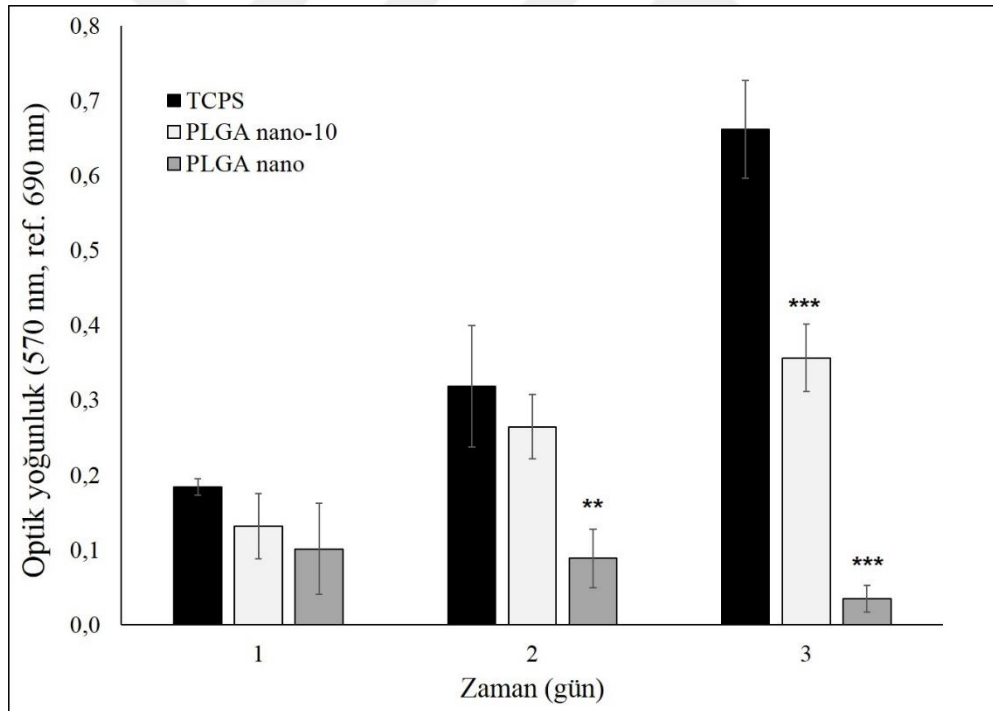
Boş ve melatonin yüklü PLGA mikropartiküllerin 0.05 mg/cm² konsantrasyonu ile etkileşen hücrelerin morfolojisinde herhangi bir değişiklik olmadan ürediği belirlenmiştir (Şekil 4.20-a,b). Ancak melatonin yükü partiküllerle etkileşen hücrelerin boş mikropartiküllerle etkileşenlere göre kültür kabında daha az yoğunlukta olduğu görülmüştür. Bu durum MTT sonuçlarını doğrulamaktadır. Partikül miktarının 0.5 mg/cm² olduğu durumda ise, hücre morfolojilerinin bir miktar bozulduğu ancak hücrelerin üremeye devam ettikleri belirlenmiştir (Şekil 4.20-c,d). Hem boş hem de melatonin yüklü 5 mg/cm² konsantrasyonundaki partiküllerle etkileşen hücrelerin ise tamamen ölüp kültür kabından yıkamalar sonucu uzaklaştıkları belirlenmiştir (Şekil 4.20-e,f). Bu durumun yüksek konsantrasyonda PLGA mikropartiküllerinin hücrelerin üzerini tamamen kaplaması, dolayısıyla hücrelerin ortamdaki besin ve oksijenden yeteri kadar yararlanamamalarından kaynaklandığı düşünülmüştür.

4.3.3. Boş ve melatonin yüklü PLGA nanopartiküllerin MC3T3-E1 ve MG-63 hücreleri ile etkileşimi

Bölüm 4.3.2’de gerçekleştirilen çalışmalar sonucunda, PLGA nanopartiküllerin MG-63 hücreleri üzerinde toksik etki gösterdikleri belirlenmiş ve bu durumun nanopartiküllerin boyutlarından dolayı hücre içerisine alınmalarına bağlı olabileceği düşünülmüştür. Bu nedenle bir önceki kısımda kullanılan en düşük nanopartikül konsantrasyonu (0.05 mg/cm^2) kullanılarak, boş ve melatonin yüklü PLGA nanopartiküllerin hem MC3T3-E1 hem de MG-63 hücreleri üzerindeki etkilerini incelemek amacıyla 3 gün süren *in vitro* hücre kültür çalışmaları gerçekleştirilmiştir.

4.3.3.1. MTT analizi

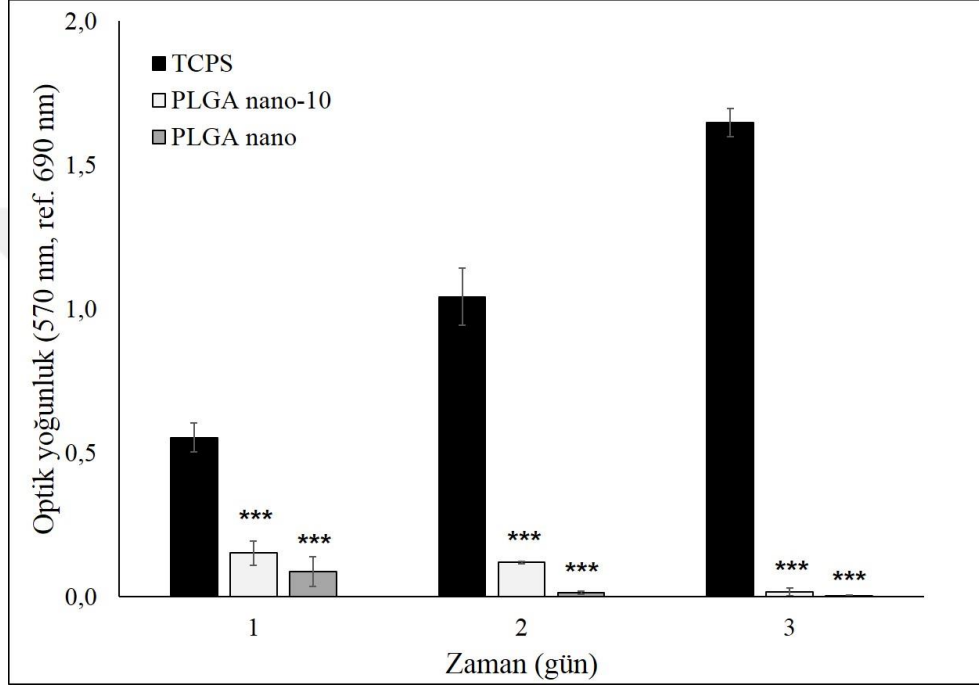
Boş ve melatonin yüklü PLGA nanopartiküllerin 0.05 mg/cm^2 konsantrasyonu ile etkileştirilen MC3T3-E1 ve MG-63 hücrelerinin proliferasyonu MTT analizi ile takip edilmiş ve elde edilen sonuçlar sırasıyla, Şekil 4.21 ve Şekil 4.22’de verilmiştir. TCPS’te üreyen hücreler kontrol amacıyla kullanılmıştır.



Şekil 4.21. Boş ve melatonin yüklü PLGA nanopartikülleri ile etkileşen MC3T3-E1 hücrelerinin MTT değerleri. (İstatistiksel olarak anlamlı farklar: TCPS kontrol grubu iken: * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$).

MC3T3-E1 hücrelerinin MTT değerleri incelendiğinde (Şekil 4.21), kültürün ilk gününde gruplar arasında belirgin bir fark gözlenmezken, kültürün 2. gününde sadece boş PLGA nanopartiküller (PLGA nano) ile etkileşen hücrelerin MTT değerinin istatistiksel olarak

düşük olduğu belirlenmiştir ($p<0.01$). Buna karşılık, melatonin yüklü PLGA nanopartiküller (PLGA nano-10) ile etkileşen hücrelerin MTT değerlerinde anlamlı bir fark gözlenmemiştir ($p>0.05$). Bu durumun, PLGA nano-10 partiküllerinden salınan melatoninin preosteoblastik MC3T3-E1 hücrelerinin üremesini bir miktar arttırmasından kaynaklı olduğu düşünülmüştür. Kültürün son gününde ise hücre canlılığının hem boş (PLGA nano) hem de melatonin yüklü PLGA nanopartiküllerle (PLGA nano-10) etkileşen grupta istatistiksel olarak önemli derecede düştüğü belirlenmiştir ($p<0.001$).



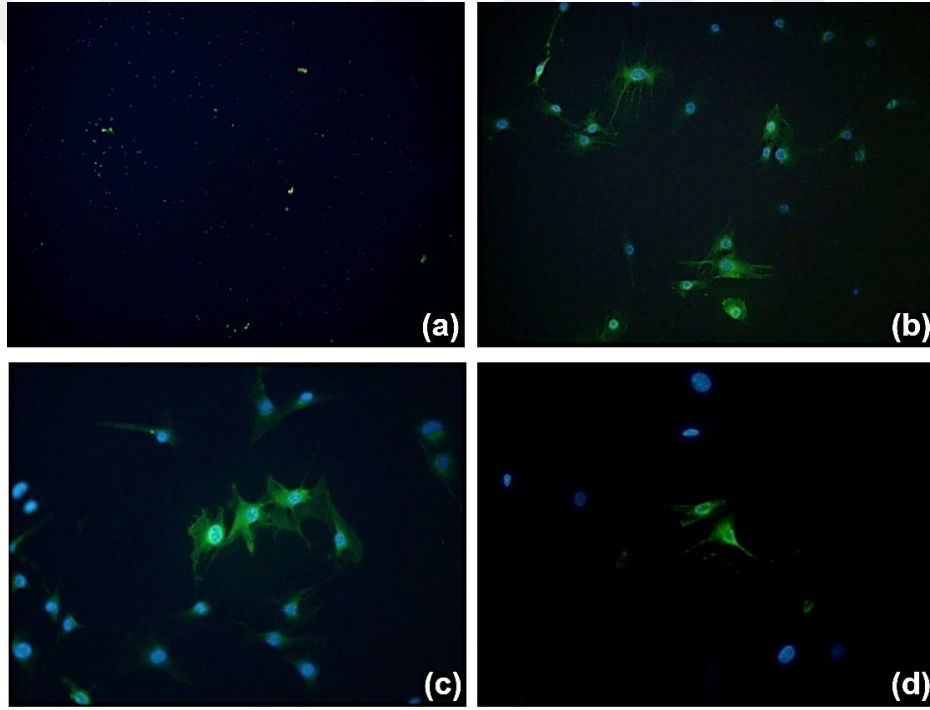
Şekil 4.22. Boş ve melatonin yüklü PLGA nanopartikülleri ile etkileşen MG-63 hücrelerinin MTT değerleri. (İstatistiksel olarak anlamlı farklar: TCPS kontrol grubu iken: * $p<0.05$, ** $p<0.01$, *** $p<0.001$).

Üç gün süren hücre kültür çalışmaları sonucunda, hem boş (PLGA nano) hem de melatonin yüklü PLGA nanopartiküller (PLGA nano-10) ile etkileşen MG-63 hücrelerinin canlılığının kültürün ilk gününden itibaren TCPS'te üreyen hücrelere göre istatistiksel olarak anlamlı derecede ($p<0.001$) azaldığı görülmüştür (Şekil 4.22). Şekil 4.21'de verilen TCPS'te üreyen MC3T3-E1 hücrelerinin MTT değerleri ile kıyaslandığında, Şekil 4.22'deki MG-63 hücrelerinin optik yoğunluk değerleri, bu hücrelerin çok yüksek mitokondriyal aktiviteye sahip olmasından dolayı oldukça yüksektir. Bu nedenle de kültürün ilk gününden itibaren PLGA nanopartikülleri ile etkileşen MG-63 hücrelerinin MTT değerleri ile kontrol grubu arasında istatistiksel olarak önemli bir fark meydana gelmiştir.

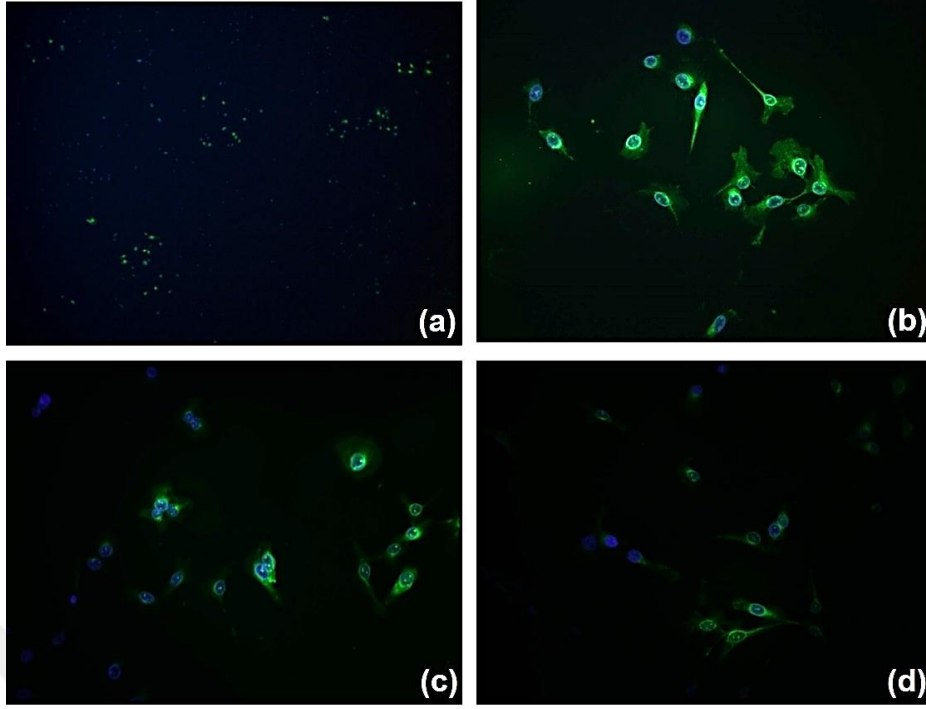
Sonuç olarak, PLGA nanopartiküller küçük boyutlarından dolayı (~230 nm) hücre içerisine alınmasına bağlı olarak hücreler üzerinde toksik etki göstermiş ve dolayısıyla hücre canlılığı azalmıştır. Ancak, PLGA nano-10 partiküllerinden salınan melatoninin preosteoblastik yapıdaki MC3T3-E1 hücrelerinin canlılığını bir miktar arttırdığı ve dolayısıyla partiküllerin yarattığı toksik etkiyi azalttığı görülmüştür.

4.3.3.2. PLGA nanopartiküllerin hücre içerisine alınmasının incelenmesi

PLGA nanopartiküllerin hücre içerisine alınıp alınmadıklarının belirlenmesi amacıyla, MG-63 ve MC3T3-E1 hücreleri FITC-yüklü PLGA nanopartiküller ile 24 sa boyunca etkileştirilmiştir. Kültürün 1., 5. ve 24. saatlerinde hücreler floresan mikroskop ile incelenmiştir. MC3T3-E1 ve MG-63 hücreleri ve hücrelerine ait mikroskop görüntüleri, sırasıyla Şekil 4.23 ve Şekil 4.24’te verilmiştir.



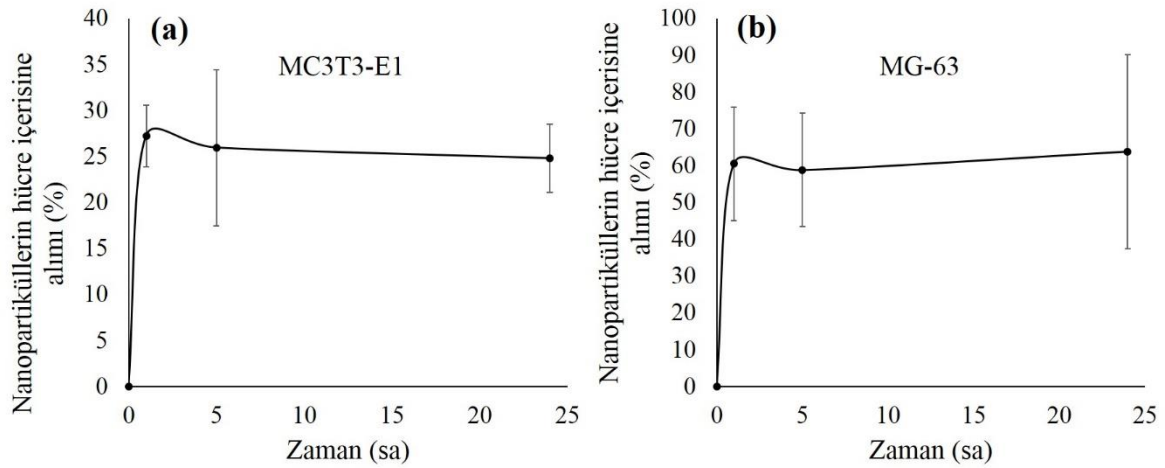
Şekil 4.23. PLGA nanopartiküller ile etkileştirilen MC3T3-E1 hücrelerinin floresan mikroskop görüntüleri: (a) 1 sa inkübasyon (4 X), (b) 1 sa inkübasyon (32 X), (c) 5 sa inkübasyon (32 X), (d) 24 sa inkübasyon (32 X). Yeşil alanlar FITC-yüklü nanopartikülleri, mavi alanlar ise hücre çekirdeğini ifade etmektedir.



Şekil 4.24. PLGA nanopartikülleri ile etkileştirilen MG-63 hücrelerinin floresan mikroskop görüntüleri: (a) 1 sa inkübasyon (4 X), (b) 1 sa inkübasyon (32 X), (c) 5 sa inkübasyon (32 X), (d) 24 sa inkübasyon (32 X). Yeşil alanlar FITC-yüklü nanopartikülleri, mavi alanlar ise hücre çekirdeğini ifade etmektedir.

Kültürün ilk saatinden itibaren FITC-yüklü nanopartiküllerin hem MC3T3-E1 hem de MG-63 hücreleri tarafından alındığı ve kültürün ilerleyen saatlerinde hücre çekirdeği ve sitoplazmasında nanopartiküllerin bulunduğu belirlenmiştir (Şekil 4.23 ve Şekil 4.24).

Şekil 4.23-a ve Şekil 4.24-a incelendiğinde, MC3T3-E1 hücreleri tarafından alınan partiküllerin sayısının MG-63 hücreleri tarafından alınanlara göre daha az olduğu görülmüştür. Nanopartiküllerle etkileşen MC3T3-E1 ve MG-63 hücrelerinin 4X büyütmedeki görüntüleri kullanılarak hücrelerin yüzde kaçının PLGA nanopartikülleri içerisine aldığı belirlenmiş ve sırasıyla, Şekil 4.25-a ve Şekil 4.25-b’de verilmiştir.



Şekil 4.25. FITC-yüklü PLGA nanopartiküllerin hücre içerisine alım yüzdesi: (a) MC3T3-E1 hücreleri ve (b) MG-63 hücreleri.

Kültürün ilk saatinde, MC3T3-E1 hücreleri ortamdaki FITC-yüklü PLGA nanopartiküllerin yaklaşık %30'unu alırken, MG-63 hücrelerinin %60'ını aldığı belirlenmiştir. Kültürün diğer saatlerinde ise hücre içerisine alınan partiküllerin yüzdesinde belirgin bir değişim olmamıştır (Şekil 4.25). Literatürdeki çalışmalar incelendiğinde, yaklaşık 100 nm'ye kadar olan nanopartiküllerin hücreler üzerinde toksik etki yarattıkları bilinmektedir [159]. Çünkü partikülün boyutu azaldıkça yüzey alanı/kütle oranı artmakta ve böylelikle partikül yüzeyinin dış ortamla etkileşimi de buna bağlı olarak artmaktadır. Ancak bazı çalışmalarda 200 nm ve 300 nm boyutlarındaki nanopartiküllerin başta endotel hücreleri üzerinde olmak üzere çeşitli hücreler üzerinde de toksik etkileri olduğu belirlenmiştir [160, 161]. Zhao ve ark. [162], yaklaşık 100 nm boyutlarındaki realgar nanopartiküllerin kanser hücre hattı olan insan osteosarkom hücreleri (MG-63) ve hepatoma karsinoma hücreleri (HepG-2) ile normal karaciğer hücre hattı (L-02) üzerindeki toksik etkilerini incelenmişlerdir. Sonuç olarak, nanopartiküllerin kanser hücrelerinin canlılığını normal hücrelere göre daha fazla azalttığı belirtilmiştir.

Kanser hücrelerinin normal hücrelere göre nanopartiküllerden daha fazla etkilenme nedeni ise bir diğer çalışmada kanser hücrelerinin çekirdek zarlarının normal hücrelere göre daha geniş olması ve bu nedenle kanser hücrelerinin nanopartiküllerle çok daha fazla etkileşime girmesi ile açıklanmıştır [163]. Chitkara ve ark. [164], yaklaşık 240 nm çapa sahip gemitabin yüklü BSA-PLGA bazlı nanopartikülleri üretmişler ve bu partiküllerin MG-63 hücreleri ile etkileşimini incelemişlerdir. Bu çalışmada, sitotoksite ve hücre içerisine alım çalışmaları sonucunda nanopartiküllerin hücre içerisine zaman ve konsantrasyon bağımlı

olarak endositoz yoluyla alındığı belirlenmiştir. Ayrıca, boş nanopartikül konsantrasyonu arttıkça hücre canlılığının azaldığı vurgulanmıştır.

Sonuç olarak, tez çalışmasında kullanılan ~230 nm çapa sahip PLGA nanopartiküllerin hem MC3T3-E1 hem de MG-63 hücreleri üzerinde toksik etki gösterdiği, ancak kanser hücresi olan MG-63 hücreleri ile normal hücre olan MC3T3-E1 hücrelerine göre çok daha fazla etkileşip hücre içerisine alındığı belirlenmiştir. Elde edilen sonuçların literatürdeki çalışmalarla da uyumlu olduğu ve üretilen nanopartiküllerin hücreler üzerindeki toksik etki göstermesini engellemek amacıyla doku iskelelerine yüklenerek kullanılmasının gerekli olduğu anlaşılmıştır.

4.4. Boş ve PLGA Nano/Mikropartikül Yüklü Kitosan Doku İskelelerinin Üretimi ve Karakterizasyonu

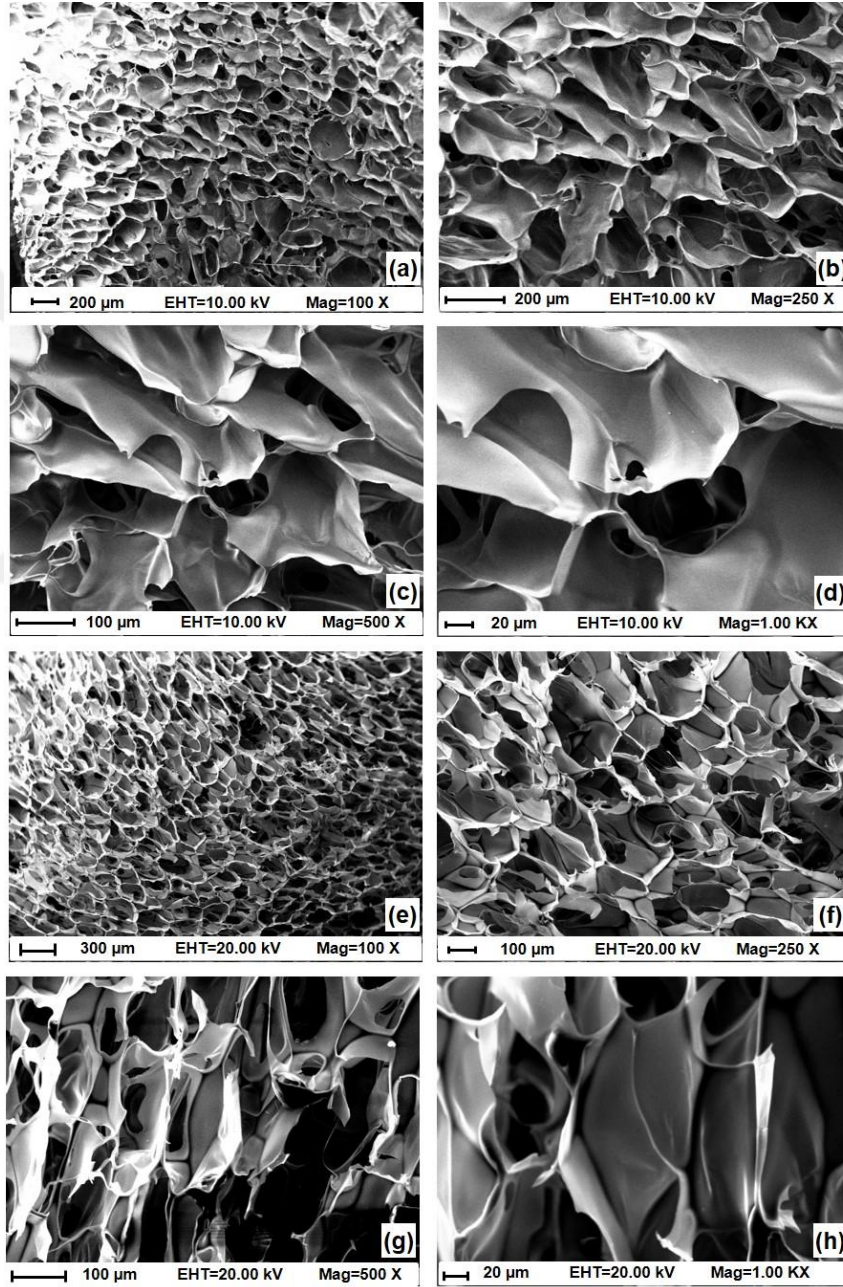
4.4.1. Boş kitosan doku iskelelerinin üretimi ve karakterizasyonu

Boş kitosan doku iskeleleri %75-85 deasetilasyon derecesine sahip kitosan kullanılarak, “dondurarak-kurutma” yöntemiyle hazırlanmıştır. Bu yöntemde, jelleştikten sonra dondurulan kitosan çözeltisinde oluşan buz kristalleri liyofilize edilmekte, bu sayede gözenekli ve içsel bağlantıları olan bir yapı oluşmaktadır. Daha önce grubumuz tarafından bu yöntemle kitosan doku iskeleleri üretilmiş ve karakterize edilmiştir [165].

Yarı-kristalin yapıda bir polisakkarit olan kitosan, nötral ve alkali ($\text{pH} > 7$) pH’da serbest amino (NH_2) grupları içerir ve sulu çözeltilerde çözünmez. Ancak, zayıf asitlerde ($\text{pH} < 6$) kitosanın amino grupları (NH_2) protonlanır ($-\text{NH}_3^+$) ve molekül pozitif yüklenerek çözünür hale gelir. Ayrıca, yapısındaki her bir glukozamin ünitesinde yük bulunduğundan oldukça yüksek yük yoğunluğuna sahip olan kitosan, negatif yüklü yüzeylerle güçlü bir şekilde etkileşmektedir [166]. Genellikle asetik asit içerisinde çözünen kitosanın protonlanmış amin grupları ile asetik asidin asetat iyonları elektrostatik olarak etkileşime girmektedirler. Kitosanın çözünmez hale gelmesi için bu asetat gruplarının yüksek pH’da uzaklaştırılması gerekmektedir [167]. Bu nedenle, üretilen kitosan doku iskelelerinin sulu ortamla etkileştirilmeden önce mutlaka nötralize edilmesi gerekmektedir. Tez kapsamında, dondurarak-kurutma yöntemi ile üretilen kitosan doku iskeleleri iki farklı şekilde nötralize edilmiştir. İlk yöntemde, daha önce grubumuz tarafından da uygulanan etanolle nötralizasyon gerçekleştirilmiştir. Diğer yöntemde ise sodyum karbonat kullanılarak kitosan doku iskeleleri nötralize edilmiştir.

4.4.1.1. SEM analizi

Nötralizasyon yönteminin kitosan doku iskelelerinin gözenek yapısını ne şekilde etkilediğinin incelenmesi amacıyla iskeleler SEM ile incelenmiştir. Etanol ve sodyum karbonat ile nötralizasyon yönteminde de iskelelerin içsel olarak bağlantılı gözeneklere sahip olduğu görülürken, sodyum karbonat ile nötralizasyon yönteminin gözenekliliğinin biraz daha fazla olduğu belirlenmiştir.

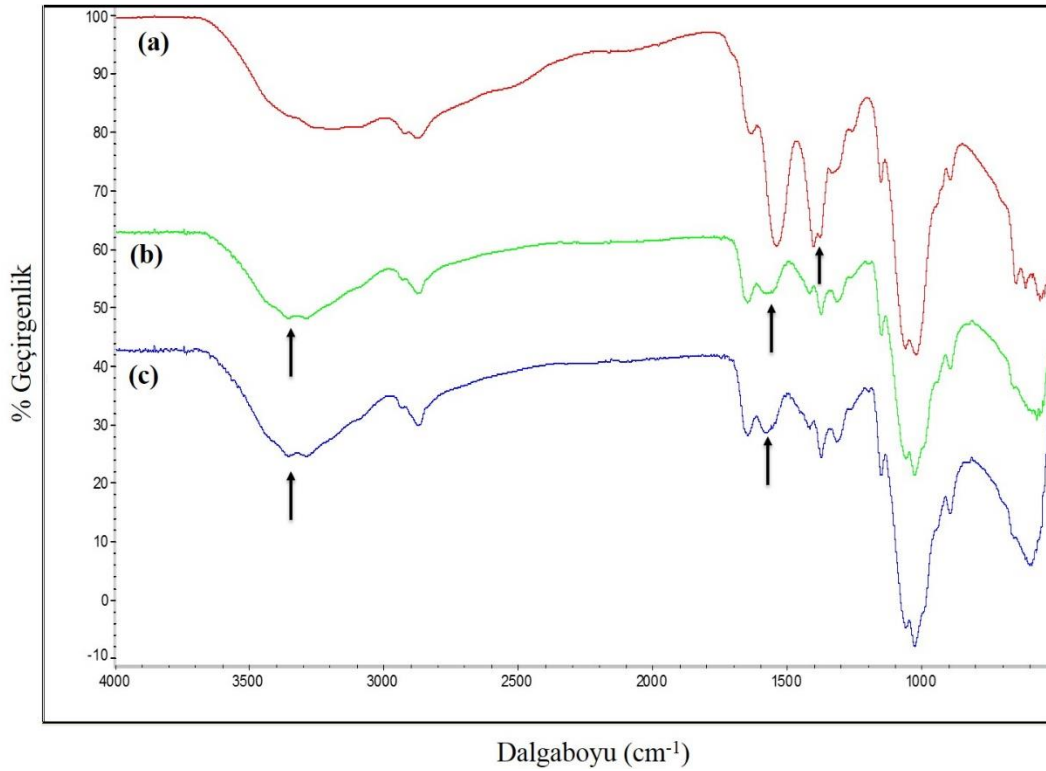


Şekil 4.26. Etanol ile nötralizasyon yönteminde kitosan doku iskelelerinin farklı büyütme ölçeklerindeki SEM görüntüleri: (a) 100 X, (b) 250 X, (c) 500 X, (d) 1,000 X; sodyum karbonat ile nötralizasyon yönteminde kitosan doku iskelelerinin farklı büyütme ölçeklerindeki SEM görüntüleri: (e) 100 X, (f) 250 X, (g) 500 X, (h) 1,000 X.

SEM görüntüleri kullanılarak Image J (NIH, Bethesda, MD, ABD) programında kitosan doku iskelelerinin ortalama gözenek boyutları hesaplanmıştır. Her iki nötralizasyon yönteminde de kitosan doku iskelelerinin ~ 190 μm çapta gözeneklere sahip olduğu ve nötralizasyon yönteminin iskelenin gözenek boyutu üzerinde belirgin bir etkisinin olmadığı gözlenmiştir.

4.4.1.2. ATR-FTIR analizi

Kitosanın nötralizasyonunun başarılı bir şekilde gerçekleşip gerçekleşmediğinin belirlenmesi amacıyla kitosan doku iskelelerinin spektrumları alınmış ve bu spektrumlar Şekil 4.27’de sunulmuştur.



Şekil 4.27. Kitosan doku iskelelerine ait ATR-FTIR spektrumları: (a) nötralize edilmemiş, (b) etanol ile nötralize edilmiş ve (c) sodyum karbonat ile nötralize edilmiş.

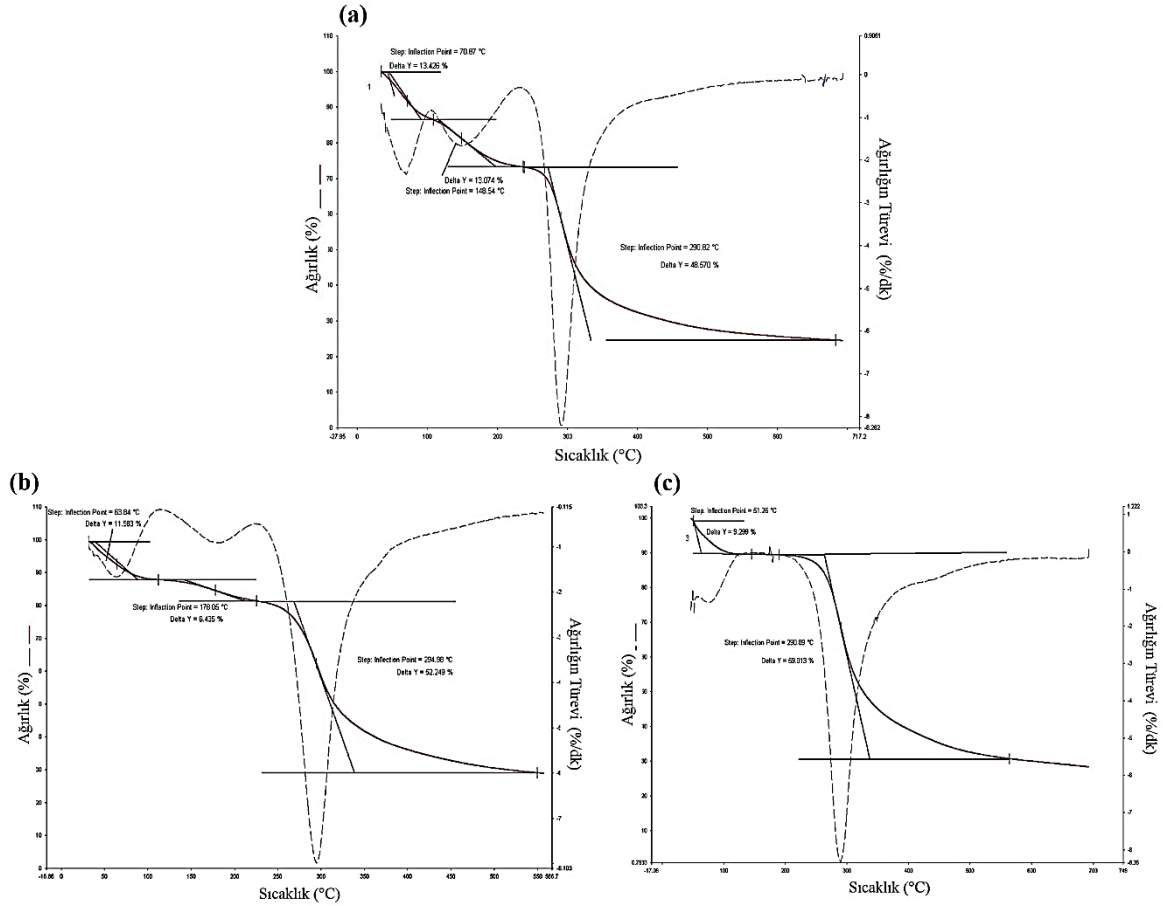
Şekil 4.27’de verilen spektrumlar incelendiğinde, nötralize edilmemiş kitosan doku iskelesine ait spektrumda 3400 cm^{-1} dalga boyunda görülen kitosana ait olan N-H gerilme pik şiddetinin (Şekil 4.27-a), hem etanolle hem de sodyum karbonatla nötralize edilen kitosan doku iskelelerine ait spektrumlarda (Şekil 4.27-b,c) daha fazla olduğu belirlenmiştir [168, 169]. Bu durum, kitosanın deasetilasyon derecesinin etanol ve sodyum karbonat ile nötralizasyonu sonucu arttığını kanıtlamaktadır. Bu piklerin şiddetleri kıyaslandığında, sodyum karbonat ile nötralize edilen kitosan doku iskelesine ait spektrumda (Şekil 4.27-c), etanol ile nötralize edilen kitosan doku iskelesine ait spektrumdakine göre (Şekil 4.27-b)

daha yüksek olduğu görülmüştür. Dolayısıyla, sodyum karbonat nötralizasyonunun etanol nötralizasyonuna göre daha başarılı olduğu düşünülmüştür. Nötralize edilmemiş kitosan doku iskelesine ait spektrumda (Şekil 4.27-a) 1600 cm^{-1} dalga boyunda görülen karbonil grubuna (C=O) ait olan pikin şiddetinin, hem etanol hem de sodyum karbonat ile nötralize edilmiş kitosan doku iskelelerinde (Şekil 4.27-b,c) azaldığı görülmüştür [170]. Bunun yanı sıra nötralize edilmemiş kitosan iskeleye ait spektrumda (Şekil 4.27-a) 1400 cm^{-1} dalga boyundaki asetat iyonuna (CH_3COO^-) ait karakteristik karboksilat iyonunun simetrik gerilme pikine rastlanmıştır. Etanol ve sodyum karbonat ile nötralize edilen iskelelerin spektrumlarında (Şekil 4.27-b,c) ise bu pik kaybolmuş ve asetat iyonunun uzaklaştırılmasıyla oluşan sırasıyla 1417 , 1374 ve 1316 cm^{-1} civarında CH_2 bükülme piki, CH_3 deformasyon piki ve CH bükülme pikleri görülmüştür [171]. Ayrıca, karbonat (CO_3^{2-}) iyonuna ait 1415 cm^{-1} , 1457 cm^{-1} ve 1547 cm^{-1} dalga boylarındaki karakteristik piklerin [172] sodyum karbonat ile nötralize edilmiş kitosan doku iskelelerinde görülmemesi de karbonatın yıkamalarla iskele yapısından başarılı bir şekilde uzaklaştırıldığını kanıtlamaktadır.

Sonuç olarak, her iki yöntemde de kitosanın başarılı bir şekilde nötralize edildiği, ancak sodyum karbonat yönteminin kitosanın deasetilasyon derecesini etanole göre biraz daha fazla arttırdığı belirlenmiştir. Ayrıca, ilerde melatonin yüklü PLGA nano/mikropartiküller kitosan doku iskelelerine yükleneceğinden, iskele nötralizasyonu sırasında partiküllerin dış yüzeyinde bulunan melatoninin etanol içerisinde çözünmesini engellemek amacıyla kitosan doku iskelelerinin sodyum karbonat ile nötralize edilmesine karar verilmiştir.

4.4.1.3. Termogravimetrik analiz

Kitosan doku iskelelerinin nötralizasyon yönteminin iskelelerin termal davranışlarını ne şekilde etkilediğini incelemek amacıyla termogravimetrik analiz gerçekleştirilmiş ve nötralize edilmemiş, etanol ile nötralize edilmiş ve sodyum karbonat ile nötralize edilmiş kitosan doku iskelelerine ait termogramlar Şekil 4.28’de sunulmuştur.



Şekil 4.28. (a) Nötralize edilmemiş, (b) etanol ile nötralize edilmiş ve (c) sodyum karbonat ile nötralize edilmiş kitosan doku iskelelerine ait termogramlar.

Kitosan doku iskelelerine ait termogramlar incelendiğinde, nötralize edilmemiş kitosan doku iskelesinde ağırlık kaybının 2 aşamada meydana geldiği belirlenmiştir (Şekil 4.28-a). İlk olarak, iskele içerisindeki nem 70.9°C’den itibaren uzaklaşmaya başlamış ve bu aşamada yaklaşık %13.43’lük bir ağırlık kaybı meydana gelmiştir. İskelenin ilk aşama bozunması 148.5°C’de başlamış ve %13.07’lik bir ağırlık kaybı oluşmuştur. İkinci bozunma ise 290.8°C’de gerçekleşmiş ve kitosan iskelede %48.57’lik ağırlık kaybı meydana gelmiştir. Etanol ile nötralize edilen kitosan doku iskelelerin termogramında ise (Şekil 4.28-b) yapı daha kararlı bir hale gelmekle birlikte, yine iskeledeki sıcaklık artışına bağlı olarak bozunma 2 aşamada gerçekleşmiştir. İskele içerisinde bulunan nem, 63.8°C’de yapıdan uzaklaşmaya başlamış ve %11.58’lik bir ağırlık kaybı meydana gelmiştir. İskelenin ilk bozunması 178.0°C’de başlamış ve %6.44’lük bir ağırlık kaybı görülmüştür. İkinci bozunma aşaması ise 295.0°C’de başlamış ve kitosan iskelenin ağırlığında %52.25’lik bir kayıp meydana gelmiştir. Sodyum karbonat ile nötralize edilen kitosan doku iskelelerine ait termogramda (Şekil 4.28-c) ise yapının çok daha kararlı olduğu ve bozunmanın tek aşamada meydana

geldiği belirlenmiştir. Yapıdaki nemin 51.3°C’de uzaklaşmaya başlamasıyla iskele ağırlığı %9.30 oranında azalmıştır. Tek aşamalı bozunma 291.0°C’de başlamış ve iskele ağırlığında %59.01’lik bir kayıp meydana gelmiştir.

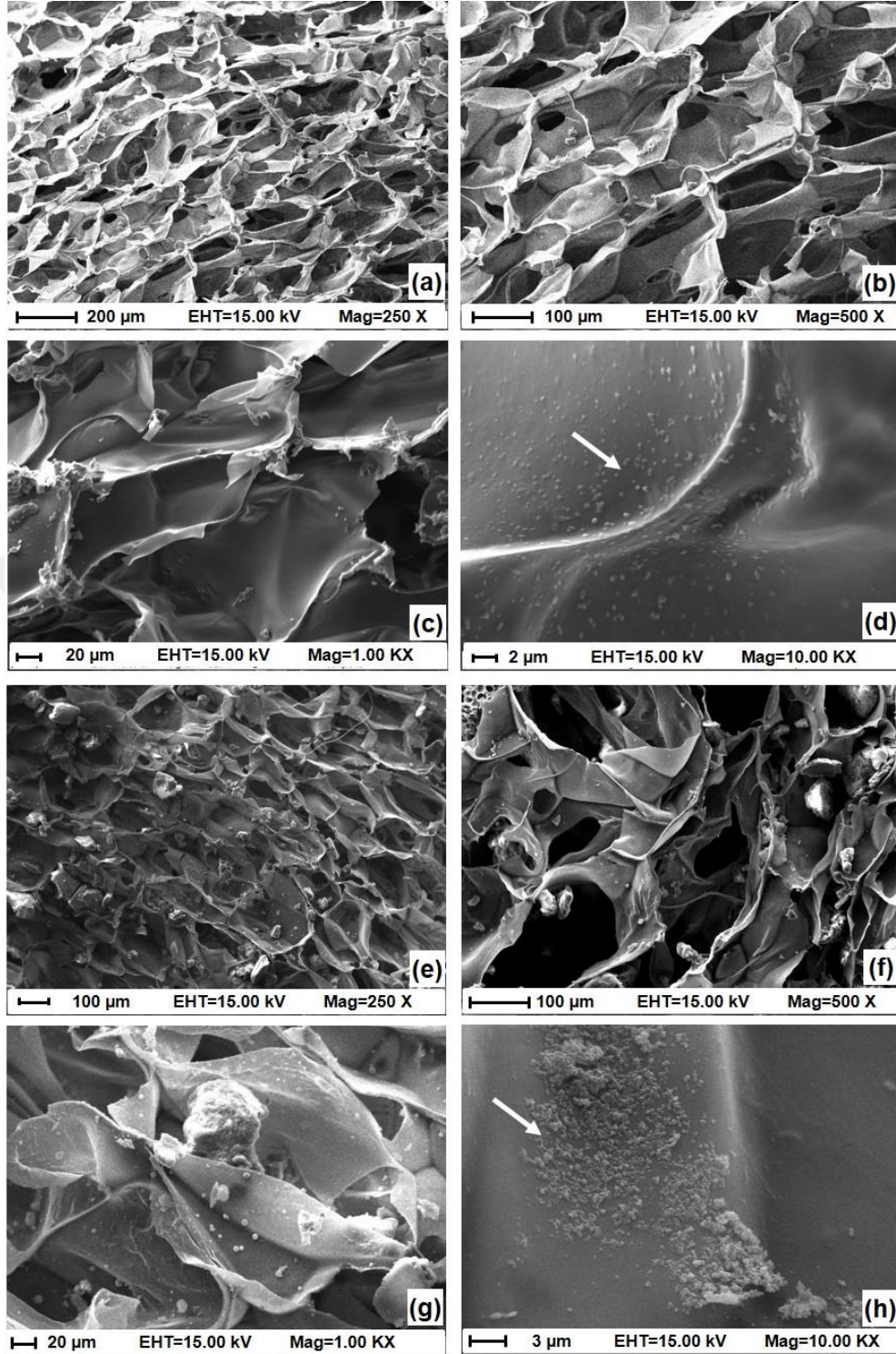
Termogravimetrik analiz sonucu elde edilen verilere göre, sodyum karbonat ile nötralizasyonun kitosan doku iskelelerinin yapısını daha kararlı bir hale getirdiği belirlenmiş ve bu nötralizasyon yönteminin etanolle kıyaslandığında çok daha uygun olduğu sonucuna varılmıştır.

4.4.2. PLGA nano/mikropartikül yüklü kitosan doku iskelelerinin üretimi ve karakterizasyonu

4.4.2.1. SEM analizi

PLGA nano/mikropartiküller, i) kitosan doku iskelelerinin üretimi sırasında yapıya katılarak ve ii) sonradan iskeleye emdirilerek iki farklı şekilde yüklenmiştir. PLGA nano ve mikropartiküllerin yapıya üretim aşamasında katılmasıyla oluşturulan kitosan doku iskeleleri, sırasıyla kitosan+Np ve kitosan+Mp şeklinde; PLGA nano ve mikropartiküllerin iskeleye üretim sonrasında emdirilerek yüklenmesi ile üretilen kitosan doku iskeleleri ise, sırasıyla kitosan-Np ve kitosan-Mp olarak ifade edilmiştir.

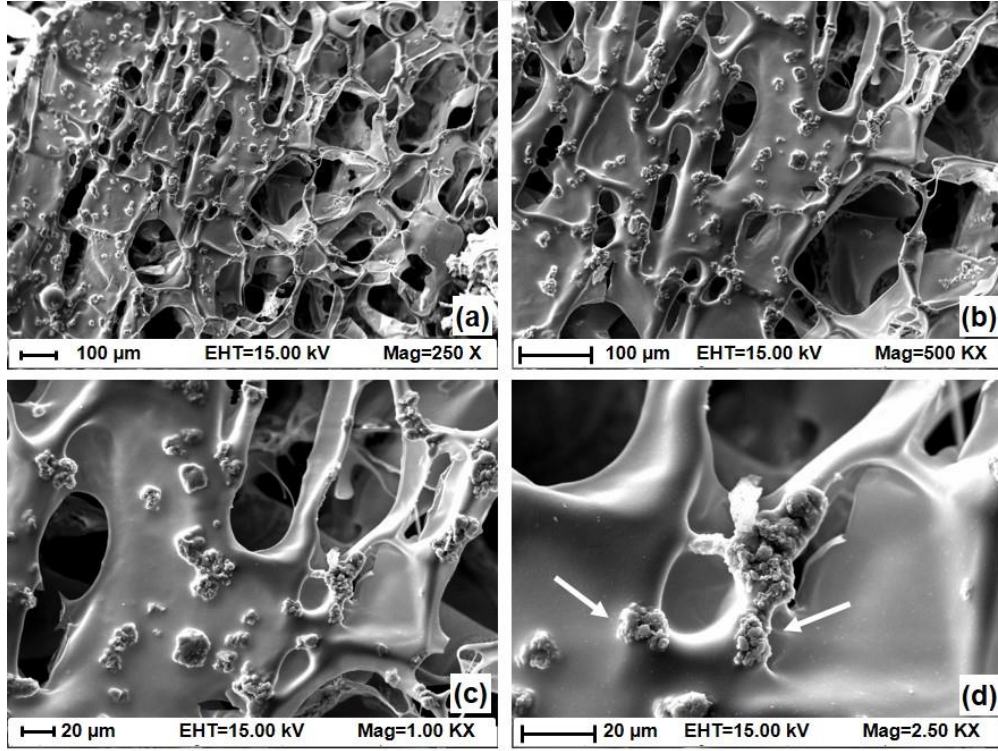
İskele başına (2 mm yükseklik, 9 mm çap) 1 mg PLGA nanopartikül içeren kitosan+Np ve kitosan-Np doku iskelelerine ait SEM görüntüleri Şekil 4.29’da verilmiştir.



Şekil 4.29. İskele başına 1 mg PLGA nanopartikül içeren kitosan+Np doku iskelelerinin farklı büyütmelerdeki SEM görüntüleri: (a) 250 X, (b) 500 X, (c) 1,000 X ve (d) 10,000 X; iskele başına 1 mg PLGA nanopartikül içeren kitosan-Np doku iskelelerinin farklı büyütmelerdeki SEM görüntüleri: (e) 250 X, (f) 500 X, (g) 1,000 X ve (h) 10,000 X. (Beyaz oklar iskele içerisindeki nanopartikülleri göstermektedir).

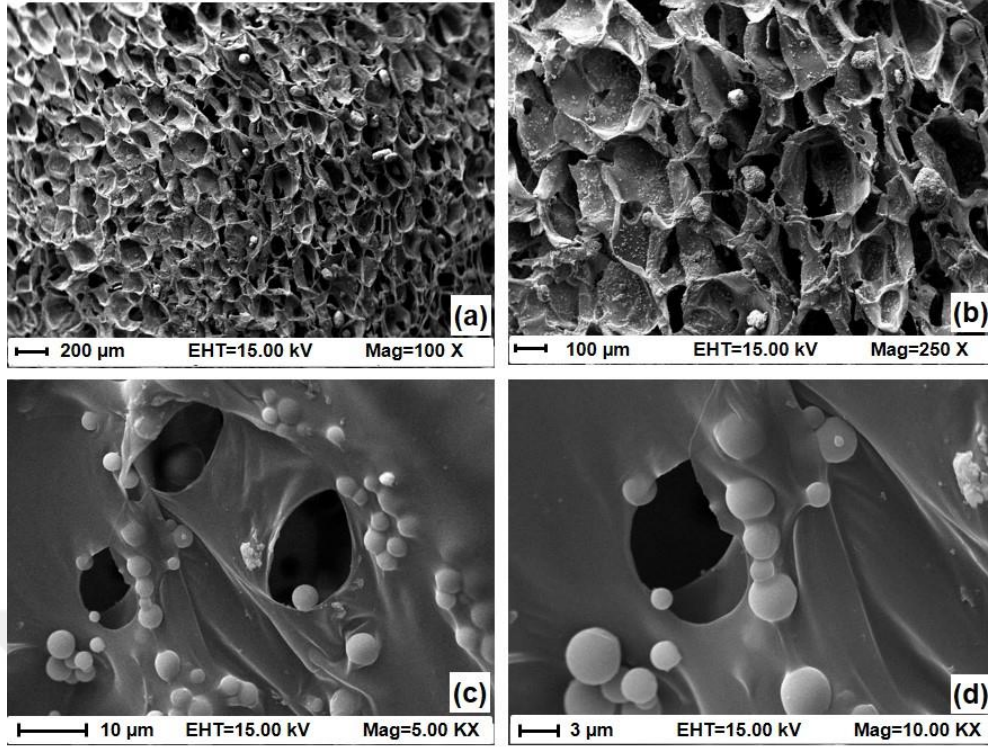
Şekil 4.29’da verilen SEM görüntüleri incelendiğinde, PLGA nanopartiküllerinin her iki yükleme yönteminde de kitosan doku iskelesinin yapısına başarılı bir şekilde katıldığı belirlenmiştir. Ancak kitosan+Np yapısında nanopartiküller daha homojen bir şekilde dağılırken (Şekil 4.29-a), kitosan-Np iskelesinde (Şekil 4.29-e) nanopartiküllerin bir araya geldikleri ve iskele gözenekliliğini azalttığı görülmüştür.

SEM görüntülerine göre, kitosan doku iskelelerine daha fazla PLGA nanopartikülün de katılabileceği düşünülmüş ve bu nedenle iki kat daha fazla nanopartikül, iskele başına 2 mg olacak şekilde üretim aşamasında eklenmiş ve bu iskeleye ait SEM görüntüsü Şekil 4.30’da verilmiştir. Ancak, kitosan iskelenin yapısına üretim aşamasında eklenen PLGA nanopartiküllerin miktarı iki katına çıkarıldığında, nanopartiküllerin iskele içerisinde çok fazla bir araya geldikleri belirlenmiştir (Şekil 4.30). Bu nedenle, iskele başına 1 mg PLGA nanopartikül eklenmesinin uygun olduğu sonucuna varılmıştır.



Şekil 4.30. İskele başına 2 mg PLGA nanopartikül içeren kitosan+Np doku iskelelerinin farklı büyütmelerdeki SEM görüntüleri: a) 250 X, b) 500 X, c) 1,000 X ve d) 2,500 X.

Kitosan doku iskelesi başına (2 mm yükseklik, 9 mm çap) 1 mg PLGA mikropartikül içeren kitosan+Mp doku iskelelerine ait SEM görüntüleri Şekil 4.31’de verilmiştir. Doku iskelesi başına 1 mg mikropartikül içeren kitosan/HA-Mp doku iskelelerine ait ise iyi SEM görüntüleri elde edilememiştir.

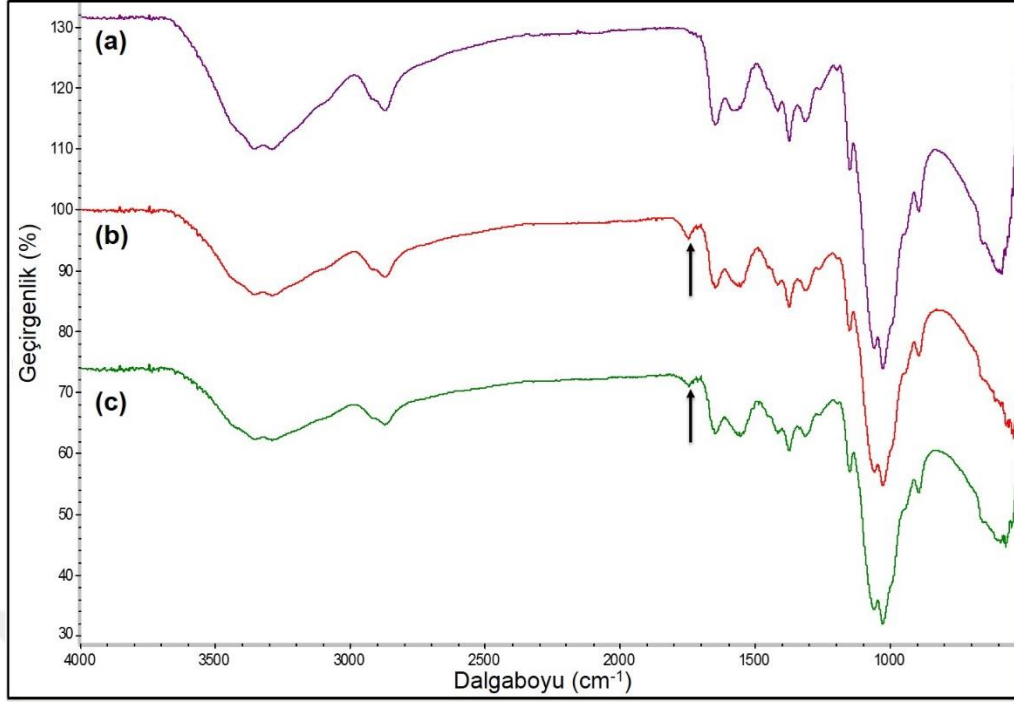


Şekil 4.31. 1 mg PLGA mikropartikül içeren kitosan+Mp doku iskelelerinin SEM görüntüleri: (a) 100 X, (b) 250 X, (c) 5,000 X ve (d) 10,000 X.

Şekil 4.31’de verilen SEM görüntüleri incelendiğinde, PLGA mikropartiküllerin kitosan+Mp doku iskelesi yapısı içerisinde homojen bir şekilde dağıldığı belirlenmiştir. Kitosan-Mp doku iskelelerine ait iyi görüntüler elde edilemediğinden, partiküllerin doku iskelesi içerisindeki yerleşimi konusunda herhangi bir yorum yapılamamıştır.

4.4.2.2. ATR-FTIR analizi

PLGA nano/mikropartiküllerin kitosan iskele yapısına başarılı bir şekilde katılıp katılmadığının kimyasal olarak kanıtlanması amacıyla ATR-FTIR analizi gerçekleştirilmiş ve elde edilen spektrumlar Şekil 4.32’de verilmiştir.



Şekil 4.32. PLGA nano/mikropartikül içeren ve içermeyen kitosan doku iskelelerine ait ATR-FTIR spektrumları: (a) boş kitosan doku iskelesi, (b) PLGA nanopartikül içeren kitosan doku iskelesi (kitosan+Np) ve (c) PLGA mikropartikül içeren kitosan doku iskelesi (kitosan+Mp).

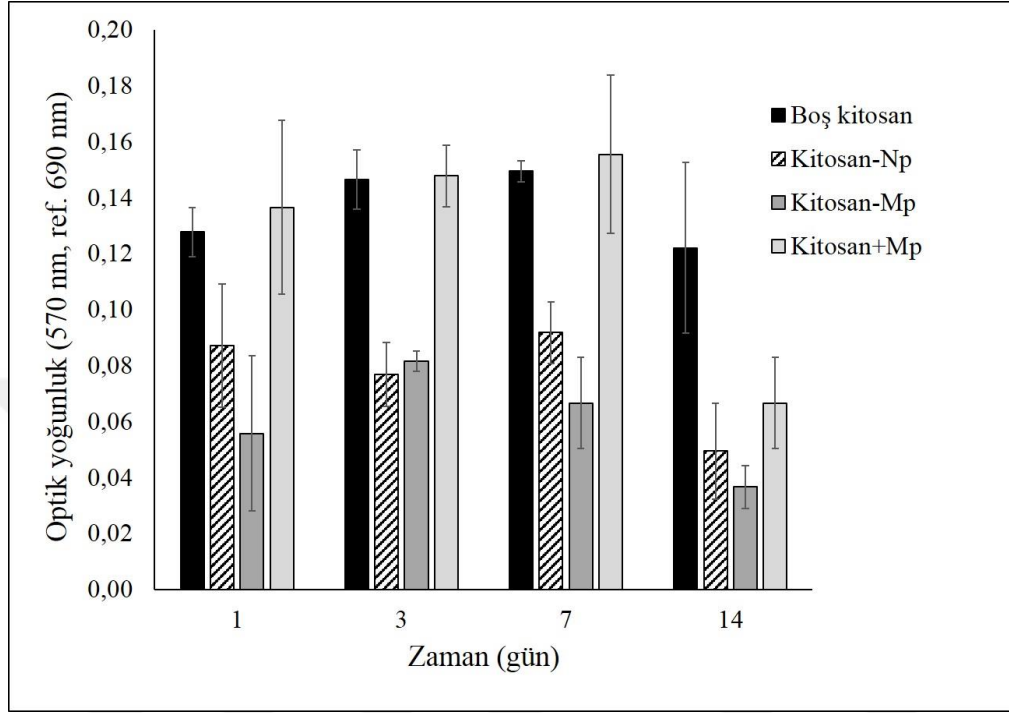
Sunulan ATR-FTIR spektrumları incelendiğinde boş kitosan doku iskelesine ait spektrumda (Şekil 4.32-a) gözlenmeyen 1760 cm⁻¹ dalga boyundaki PLGA'ya ait karakteristik C=O gerinim pikine, hem PLGA nanopartikül içeren kitosan doku iskelesine ait spektrumda (Şekil 4.32-b), hem de PLGA mikropartikül içeren kitosan doku iskelelerine ait spektrumda (Şekil 4.32-c) rastlanmıştır. Böylece üretim sırasında PLGA nano/mikropartiküllerin kitosan doku iskelelerine başarılı bir şekilde katıldığı belirlenmiştir.

4.4.3. MC3T3-E1 hücreleri ile yürütülen öncül hücre kültür çalışmaları

PLGA nano/mikropartikül yüklü kitosan doku iskelelerinden salınan melatoninin kemik doku mühendisliği açısından etkisinin değerlendirilmesi için ilk olarak preosteoblastik MC3T3-E1 hücreleri ile *in vitro* öncül hücre kültür çalışmaları gerçekleştirilmiştir. Öncelikle kitosan doku iskeleleri, hücre kültür çalışmalarında kullanılmadan önce etilen oksit gazı ve etanol-UV olmak üzere iki farklı yöntemle steril lenmişlerdir. Her iki yöntemin hücre canlılığı üzerinde olumsuz herhangi bir etkisinin olup olmadığının belirlenmesi amacıyla MTT analizleri gerçekleştirilmiştir. Ardından, kitosan doku iskelelerinin nötralizasyon yönteminin ve hücre ekim koşullarının hücre canlılığına etkisi incelenmiştir. Hücre canlılığı yine MTT analizi ile takip edilmiştir.

4.4.3.1. Etilen oksit gazı ile sterillenen kitosan doku iskeleleri ile yürütülen çalışmalar

Etilen oksit gazı ile sterillenen kitosan doku iskelelerinde üreyen MC3T3-E1 hücrelerinin mitokondriyal aktiviteleri 14 gün boyunca takip edilmiş ve elde edilen MTT grafiği Şekil 4.33'te sunulmuştur.



Şekil 4.33. Etilen oksit gazı ile sterillenen kitosan doku iskelelerinde üreyen MC3T3-E1 hücrelerine ait MTT grafiği.

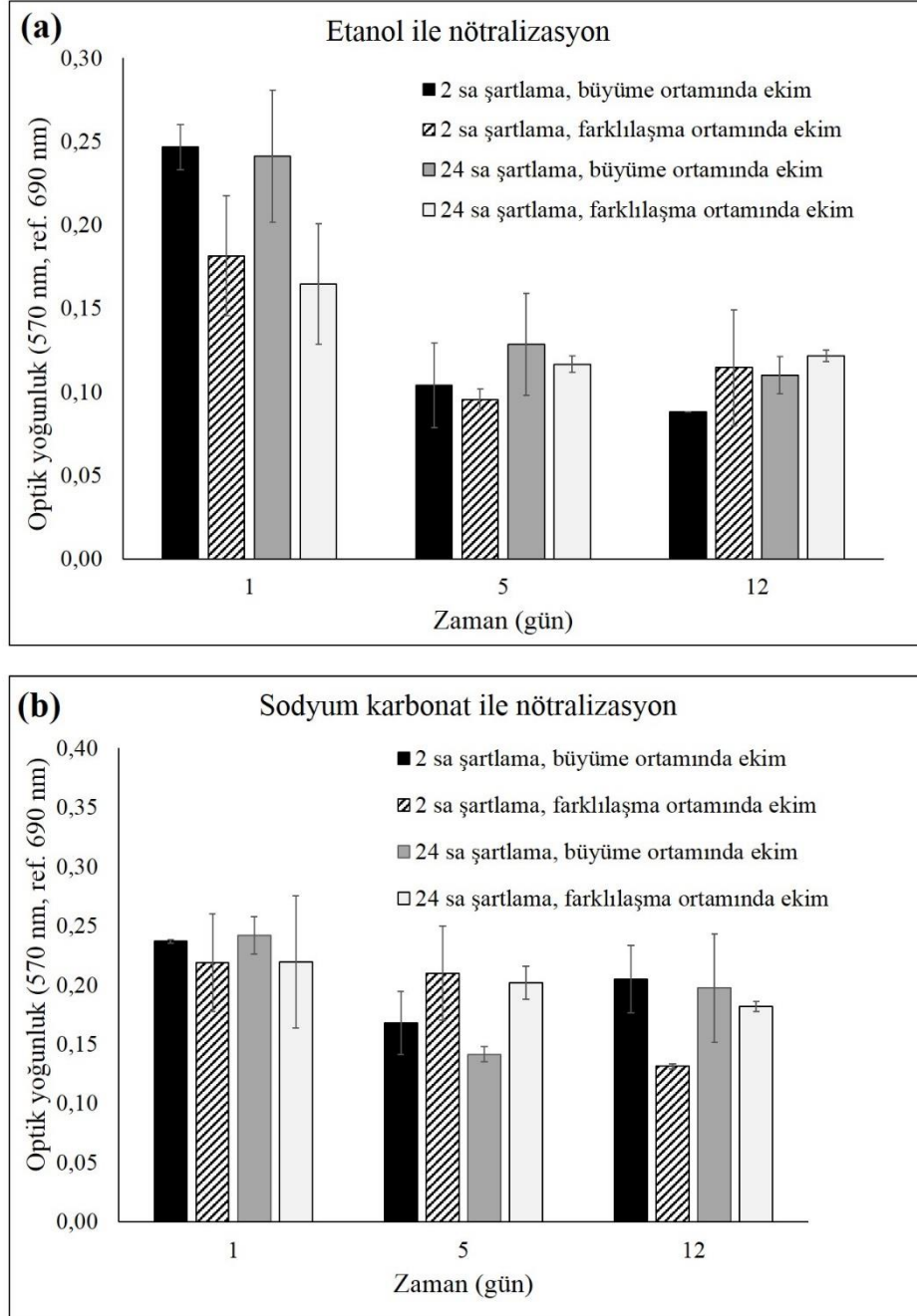
Şekil 4.33'te verilen optik yoğunluk değerleri incelendiğinde 14 gün boyunca yürütülen kültürdeki hücrelerin mitokondriyal aktivitelerinin oldukça düşük olduğu ve kültür süresi boyunca artmadığı belirlenmiştir. Hatta kültürün son gününde absorbans değerlerinin tüm gruplarda en düşük seviyeye ulaştığı görülmüştür. Ayrıca, kültürün tüm günlerindeki MTT değerlerinde gruplar arasında istatistiksel olarak da belirgin bir fark görülmemiştir ($p>0.05$).

Etilen oksit gazı ile sterillenen kitosan doku iskeleleri ile yürütülen *in vitro* hücre kültür çalışmaları sonucunda, hücrelerin canlılık değerleri beklenilenden çok düşük olduğundan sterilizasyon sonrası iskelelerden yeterince uzaklaştırılamayan etilen oksidin hücreler üzerinde toksik etki göstermiş olabileceği düşünülmüştür.

4.4.3.2. Etanol-UV ile sterillenen kitosan doku iskeleleri ile yürütülen çalışmalar

Doku iskelelerinin etilen oksit gazı ile sterilizasyonundan kaynaklı sorun olup olmadığının anlaşılması amacıyla sadece boş kitosan doku iskeleleri kullanılarak hücre kültür çalışmaları gerçekleştirilmiştir. Bu kısımda ayrıca kitosanın nötralizasyon yöntemi (etanol ve sodyum

karbonat ile nötralizasyon), hücre ekimi öncesinde iskelelerin serumlu kültür ortamında şartlanma süresi (2 sa ve 24 sa) ve hücrelerin iskelelere ekim ortamı (büyüme ortamı ve farklılaşma ortamı) gibi parametrelerin de hücre proliferasyonu üzerindeki etkileri 12 gün boyunca incelenmiştir. Etanol ve sodyum karbonat ile nötralize edilen kitosan doku iskelelerine farklı koşullarda ekilen hücrelerin MTT grafikleri sırasıyla, Şekil 4.34-a ve Şekil 4.34-b’de verilmiştir.



Şekil 4.34. (a) Etanol ve (b) sodyum karbonat ile nötralize edilen kitosan doku iskelelerinde üreyen MC3T3-E1 hücrelerine ait MTT grafiği.

Hem etanol (Şekil 4.34-a) hem de sodyum karbonat (Şekil 4.34-b) ile nötralize edilen kitosan doku iskelelerinde üreyen hücrelerin oldukça düşük mitokondriyal aktiviteye sahip oldukları ve kültür süresi boyunca da hücre canlılığında herhangi bir artışın olmadığı belirlenmiştir. Ayrıca, MTT değerlerinde gruplar arasında istatistiksel olarak anlamlı bir fark da görülmemiştir ($p>0.05$). Bununla birlikte, doku iskelelerinin serumlu kültür ortamı içerisinde şartlanma süresinin ve hücre ekiminin büyüme ortamı veya farklılaşma ortamı ile yapılmasının da hücre canlılığı açısından belirgin bir fark oluşturmadığı görülmüştür. Dolayısıyla, hücrelerin kitosan iskelelerde çoğalmasındaki sıkıntının nötralizasyon yöntemi veya hücre ekim koşulları ile ilgili olmadığı, iskele üretiminde kullanılan kitosanın kimyasal yapısından kaynaklı olabileceği sonucuna varılmıştır.

Doğal polimerler her ne kadar doku mühendisliği alanında birçok avantaja sahip olsa da, üretimden kaynaklı farklılıklara bağlı olarak aynı özelliklere sahip doku iskelelerinin geliştirilmesi açısından tekrarlanabilirliği düşüktür. Ayrıca, bazı doğal polimerlerin kaynağı sınırlı olduğundan oldukça pahalıdır [2, 173]. Şimdiye kadar grubumuz tarafından gerçekleştirilen çalışmalarda, kitosan doku iskelelerinde kültüre edilen MC3T3-E1 hücreleri istenilen şekilde çoğalmasına rağmen, bu tez çalışmasında olumlu sonuçlar elde edilememiştir. Bu durumun da kitosanın doğal bir polimer olmasından dolayı üretim serisindeki farklılıktan kaynaklanmış olabileceği düşünülmüştür.

Sonuç olarak, dondurarak kurutma yöntemiyle üretilen kitosan iskelelerde preosteoblastik MC3T3-E1 hücrelerinin istenilen üreme davranışına ulaşamamış ve geliştirilen sistemden salınan melatoninin kemik doku mühendisliğindeki etkinliği incelenememiştir. Bu nedenle, hücre yapışmasını ve biyoaktivitesini arttırmak amacıyla kitosan iskelelerin hidroksiapatit (HAp) ile modifiye edilmesine karar verilmiştir.

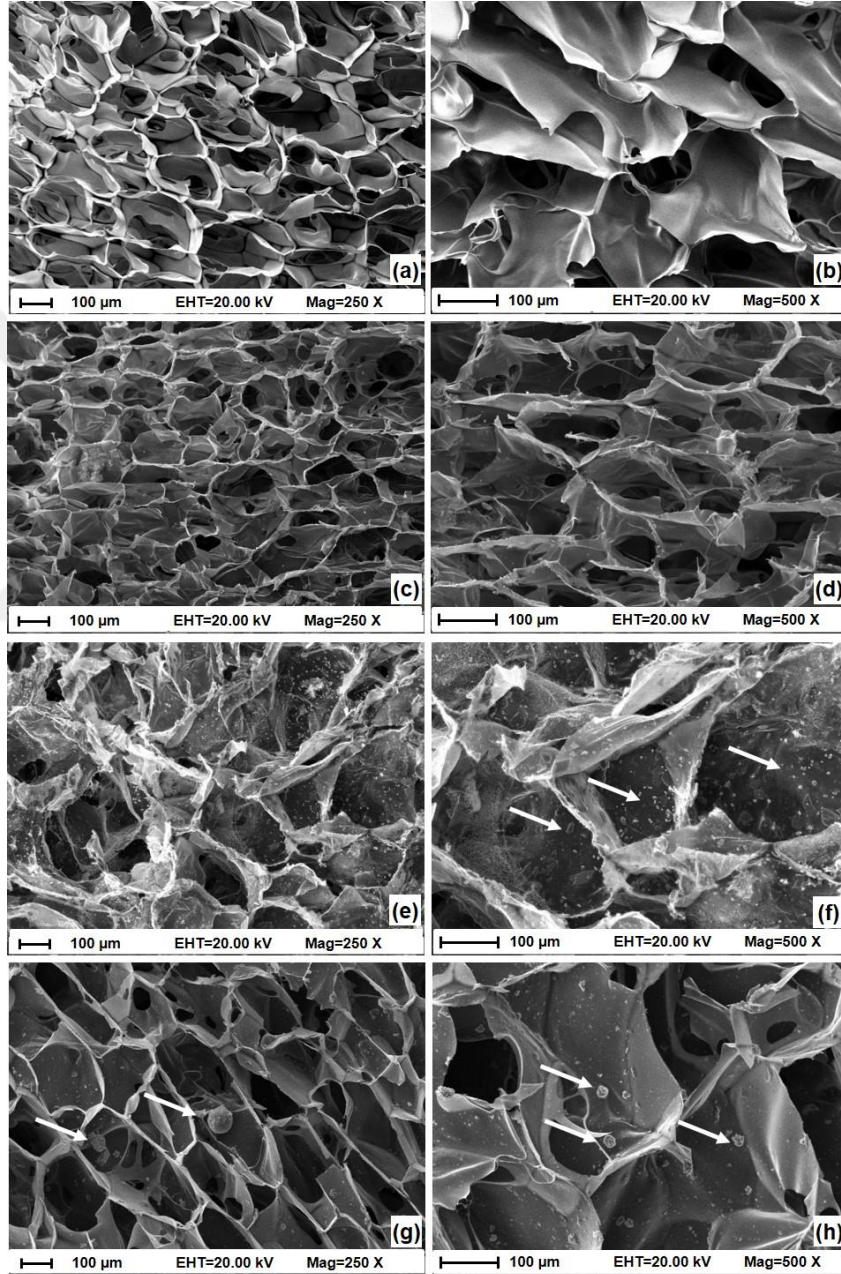
4.5. Farklı Deasetilasyon Derecesine Sahip Kitosan Doku İskeleleri ve Kitosan/HAp Doku İskelelerinin Üretimi, Karakterizasyonu ve Hücre Kültür Çalışmaları

Çalışmanın bu aşamasında, hem kitosanın deasetilasyon derecesinin hem de kitosan doku iskelelerinin HAp ile modifiye edilmesinin hücre yapışması ve üremesi üzerindeki etkisi incelenmiştir. Bu amaçla, öncelikle %75-85 ile >%85 deasetilasyon derecesine sahip kitosan doku iskeleleri dondurarak kurutma yöntemiyle üretilmiştir. Kitosanın HAp ile modifikasyonu için ise, %75-85 deasetilasyon derecesine sahip kitosan çözeltisine %1.5 (w/v) konsantrasyonunda toz ve boncuk formundaki HAp partikülleri eklenerek kitosan/HAp doku iskeleleri üretilmiş ve bu iskeleler sırasıyla, kitosan/toz HAp ve

kitosan/boncuk HAp olarak ifade edilmiştir. Toz formdaki HAp partikülleri $9.59 \pm 0.12 \mu\text{m}$, boncuk formdaki HAp partikülleri ise $55\text{-}110 \mu\text{m}$ boyutlara sahiptir.

4.5.1. SEM analizi

Kitosanın deasetilasyon derecesinin iskele gözenekliliğini ne şekilde etkilediğinin ve HAp partiküllerin iskele yapısına başarılı bir şekilde katılıp katılmadığının belirlenmesi amacıyla hazırlanan doku iskelelerin SEM görüntüleri çekilmiş ve Şekil 4.35'te verilmiştir.

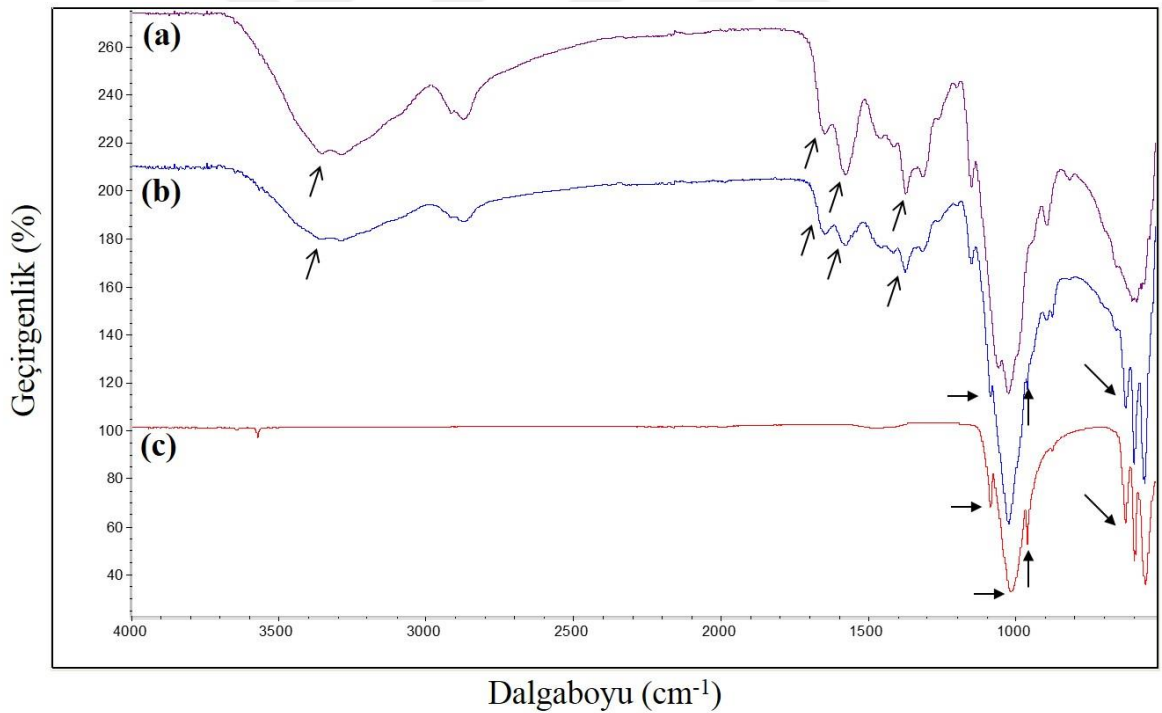


Şekil 4.35. Kitosan doku iskelelerinin farklı büyütme ölçeklerindeki SEM görüntüleri: %75-85 deasetilasyon derecesine sahip kitosan doku iskelesi (a) 250 X, (b) 500 X; >%85 deasetilasyon derecesine sahip kitosan doku iskelesi (c) 250 X, (d) 500 X; Kitosan/toz HAp doku iskelesi (e) 250 X, (f) 500 X; Kitosan/boncuk HAp doku iskelesi (g) 250 X, (h) 500 X. (Toz ve boncuk formdaki HAp partikülleri beyaz oklarla gösterilmiştir).

Deasetilasyon derecesi %75-85 olan kitosan kullanılarak hazırlanan doku iskelelerinin gözeneklerinin daha önce de belirtildiği gibi içsel olarak bağlantılı olduğu belirlenmiştir (Şekil 4.35-a,b). Kitosanın deasetilasyon derecesi arttığı durumda (>%85), iskele gözeneklerinin çok belirgin olmamakla birlikte biraz kapandığı ancak içsel olarak yine birbirine bağlı olduğu görülmüştür (Şekil 4.35-c,d). Kitosanın yapısına toz formunda HAp'in katılması durumunda ise HAp partiküllerin iskele içerisinde homojen bir şekilde dağıldığı, ancak iskele gözeneklerinin bir miktar kapandığı belirlenmiştir (Şekil 4.35-e,f). Kitosan/boncuk HAp doku iskelelerinin SEM görüntüleri incelendiğinde ise boncuk formundaki HAp partiküllerin yapıya başarılı ve homojen bir şekilde katıldığı, ayrıca iskelenin gözenek yapısını belirgin bir şekilde değiştirmedeği gözlenmiştir (Şekil 4.35-g,h).

4.5.2. ATR-FTIR analizi

Boncuk formundaki HAp partiküllerin kitosan iskele yapısına başarılı bir şekilde katılıp katılmadığının kimyasal olarak belirlenmesi amacıyla ATR-FTIR analizi gerçekleştirilmiş ve elde edilen spektrumlar Şekil 4.36'da verilmiştir.



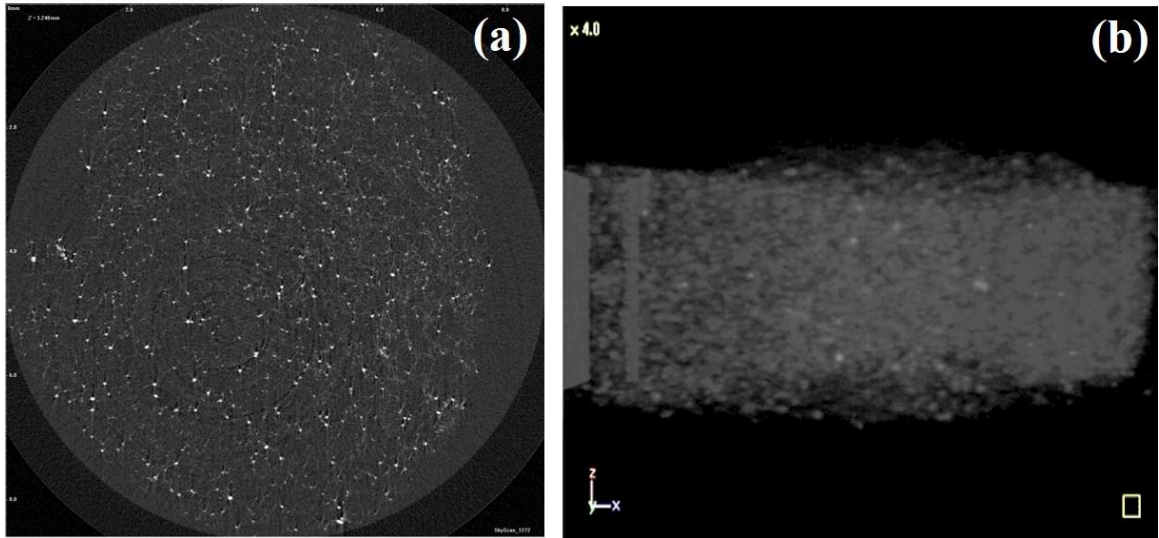
Şekil 4.36. ATR-FTIR spektrumları: (a) kitosan doku iskelesi, (b) kitosan/boncuk HAp doku iskelesi ve (c) boncuk formdaki HAp.

Kitosan doku iskelesine ait spektrumda (Şekil 4.36-a) kitosana ait 3400 cm^{-1} 'de N-H gerilme titreşimlerine, 1662 cm^{-1} 'de amid I, 1605 cm^{-1} 'de NH_2 bükülme ve 1393 cm^{-1} 'de amid III'e ait karakteristik pikler açıkça görülmektedir [174]. Bu pikler aynı zamanda kitosan/boncuk

HAp doku iskelesine ait spektrumda da bulunmaktadır (Şekil 4.36-b). Boncuk formdaki HAp'ın spektrumu incelendiğinde, HAp'ın yapısındaki PO_4^{3-} grubuna ait karakteristik pikler 1095, 1045, 965, 608 ve 570 cm^{-1} dalga boylarında, OH grubuna ait pik ise 633 cm^{-1} dalga boyunda görülmüştür (Şekil 4.36-c) [172, 175]. HAp'a ait bu piklerin aynı zamanda kitosan/boncuk HAp doku iskelelerine ait spektrumda da olması (Şekil 4.36-b) boncuk formundaki HAp partiküllerin kitosan doku iskelesinin yapısına başarılı bir şekilde katıldığını kanıtlamaktadır.

4.5.3. μ -CT analizi

Kitosan/boncuk HAp doku iskelelerine ait mikro-bilgisayarlı tomografi (μ -CT) görüntüleri Şekil 4.37'de verilmiştir. Görüntülerdeki gri ve parlak bölgeler mineral fazı ifade etmektedir. Kitosan/HAp doku iskelesinin yarı yüksekliğinden alınan kesitte, boncuk formundaki HAp partiküllerin iskele içerisine homojen bir şekilde dağıldığı görülmektedir (Şekil 4.37-a). İskeleye ait üç eksenli genel görüntüde ise, yine HAp partiküllerin iskele içerisinde homojen dağılımı görülmekle birlikte, gözenek yapısının iskelenin kalınlığı boyunca korunduğu belirlenmiştir (Şekil 4.37-b).



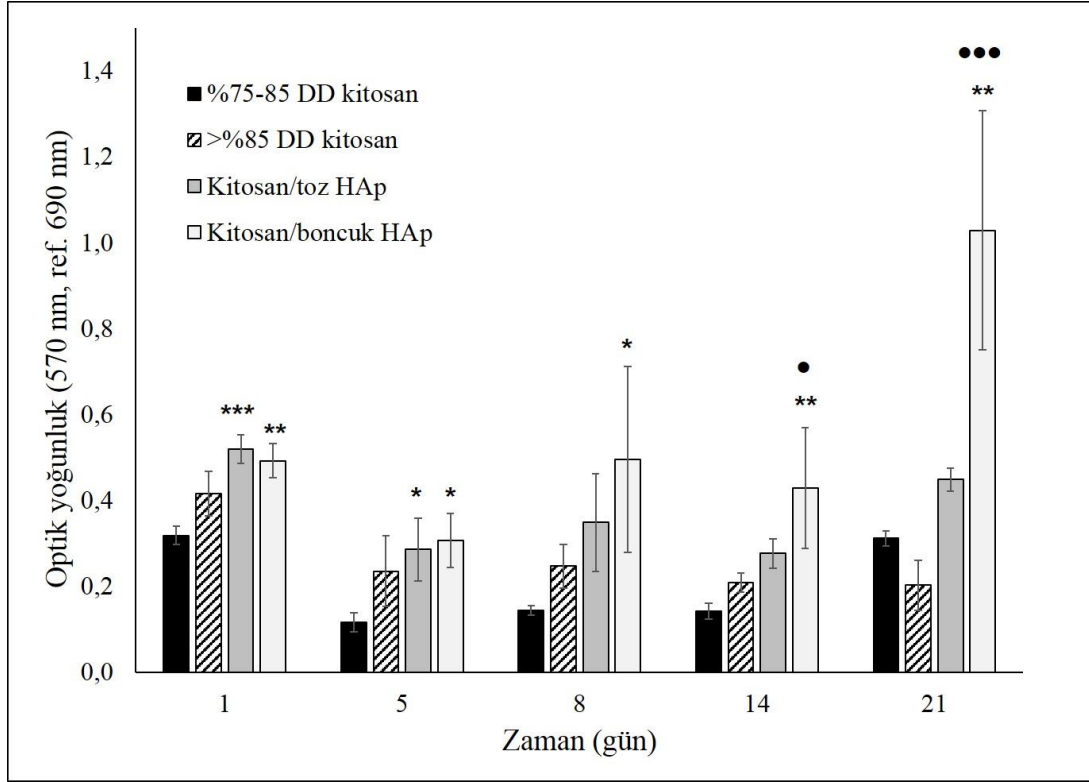
Şekil 4.37. Kitosan/boncuk HAp doku iskelesine ait μ CT görüntüleri: (a) xy ekseninde merkez görüntüsü ve (b) xyz ekseninde genel görünüm.

4.5.4. Hücre kültür çalışmaları

Hem kitosanın deasetilasyon derecesinin hem de yapıya katılan toz ve boncuk formundaki HAp'ın MC3T3-E1 hücrelerinin yapışması ve proliferasyonu üzerindeki etkilerinin incelenmesi amacıyla 21 gün boyunca *in vitro* hücre kültür çalışmaları yürütülmüştür. Hücre canlılığı MTT analizi ile, iskele içerisindeki dağılımları ve morfolojileri ise SEM analizi ile incelenmiştir.

4.5.4.1. MTT analizi

Farklı deasetilasyon derecesine sahip kitosan iskeleler ile toz ve boncuk formundaki HAp'i içeren kitosan/HAp doku iskelelerinde üreyen hücrelerin mitokondriyal aktiviteleri Şekil 4.38'de sunulmuştur.



Şekil 4.38. Farklı deasetilasyon derecelerine sahip kitosan doku iskeleleri ile toz ve boncuk formundaki HAp ile modifiye edilen kitosan/HAp doku iskeleleri üzerinde kültüre edilen MC3T3-E1 hücrelerinin MTT sonuçları. (İstatistiksel olarak anlamlı farklar: %75-85 DD kitosan kontrol grubu iken: * $p<0.05$, ** $p<0.01$, *** $p<0.001$; kitosan/toz HAp kontrol grubu iken: • $p<0.05$, •• $p<0.01$, ••• $p<0.001$, $n=3$).

Şekil 4.38'de verilen MTT grafiği incelendiğinde, %75-85 ve >%85 deasetilasyon derecesine sahip kitosan iskelelerde üreyen hücrelerin mitokondriyal aktivitelerinin oldukça düşük olduğu, kitosanın deasetilasyon derecesinin artmasının (>%85) hücre proliferasyonu üzerinde belirgin bir etkisinin olmadığı ve bu iskelelerde üreyen hücrelerin optik yoğunluk değerlerinin kontrole göre istatistiksel olarak anlamlı derecede farklı olmadığı belirlenmiştir ($p>0.05$). Hatta kültürün ilerleyen günlerinde bu gruplara ait MTT değerlerinin düştüğü görülmüştür. Buna karşın, toz ve boncuk formundaki HAp'in kitosan yapısına katıldığı durumda ise hücre üremesinin belirgin bir şekilde arttığı gözlemlenmiştir. Kültürün 1. ve 5. günlerinde kitosan/toz HAp doku iskelelerinde üreyen hücrelerin optik yoğunluk değerlerinin kontrol grubuna göre yüksek olduğu belirlenmiş ($p<0.001$ ve $p<0.01$), ancak kültürün ilerleyen günlerinde hücrelerin MTT değerlerinde belirgin bir artış görülmemiştir.

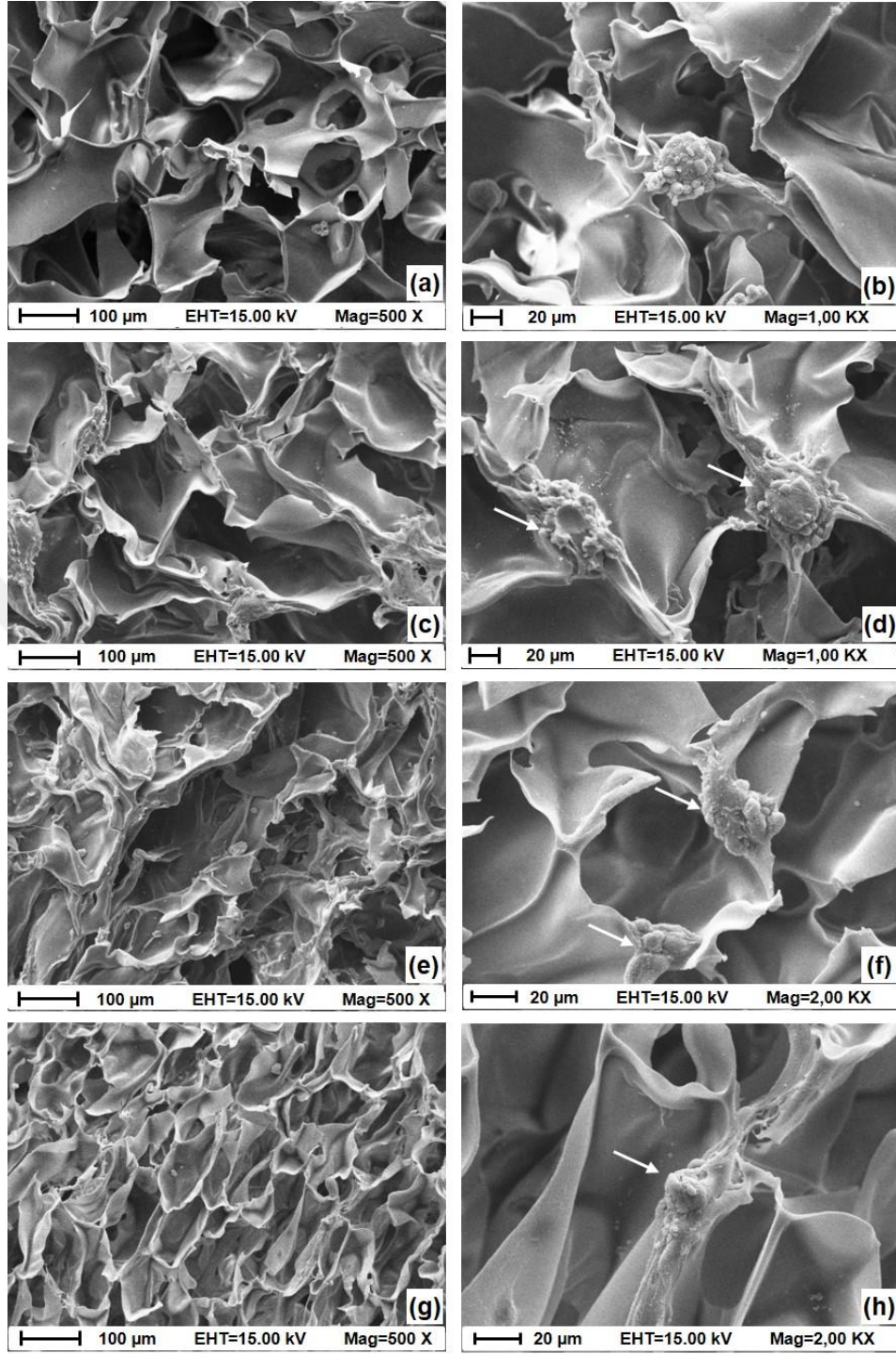
Kitosan/boncuk HAp iskelelerde üreyen hücrelerin mitokondriyal aktivitelerinin ise özellikle kültürün 8. gününden itibaren diğer gruplara göre oldukça yüksek olduğu belirlenmiş ve kültürün 21. gününde kitosan/toz HAp iskelesinin kontrol olduğu durumda, istatistiksel olarak oldukça önemli bir artış meydana gelmiştir ($p<0.001$).

4.5.4.2. SEM analizi

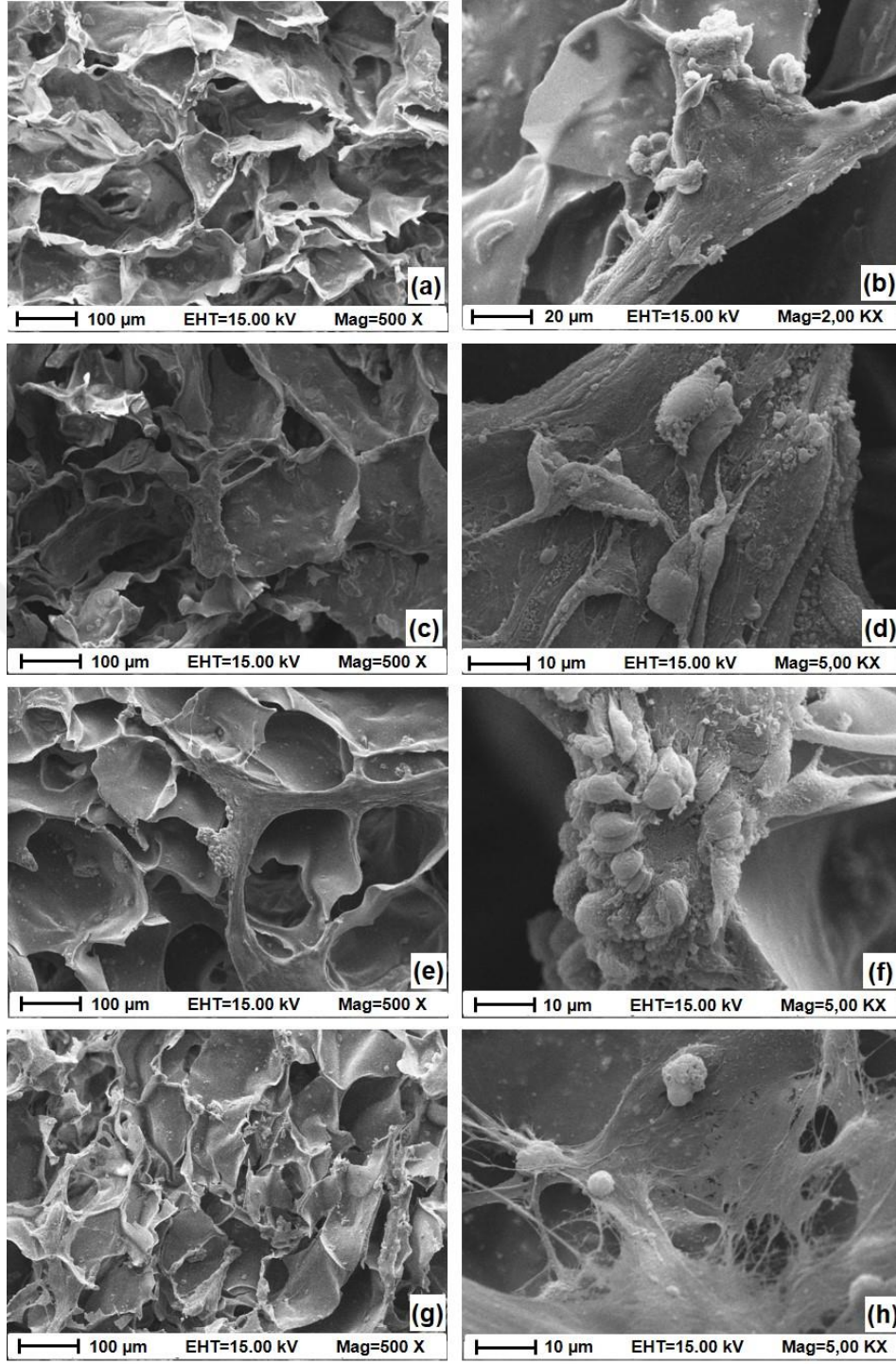
Hücrelerin kitosan ve kitosan/HAp doku iskelelerindeki morfolojilerinin ve yayılımlarının incelenmesi amacıyla kültürün 14. ve 21. günlerinde SEM görüntüleri alınmıştır. Farklı deasetilasyon derecesine sahip kitosan doku iskelelerinde ve kitosan/HAp doku iskelelerinde üreyen hücrelerin SEM görüntüleri sırasıyla, Şekil 4.39 ve Şekil 4.40'ta verilmiştir.

Şekil 4.39'da verilen SEM görüntüleri incelendiğinde, hem %75-85 hem de >%85 deasetilasyon derecesine sahip kitosan doku iskelelerinde oldukça az sayıda hücreye rastlanmış ve MTT sonuçlarında da görüldüğü üzere kitosanın deasetilasyon derecesinin artmasının MC3T3-E1 hücrelerinin iskeleye tutunması ve iskele içerisinde çoğalması üzerinde belirgin bir etkisinin olmadığı doğrulanmıştır. Şekil 4.40'ta verilen kitosan/toz HAp ve kitosan/boncuk HAp doku iskelelerinde üreyen hücrelere ait SEM görüntüleri incelendiğinde ise, her iki doku iskelesinde de oldukça fazla sayıda hücreye rastlanmış ve hücrelerin iskelelerin yüzeyini büyük ölçüde kapladıkları görülmüştür. Ancak, kültürün 21. gününde kitosan/boncuk HAp doku iskelelerinde üreyen hücrelerin yoğun bir şekilde hücre dışı matris sentezledikleri ve kollajen fibriller ürettikleri belirlenmiştir.

Hem MTT verilerinden hem de SEM görüntülerinden elde edilen sonuçlar doğrultusunda, çalışmanın ilerleyen aşamalarında kitosan/boncuk HAp doku iskelelerinin kullanılmasına karar verilmiş ve tez çalışmasının bundan sonraki bölümlerinde bu iskeleler sadece kitosan/HAp olarak ifade edilmiştir.



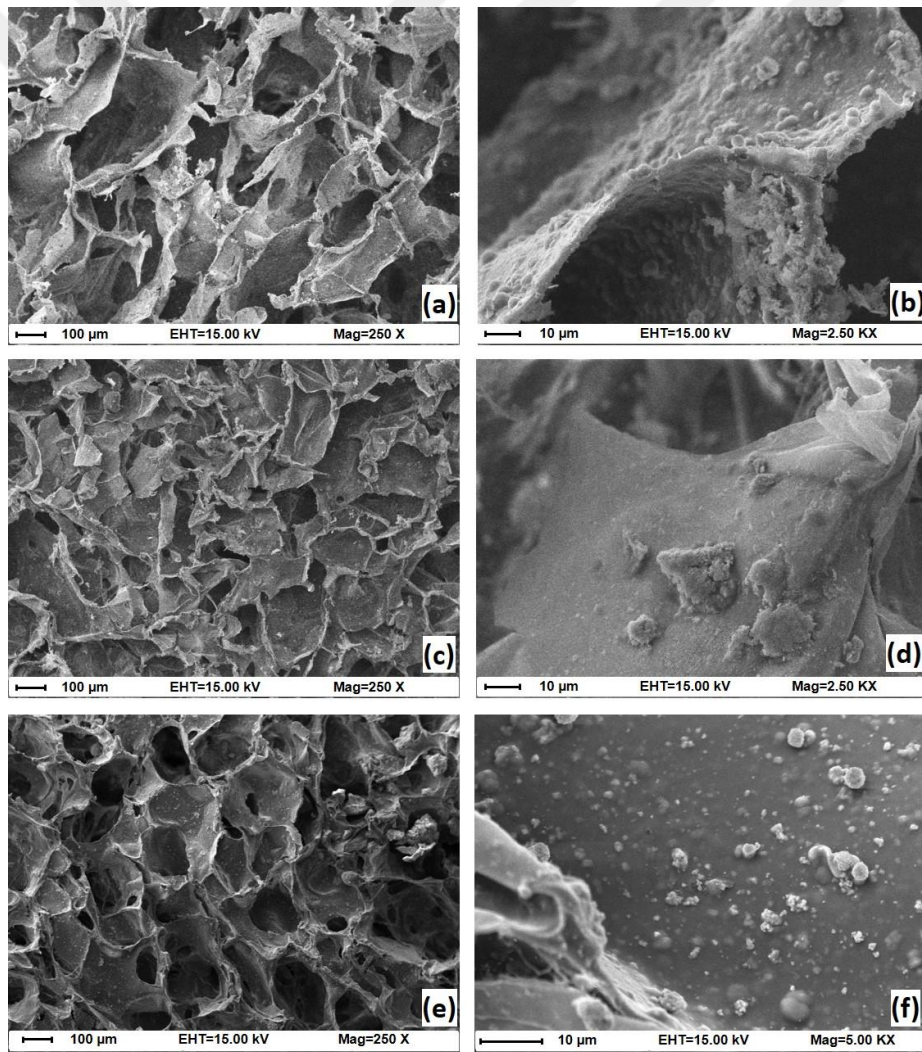
Şekil 4.39. %75-85 DD'ye sahip kitosan doku iskeleleri üzerinde üreyen MC3T3-E1 hücrelerinin SEM görüntüleri: (a) 14. gün (500 X), (b) 14. gün (1,000 X), (c) 21. gün (500 X), (d) 21. gün (1,000 X); >%85 DD'ye sahip kitosan doku iskeleleri üzerinde üreyen MC3T3-E1 hücrelerinin SEM görüntüleri: (e) 14. gün (500 X), (f) 14. gün (2,000 X), (g) 21. gün (500 X), (h) 21. gün (2,000 X). (Hücreler beyaz oklarla gösterilmiştir).



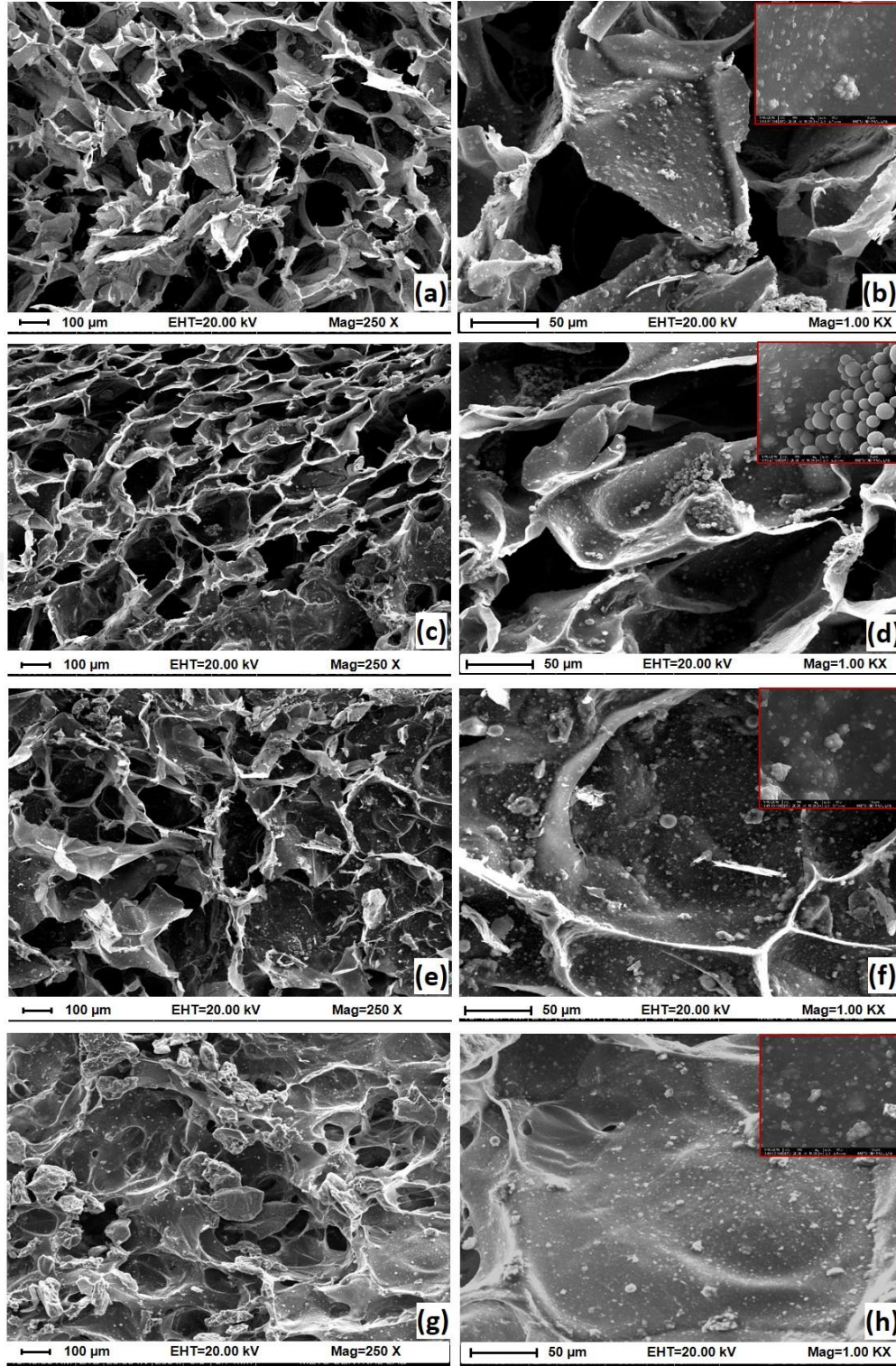
Şekil 4.40. Kitosan/toz HAp doku iskeleleri üzerinde üreyen MC3T3-E1 hücrelerinin SEM görüntüleri: (a) 14. gün (500 X), (b) 14. gün (2,000 X), (c) 21. gün (500 X), (d) 21. gün (5,000 X); Kitosan/boncuk HAp doku iskeleleri üzerinde üreyen MC3T3-E1 hücrelerinin SEM görüntüleri: (e) 14. gün (500 X), (f) 14. gün (5,000 X), (g) 21. gün (500 X), (h) 21. gün (5,000 X).

4.6. Kitosan/HAp doku iskelelerine PLGA nano/mikropartiküllerin yüklenmesi

Önceki çalışmalarda, boş kitosan doku iskelelerine ne kadar PLGA nano/mikropartikül yükleneceğinin belirlenmesi amacıyla SEM analizi gerçekleştirilmiş ve sonuç olarak iskele başına (2 mm yükseklik, 9 mm çap) 1 mg partikülün yüklenmesine karar verilmişti. Ancak yapılan hücre kültür çalışmalarında istenilen sonuç elde edilememiş ve kitosan iskeleleri boncuk formundaki HAp ile modifiye edilmişti. Yapıya HAp'in katılması iskele gözenekliliğini bir miktar azalttığından, iskelelere eklenecek partiküllerin miktarının azaltılması gerektiği düşünülmüştür. Bu nedenle iskele başına (2 mm yükseklik, 9 mm çap) 1.0 mg ve 0.5 mg olacak şekilde PLGA nano/mikropartikülleri eklenmiş ve hazırlanan iskelelerin morfolojileri ile partiküllerin iskele içerisindeki dağılımını gösteren SEM görüntüleri sırasıyla, Şekil 4.41 ve Şekil 4.42'de verilmiştir.



Şekil 4.41. İskele başına 1 mg partikül yüklenen kitosan/HAp doku iskelelerine ait farklı büyütme ölçeklerindeki SEM görüntüleri: (a) kitosan/HAp+Mp (250 X), (b) kitosan/HAp+Mp (2,500 X), (c) kitosan/HAp+Np (250 X), (d) kitosan/HAp+Np (2,500 X), (e) kitosan/HAp-Np (250 X) ve (f) kitosan/HAp-Np (5,000 X).

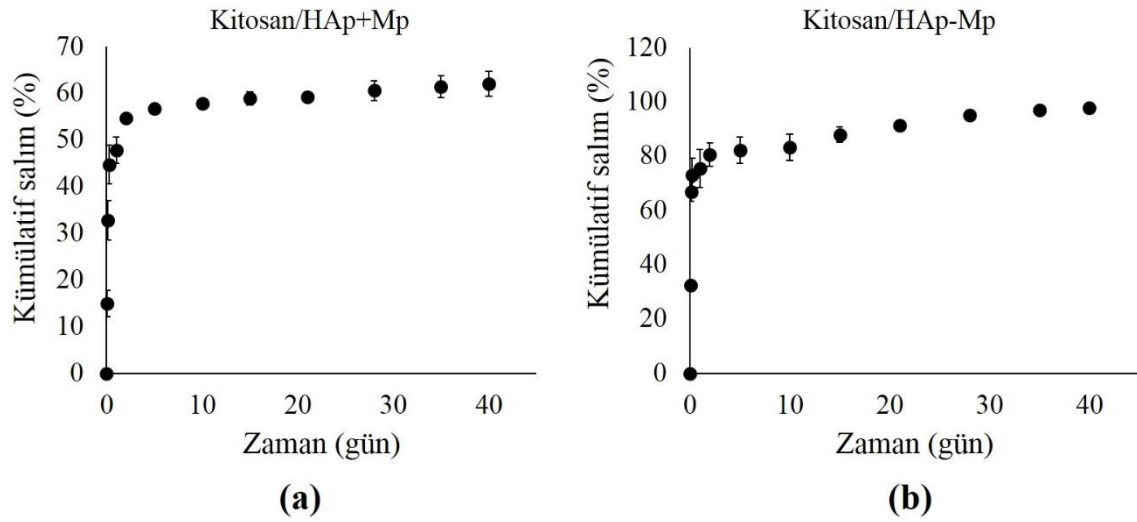


Şekil 4.42. İskele başına 0.5 mg partikül yüklenen kitosan/HAp doku iskelelerine ait farklı büyütmelelerdeki SEM görüntüleri: (a) kitosan/HAp+Mp (250 X), (b) kitosan/HAp+Mp (1,000 X), (c) kitosan/HAp-Mp (250 X), (d) kitosan/HAp-Mp (1,000 X), (e) kitosan/HAp+Np (250 X), (f) kitosan/HAp+Np (1,000 X), (g) kitosan/HAp-Np (250 X) ve (h) kitosan/HA-Np (1,000 X). Küçük fotoğraflar iskelelerin 10,000X büyütmelelerine aittir.

Doku iskeleleri için gözeneklilik; hücre üremesi, infiltrasyonu ve dokudaki besin ve atık maddelerin difüzyonunun sağlanması açısından önemli bir özelliktir [176]. İskele başına 1 mg partikül eklendiği durumda (Şekil 4.41), iskelelerin gözeneklerinin kapandığı ve gözenekliliğin oldukça azaldığı belirlenmiştir. Bu durum ilerdeki hücre kültürü çalışmalarında olumsuz durum yaratacağından partikül sayısının yarıya düşürülmesine karar verilmiştir. PLGA nano/mikropartiküllerin iskelelere 0.5 mg olacak şekilde yüklendiği durumdaki SEM görüntüleri incelendiğinde (Şekil 4.42) ise doku iskelelerinin gözenekliliğinin fazla değişmediği ve hem PLGA nanopartiküllerin hem de mikropartiküllerin kitosan/HAp doku iskeleleri içerisinde homojen bir şekilde dağıldığı belirlenmiştir. Bu nedenle, çalışmanın bundan sonraki aşamalarında PLGA nano/mikropartiküllerin kitosan/HAp doku iskelesi başına 0.5 mg olacak şekilde yüklenmesine karar verilmiştir.

4.6.1. Kitosan/HAp doku iskelelerinden melatoninin *in vitro* salım kinetiği

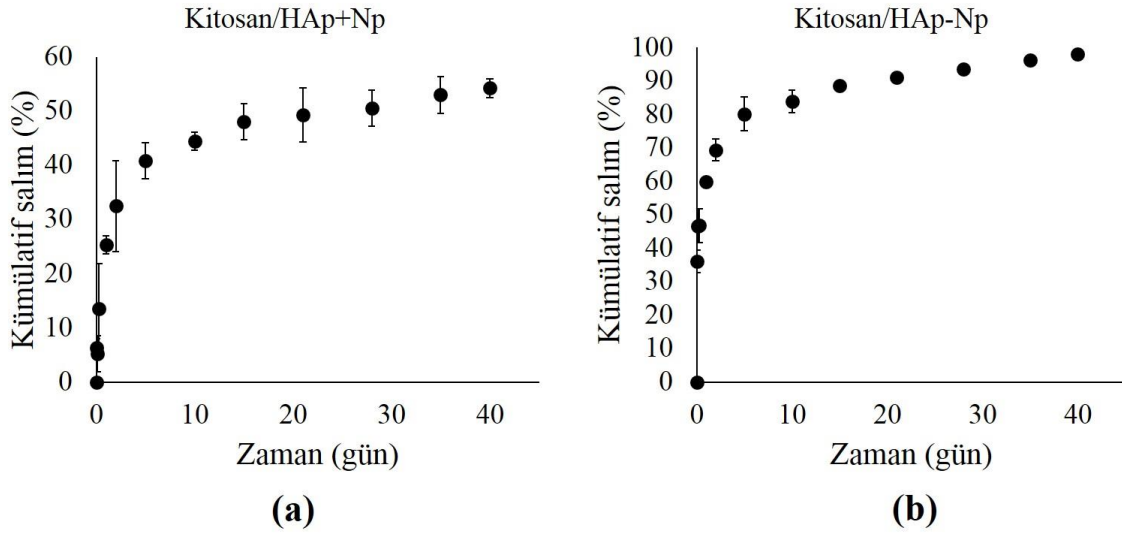
Doku iskelelerinden melatonin salım kinetiği 40 gün süren *in vitro* salım çalışmaları ile belirlenmiştir. PLGA mikropartikül yüklü ve PLGA nanopartikül yüklü kitosan/HAp doku iskelelerinden salınan kümülatif melatonin yüzdeleri sırasıyla, Şekil 4.43 ve Şekil 4.44'te verilmiştir.



Şekil 4.43. PLGA mikropartikül yüklü doku iskelelerinden kümülatif yüzde melatonin salımı: (a) kitosan/HAp+Mp, (b) kitosan/HAp-Mp.

Kitosan/HAp+Mp ve kitosan/HAp-Mp doku iskelelerinde bulunan melatoninin sırasıyla, yaklaşık %55 (Şekil 4.43-a) ve %70'inin (Şekil 4.43-b) ilk iki günde ani patlama etkisi ile salındığı belirlenmiştir. Kırk günlük salım sonunda ise mikropartiküllerce hapsedilen

melatoninin kitosan/HAp+Mp ve kitosan/HAp-Mp sistemlerinden sırasıyla, %62 ve %98'i difüzyon yoluyla salınmıştır.



Şekil 4.44. PLGA nanopartikül yüklü doku iskelelerinden kümülatif yüzde melatonin salımı: a) kitosan/HAp+Np, b) kitosan/HAp-Np.

Kitosan/HAp+Np ve kitosan/HAp-Np doku iskelelerindeki melatoninin sırasıyla, yaklaşık %32 (Şekil 4.44-a) ve %70'i (Şekil 4.44-b) ani patlama etkisi ile ikinci günün sonunda salınmıştır. Kırkıncı güne kadar ise PLGA nanopartiküller içerisinde hapsedilmiş melatonin difüzyon yoluyla partiküllerden uzaklaşmıştır. Kırk günlük salım sonuna kadar ise kitosan/HAp+Np ve kitosan/HAp-Np iskeleleri içerisindeki PLGA nanopartiküllerinde bulunan melatoninin sırasıyla, yaklaşık %54 ve %98'i kontrollü ve yavaş bir şekilde difüzyon mekanizmasıyla salınmıştır. Melatoninin difüzyon mesafesinin artışına bağlı olarak, PLGA nano/mikropartiküllerin kitosan iskelenin yapısına üretim sırasında katıldığı durumdaki salımın, iskele üretimi sonrasında emdirme yöntemiyle eklenerek üretildiği koşula göre daha yavaş bir şekilde gerçekleştiği belirlenmiştir. Salım çalışmaları sonucunda, PLGA nano/mikropartikül yüklü kitosan/HAp doku iskelelerinden 40 günlük salınan toplam melatonin miktarları Çizelge 4.5'te sunulmuştur.

Çizelge 4.5. Kitosan/HAp doku iskelelerinden salınan toplam melatonin miktarları.

Salınan miktarlar (μg melatonin/iskele)						
Doku İskelesi	1. sa	1. gün	5. gün	10. gün	20. gün	40. gün
Kitosan/HAp+Mp	2.55 ± 0.48	8.11 ± 0.47	9.64 ± 0.01	9.83 ± 0.01	10.06 ± 0.18	10.55 ± 0.45
Kitosan/HAp-Mp	5.49 ± 0.36	12.83 ± 1.19	13.96 ± 0.84	14.14 ± 0.84	15.53 ± 0.13	16.60 ± 0.13
Kitosan/HAp+Np	0.45 ± 0.06	1.80 ± 0.06	2.90 ± 0.12	3.15 ± 0.06	3.50 ± 0.18	3.84 ± 0.06
Kitosan/HAp-Np	2.55 ± 0.24	4.24 ± 0.01	5.68 ± 0.36	5.94 ± 0.24	6.46 ± 0.01	6.94 ± 0.07

Gerçekleştirilen *in vitro* salım çalışmaları sonucunda hem PLGA nanopartikül hem de PLGA mikropartikül yüklü kitosan/HAp doku iskelelerinden hücre kültür ortamında salınacak olan melatonin mikromolar konsantrasyonda olduğu belirlenmiştir. Literatürdeki çalışmalar incelendiğinde, nano-mikromolar mertebedeki melatonin konsantrasyonlarının, çeşitli hücrelerin osteojenik farklılaşmasını tetiklediği belirlenmiştir. Sonuç olarak, tez kapsamında geliştirilen doku iskelesi-temelli sistemden salınan melatonin miktarının istenilen düzeyde olduğu görülmüştür.

Doku iskelelerinden melatonin salım verileri çeşitli ilaç salım modelleri (sıfırıncı derece, birinci derece, Higuchi, Hixson-Crowell, Korsmeyer-Peppas) kullanılarak matematiksel olarak analiz edilmiştir. Elde edilen grafiklerin lineer regresyon katsayıları (R^2) 1'e en yakın olan model salım kinetiğini ifade eden model olarak belirlenmiştir (Çizelge 4.6).

Çizelge 4.6. Kitosan/HAp doku iskelelerinden melatonin salım kinetiği ve mekanizması.

Doku İskelesi	Sıfırıncı derece		Birinci derece		Higuchi		Hixson-Crowell		Korsmeyer-Peppas		
	R^2	K_0 ($\mu\text{g}\cdot\text{sa}^{-1}$)	R^2	K_1 (sa^{-1})	R^2	K_H ($\mu\text{g}\cdot\text{sa}^{-1/2}$)	R^2	K_{HC} ($\text{sa}^{-1/3}$)	R^2	K (sa^{-n})	n
Kitosan/HAp+Mp	0.9389	0.0871	0.9297	0.0030	0.9838	0.1447	0.9468	0.0002	0.9744	0.4670	0.0400
Kitosan/HAp-Mp	0.9721	0.2486	0.9673	0.0055	0.9679	0.4028	0.9625	0.0102	0.8881	0.5933	0.0704
Kitosan/HAp+Np	0.8270	0.0041	0.7672	0.0046	0.9286	0.1713	0.8552	0.0003	0.9151	0.1818	0.1604
Kitosan/HAp-Np	0.8574	0.0056	0.8191	0.0002	0.9913	0.1881	0.9719	0.0011	0.9801	0.047	0.0540

Doku iskelelerinden melatonin salımının da partiküllerden melatonin salımında olduğu gibi, tüm iskeleler için Higuchi salım modeline uyduğu belirlenmiştir. Dolayısıyla, PLGA nano/mikropartikül yüklü kitosan/HAp doku iskelelerinden melatonin salımının ağırlıklı olarak difüzyon mekanizmasıyla gerçekleştiği söylenebilir. Korsmeyer-Peppas modeline

göre ise n değerinin 0.45'ten küçük olduğu, dolayısıyla difüzyonun Fick yasasına uyduğu belirlenmiştir.

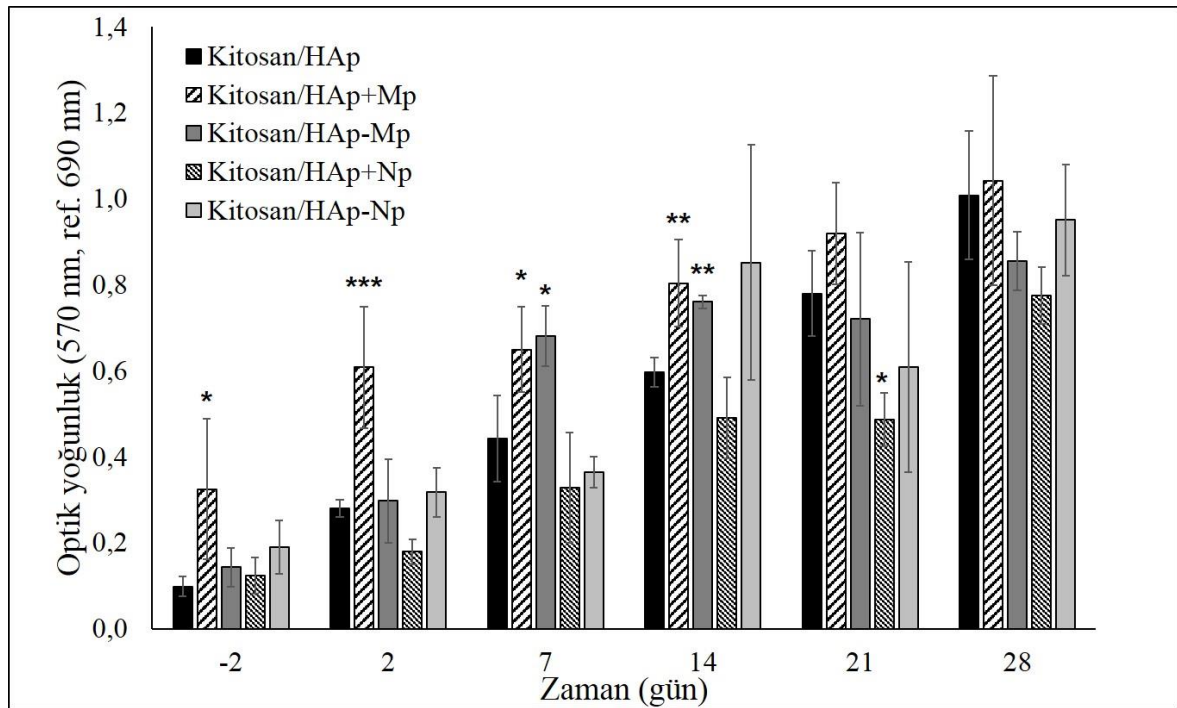
4.6.2. Kitosan/HAp doku iskeleleri ile yürütülen hücre kültür çalışmaları

Geliştirilen tüm kitosan/HAp-bazlı doku iskelelerinden salınan melatoninin MC3T3-E1 hücrelerinin osteojenik farklılaşması üzerindeki etkisinin incelenmesi amacıyla 28 gün süren *in vitro* hücre kültür çalışmaları yürütülmüştür. Bu çalışmalarda kitosan/HAp, kitosan/HAp+Mp, kitosan/HA-Mp, kitosan/HAp+Np ve kitosan/HAp-Np olmak üzere 5 farklı doku iskelesi kullanılmıştır.

MC3T3-E1 hücreleri preosteoblastik hücrelerdir ve kültür ortamındaki β -gliserol fosfat ve askorbik asit gibi farklılaşma faktörlerinin varlığında olgun osteoblastlara dönüşmektedir [56]. Bu hücrelerin melatonin içeren PLGA nano/mikropartikül yüklü kitosan/HAp doku iskeleleri içerisindeki proliferasyonu ve osteojenik farklılaşmasını incelemek amacıyla uygulanan analizler ve sonuçları aşağıda detaylı bir şekilde anlatılmıştır.

4.6.2.1. MTT analizi

MC3T3-E1 hücrelerinin PLGA nano/mikropartikül yüklü kitosan/HAp-bazlı doku iskelelerindeki mitokondriyal aktivitelerinin belirlenmesi için MTT analizi gerçekleştirilmiş ve elde edilen veriler Şekil 4.45'te verilmiştir.



Şekil 4.45. Kitosan/HAp-bazlı doku iskelelerinde kültüre edilen MC3T3-E1 hücrelerinin 28 günlük MTT sonuçları. (İstatistiksel olarak anlamlı farklar: n=3, * p<0.05, ** p<0.01, *** p<0.001, kitosan/HAp kontrol grubudur).

Şekil 4.45'te verilen MTT grafiğinde, hücrelerin ekim sonrasında tüm doku iskelelerine tutunduğu ve kültür süresi boyunca çoğaldığı belirlenmiştir. Dolayısıyla tüm iskelelerin hücre yapışması ve çoğalması için uygun olduğu sonucuna varılmıştır. Ancak, kültürün özellikle ilk günlerinde kitosan/HAp+Mp iskelelerinde üreyen hücrelerin mitokondriyal aktivitelerinin diğer iskelelerde üreyen hücrelerinkine göre istatistiksel olarak anlamlı derecede yüksek olduğu tespit edilmiştir. Bu durumun, kitosan/HAp+Mp iskelelerinden ani patlama etkisi ile salınan melatoninin hücre proliferasyonunu artırması ile ilgili olduğu düşünülmüştür. Kültürün 7. gününde kitosan/HAp+Mp ve kitosan/HAp-Mp gruplarına ait optik yoğunluk değerlerinin kontrole göre istatistiksel olarak yüksek olduğu gözlemlenmiştir ($p<0.05$). Yalnızca kültürün 21. gününde kitosan/HAp+Np doku iskelesinde üreyen hücrelerin MTT değerlerinin kontrole göre istatistiksel olarak düşük olduğu ($p<0.05$), diğer günlerde ise nanopartikül yüklü doku iskelelerine ait MTT değerleri ile kontrol arasında fark olmadığı belirlenmiştir ($p>0.5$).

Literatürdeki çeşitli çalışmalarda serbest melatoninin mikromolar konsantrasyonlarının insan kemik hücreleri, insan osteoblastik hücre hattı, kemik iliği kökenli insan mezankimal kök hücreleri, 3T3L1 preadipositleri ve MC3T3-E1 hücreleri gibi normal hücre hatlarının proliferasyonunu arttırdığı belirlenmiştir [10, 57, 59, 177, 178]. Ancak, başka bir çalışmada da PLGA mikropartiküllerden mikromolar konsantrasyonda salınan melatoninin insan mezankimal hücrelerinin proliferasyonu üzerinde belirgin bir etkisinin olmadığı gözlenmiştir [61]. Sonuç olarak, melatoninin farklı hücre türlerinin proliferasyonu üzerindeki etkileri değişiklik göstermekle birlikte, yapılan çalışmalarda melatoninin hücre proliferasyonuna etkisi konusunda net bir sonuç bulunmamaktadır. Dolayısıyla, melatoninin hücrelerin mitokondriyal aktivitesi üzerindeki etkisinin, hem hücre tipi hem de melatonin konsantrasyonu ile ilişkili olduğu söylenebilir.

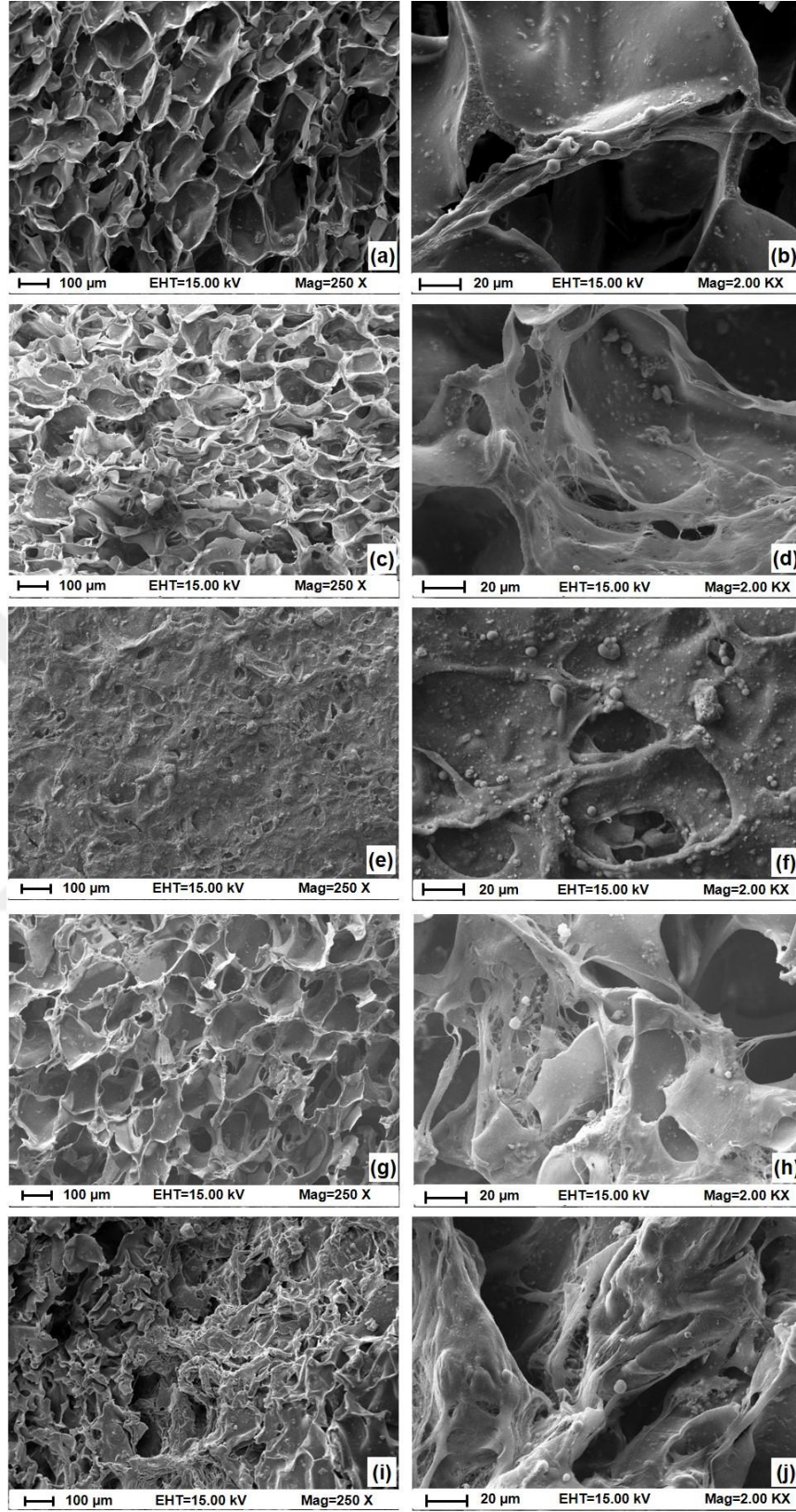
Sunulan tez çalışmasında PLGA nano/mikropartiküllerden salınan melatonin konsantrasyonları mikromolar mertebededir. PLGA mikropartikül yüklü kitosan/HAp doku iskelelerinden salınan melatonin kültürün ilk 14 günlük kısmında MC3T3-E1 hücrelerinin proliferasyonunu önemli derecede artırırken, PLGA nanopartikül yüklü kitosan/HAp doku iskelelerinden salınan melatoninin ise hücre proliferasyonu üzerinde belirgin bir etkisinin olmadığı görülmüştür.

4.6.2.2. SEM analizi

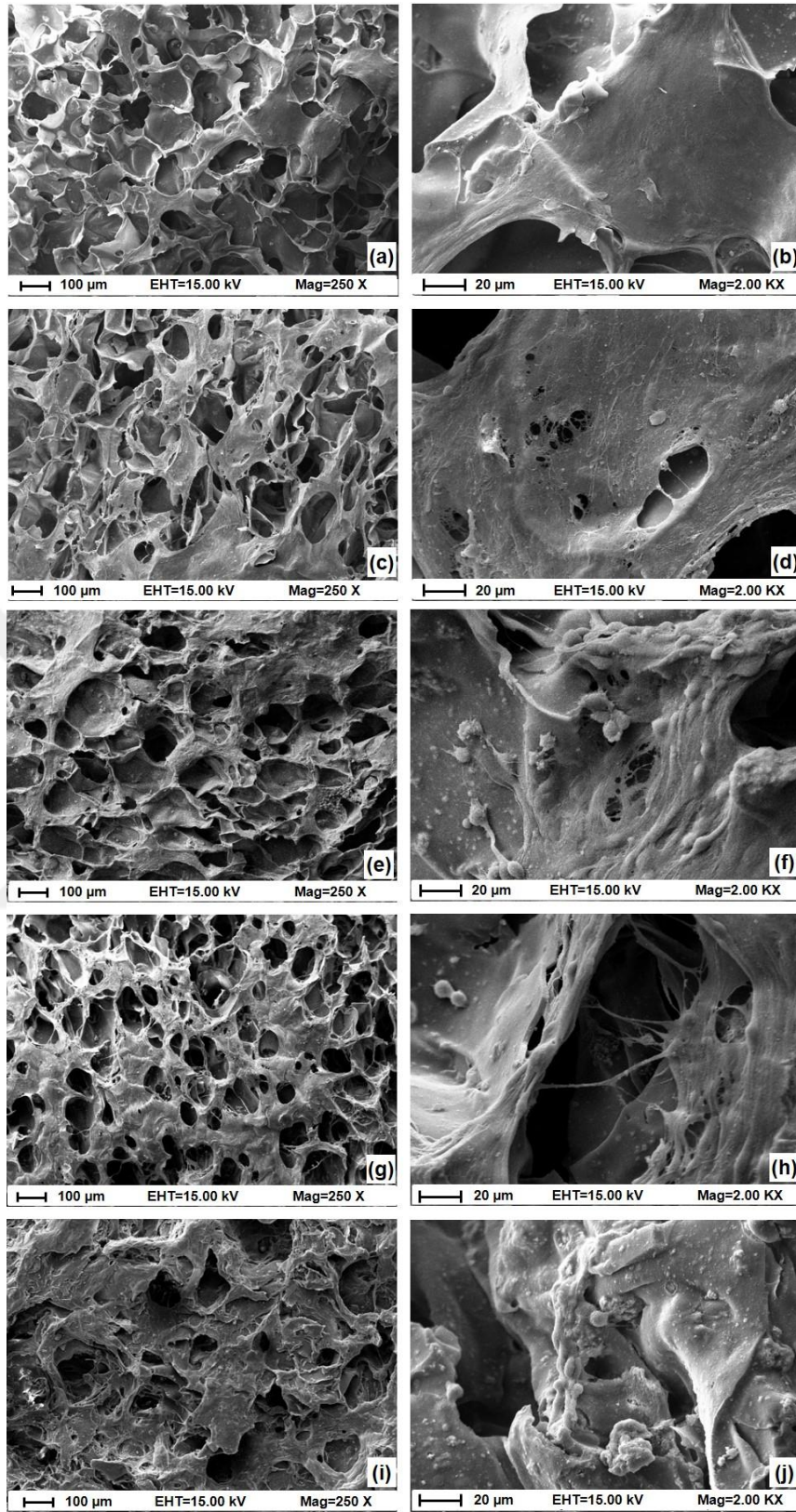
Üretilen 5 farklı doku iskelesinin yüzey ve dikey kesitlerine ait SEM görüntüleri alınarak hücre-hücre ve hücre-malzeme etkileşimleri ile hücrelerin iskelenin gözeneklerinden ne kadar içerlere kadar göç ettikleri belirlenmiştir.

Melatonin yüklü PLGA nano/mikropartikül içeren ve içermeyen kitosan/HAp doku iskelelerinin yüzeyindeki hücrelerin morfolojilerini incelemek amacıyla kültürün 7., 14. ve 21. günlerine ait SEM görüntüleri çekilmiş ve sırasıyla, Şekil 4.46, Şekil 4.47 ve Şekil 4.48’de verilmiştir.

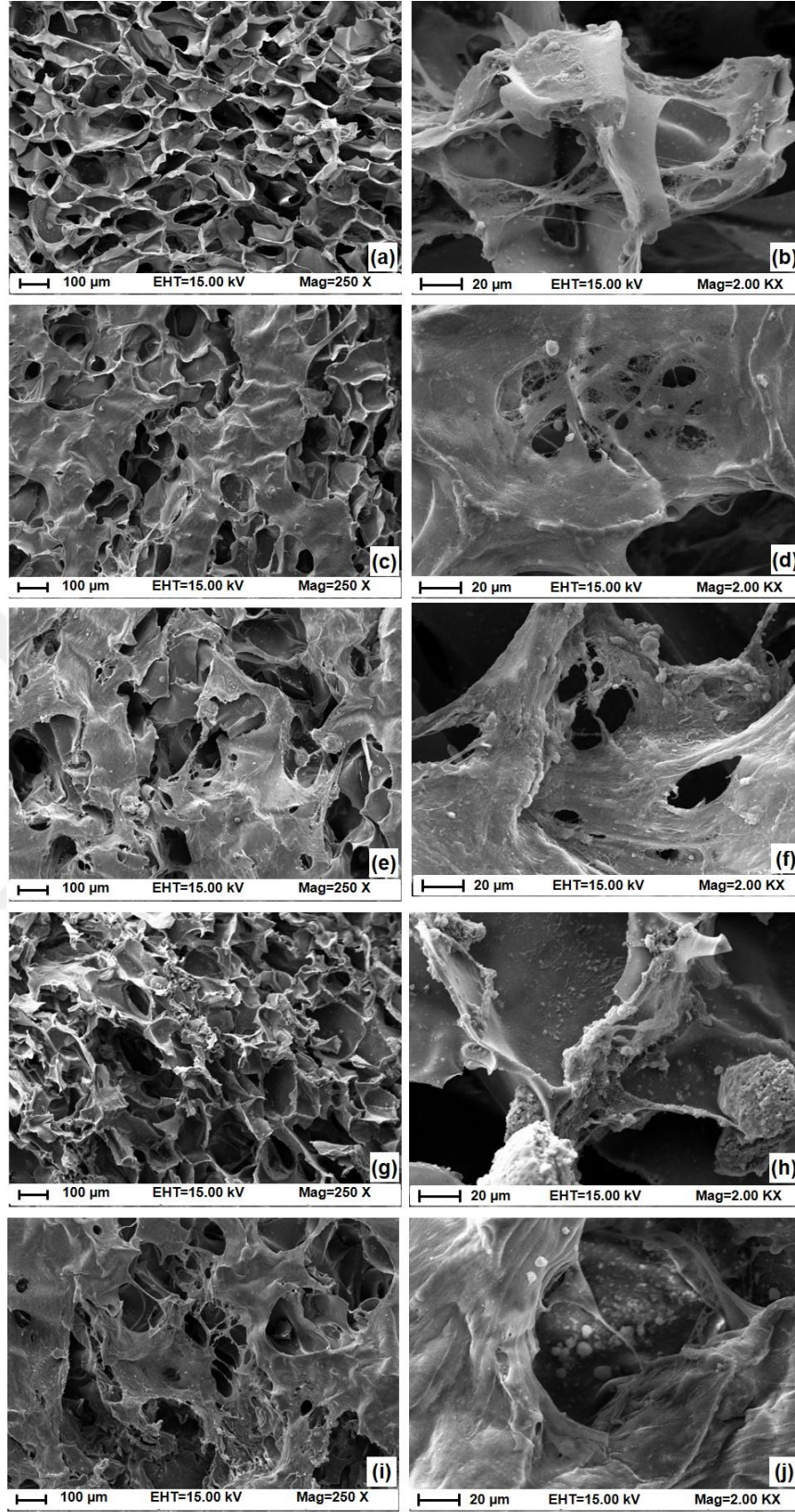




Şekil 4.46. Doku iskelelerinde üreyen MC3T3-E1 hücrelerinin kültürün 7. gününe ait yatay kesit SEM görüntüleri: (a) kitosan/HAp (250 X), (b) kitosan/HAp (2,000 X), (c) kitosan/HAp+Mp (250 X), (d) kitosan/HAp+Mp (2,000X), (e) kitosan/HAp-Mp (250 X), (f) kitosan/HAp-Mp (2,000 X), (g) kitosan/HAp+Np (250 X), (h) kitosan/HAp+Np (2,000 X), (i) kitosan/HAp-Np (250 X), (j) kitosan/HAp-Np (2,000 X).



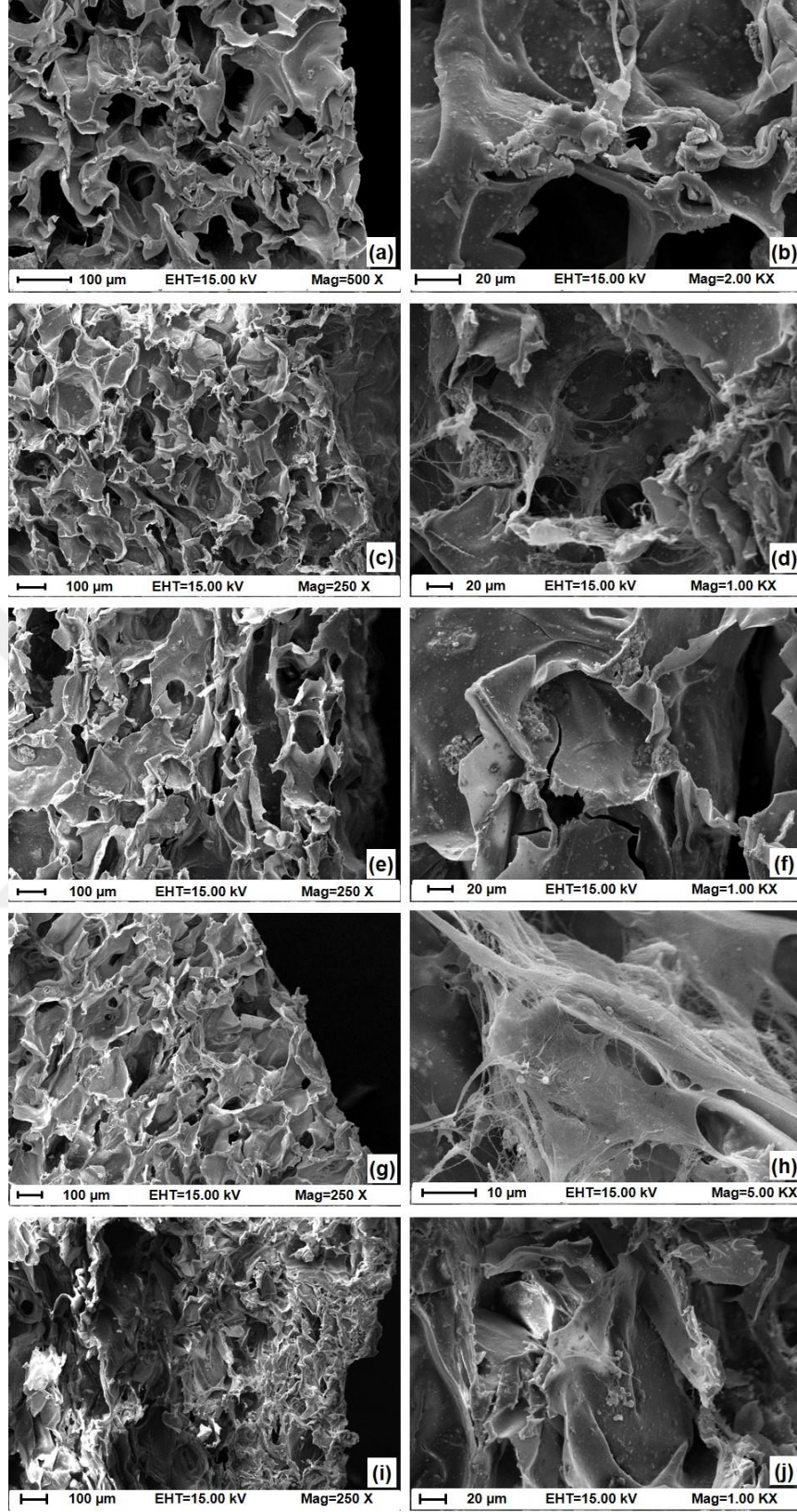
Şekil 4.47. Doku iskelelerinde üreyen MC3T3-E1 hücrelerinin kültürün 14. gününe yatay kesit SEM görüntüleri: (a) kitosan/HAp (250 X), (b) kitosan/HAp (2,000 X), (c) kitosan/HAp+Mp (250 X), (d) kitosan/HAp+Mp (2,000X), (e) kitosan/HAp-Mp (250 X), (f) kitosan/HAp-Mp (2,000 X), (g) kitosan/HAp+Np (250 X), (h) kitosan/HAp+Np (2,000 X), (i) kitosan/HAp-Np (250 X), (j) kitosan/HAp-Np (2,000 X).



Şekil 4.48. Doku iskelelerinde üreyen MC3T3-E1 hücrelerinin kültürün 21. gününe yatay kesit SEM görüntüleri: (a) kitosan/HAp (250 X), (b) kitosan/HAp (2,000 X), (c) kitosan/HAp+Mp (250 X), (d) kitosan/HAp+Mp (2,000X), (e) kitosan/HAp-Mp (250 X), (f) kitosan/HAp-Mp (2,000 X), (g) kitosan/HAp+Np (250 X), (h) kitosan/HAp+Np (2,000 X), (i) kitosan/HAp-Np (250 X), (j) kitosan/HAp-Np (2,000 X).

Doku iskelelerinde kültüre edilen MC3T3-E1 hücrelerinin 7. gün SEM görüntüleri incelendiğinde hücrelerin tüm grup iskelelere tutunup iskeleler üzerinde çoğaldığı görülmüştür (Şekil 4.46). Ancak kitosan/HAp+Mp (Şekil 4.46-c,d) ve kitosan/HA-Mp (Şekil 4.46-d,e) gruplarında çok daha fazla sayıda hücreye rastlanmış ve hücrelerin iskele gözeneklerinin içerisine göç ettikleri belirlenmiştir. Özellikle kitosan/HAp-Mp doku iskelelerinde üreyen hücrelerin oldukça fazla miktarda hücre dışı matris sentezledikleri ve bu matrisin iskelenin neredeyse tüm yüzeyini kapladığı görülmüştür (Şekil 4.46-c,d). SEM görüntülerinden elde edilen bilgilerin Şekil 4.45'te verilen MTT sonuçları ile de uyumlu olduğu belirlenmiştir.

Kültürün 14. ve 21. gününe ait SEM görüntüleri sırasıyla Şekil 4.47 ve Şekil 4.48'de sunulmuştur. Kitosan/HAp doku iskelelerinde üreyen hücrelerde çok fazla kollajen fibrilleri ve mineral kümelerine rastlanmazken (Şekil 4.47-a,b ve Şekil 4.48-a,b), özellikle PLGA mikropartikül içeren gruplarda hücrelerin iskelenin neredeyse tamamını kapladığı belirlenmiş ve kemik farklılaşmasının göstergesi olan mineral kümeleri görülmüştür (Şekil 4.47-c,d,e,f ve Şekil 4.48-c,d,e,f).



Şekil 4.49. Doku iskelelerinde üreyen MC3T3-E1 hücrelerinin kültürün 21. gününe ait dikey kesit SEM görüntüleri: (a) kitosan/HAp (500 X), (b) kitosan/HAp (2,000 X), (c) kitosan/HAp+Mp (250 X), (d) kitosan/HAp+Mp (1,000X), (e) kitosan/HAp-Mp (250 X), (f) kitosan/HAp-Mp (1,000 X), (g) kitosan/HAp+Np (250 X), (h) kitosan/HAp+Np (5,000 X), (i) kitosan/HAp-Np (250 X), (j) kitosan/HAp-Np (1,000 X).

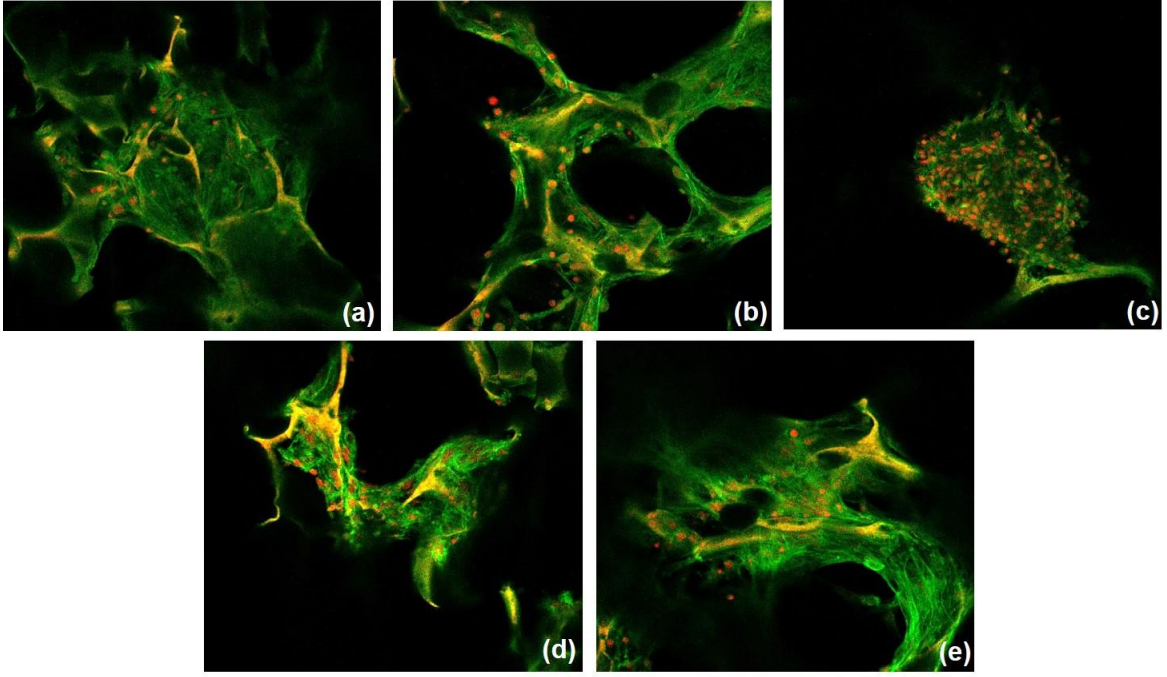
Üç boyutlu doku iskelelerinde hücrelerin iskelenin içlerine infiltrasyonu, yeni doku oluşumu açısından oldukça önemlidir. Gözenekleri küçük ve içsel olarak bağlantılı olmayan doku iskelelerinde kültüre edilen hücreler, sadece iskele yüzeyinde üremekte ve belli bir zaman sonra da ölüme gitmektedirler [179, 180]. Bu kısıtlamalardan dolayı doku mühendisliğinde kullanılacak iskelelerin uygun gözenek yapısına sahip olmaları oldukça önemlidir.

Hücrelerin iskele yüzeyinden ne kadar derine göç ettiklerinin belirlenmesi amacıyla iskelelerin dikey kesit SEM görüntüleri alınmıştır. Şekil 4.49’da verilen SEM görüntülerinde, hücrelerin iskele gözeneklerinden iç taraflara göç ettikleri belirlenmiş ve iskelenin yüzeyinden yaklaşık 700-800 µm derinliklerde bile hücrelere rastlanmıştır. Bu durum, kemik rejenerasyonu ve ileride gerçekleştirilecek *in vivo* uygulamalarda bireyin kendi dokusu ile bütünleşmede oldukça büyük bir önem taşımaktadır.

4.6.2.3. CLSM analizi

Doku iskelesi içerisindeki hücrelerin proliferasyonu ve infiltrasyonu, doku rejenerasyonunun desteklenmesi ve yönlendirilmesi açısından büyük önem taşımaktadır. Konfokal lazer taramalı mikroskop (CLSM) sayesinde üç boyutlu sistemlerin sadece yüzey kısımları değil iç bölgeleri de görüntülenebilmektedir. Dolayısıyla doku iskelesi içerisindeki hücre dağılımları malzemeden herhangi bir kesit alınmadan belirlenebilmektedir.

Sunulan çalışmada, kültürün 21. gününde doku iskelelerinin içerisindeki hücrelerin canlılığı, yoğunluğu ve morfolojileri CLSM ile incelenmiştir. Şekil 4.50’de verilen konfokal görüntüleri iskelelerin yüzeyden 600 µm derinliğine ait konfokal görüntüleri olup, kırmızı renk hücre çekirdeğini, yeşil renk ise aktin filamentini göstermektedir. Doku iskelelerinin dikey kesitlerinden alınan SEM görüntülerinden de anlaşıldığı üzere (Şekil 4.49), konfokal görüntülerinde de hücrelerin iskele içlerine kadar göç ettikleri kanıtlanmıştır.

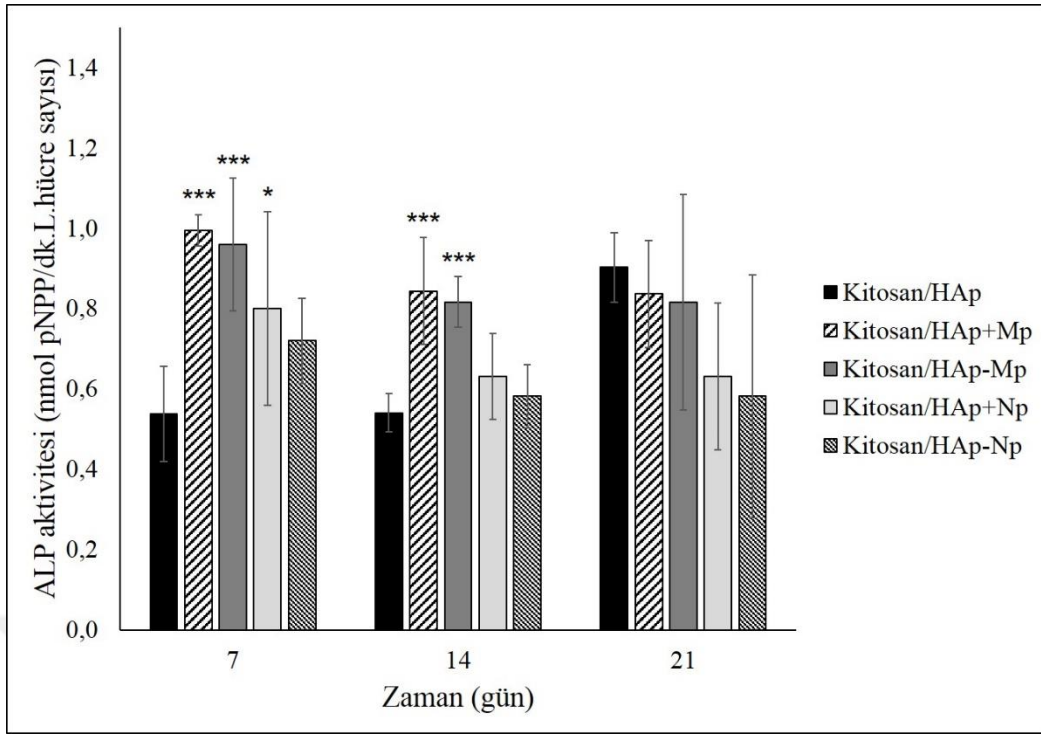


Şekil 4.50. Doku iskelelerinin 600 μm derinliğinde bulunan MC3T3-E1 hücrelerinin 21. gün konfokal mikroskop görüntüleri (20 X): (a) kitosan/HAp, (b) kitosan/HAp+Mp, (c) kitosan/HAp-Mp, (d) kitosan/HAp+Np, (e) kitosan/HAp-Np. (F-aktin yapıları yeşil, hücre çekirdeği kırmızı ile boyanmıştır).

4.6.2.4. ALP aktivitesinin tayini

Alkalen fosfataz (ALP), kemik oluşumu ve gelişimi dönemini tanımlayan osteojenezin erken aşamasında rol oynayan bir enzimdir ve ekspresyonu matris mineralizasyonunun başlamasından sonra azalmaktadır [181, 182]. Bu nedenle ALP aktivitesi, osteoblast-benzeri hücre hatlarının farklılaşması ve osteojenik özelliklerinin belirlenmesinde en sık incelenen parametrelerden biridir.

Doku iskelelerinde üreyen preosteoblastik MC3T3-E1 hücrelerinin erken dönem farklılaşması ALP aktivitesinin ölçümüyle incelenmiştir. Hücrelerin, kültürün 7., 14. ve 21. günlerine ait ortamdaki pNPP oluşumuna bağlı olarak belirlenen ALP aktiviteleri Şekil 4.51’de sunulmuştur.



Şekil 4.51. MC3T3-E1 hücrelerinin zamana bağlı ALP aktiviteleri. (İstatistiksel olarak anlamlı farklar: n=3, * p<0.05, ** p<0.01, *** p<0.001, kitosan/HAp kontrol grubudur).

Şekil 4.51’de verilen, kültürün 7. ve 14. günlerde kitosan/HAp+Mp ve kitosan/HAp-Mp doku iskelelerindeki hücrelerin ALP aktivitesinin kontrole göre istatistiksel olarak anlamlı derecede yüksek olduğu ve kontrolün yaklaşık 2 katı olduğu belirlenmiştir (p<0.001). Kültürün 7. gününde kitosan/HAp+Np grubunun ALP değerlerinin ise kontrole göre bir miktar yüksek olduğu görülmüş olup (p<0.05), 21. günde gruplar arasında istatistiksel olarak anlamlı bir fark gözlenmemiştir (p>0.05). ALP aktivitesi hücrelerin erken dönem farklılaşmasında kullanılan bir belirteç olduğundan, kültürün geç dönemlerinde gruplar arasında belirgin bir fark olmaması beklenen bir durumdur.

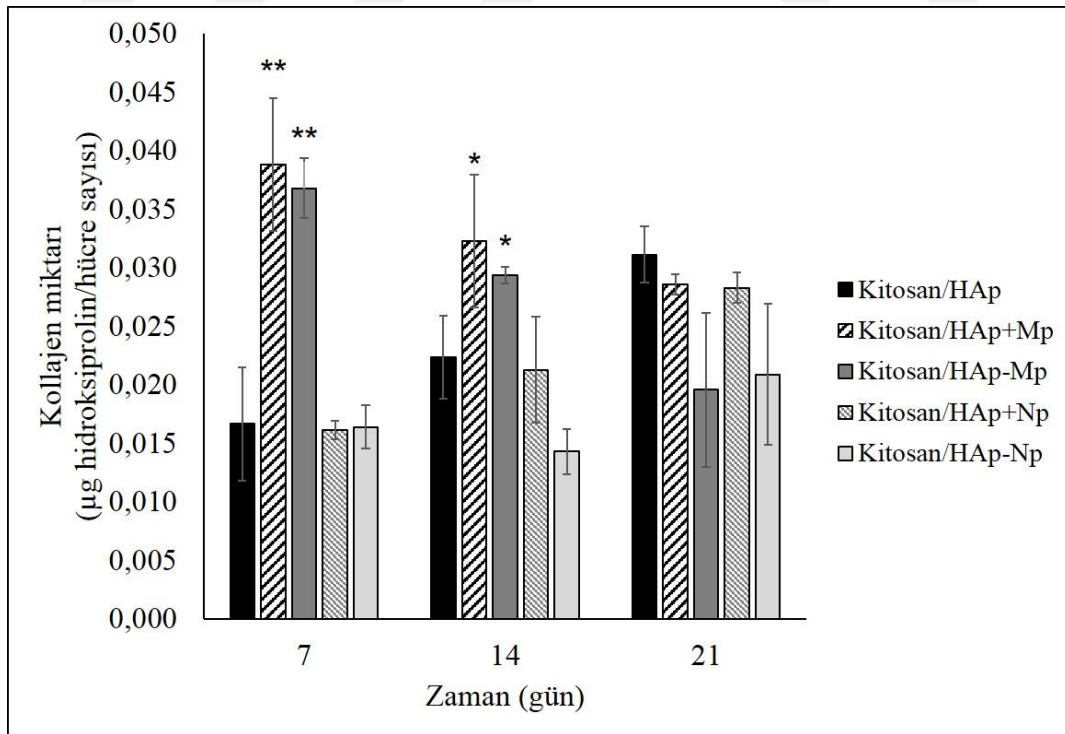
Literatürde serbest melatonin mikromolar düzeydeki konsantrasyonlarının farklı hücre tiplerinin ALP aktiviteleri üzerindeki etkilerini inceleyen çeşitli çalışmalar bulunmaktadır. Satomura ve ark’nın [10] yaptıkları çalışmada insan osteoblast hücrelerinin ALP aktivitesinin, melatonin 50-200 μ M konsantrasyon aralığında doz bağımlı olarak arttırdığı görülmüştür. Nakade ve ark.’nın [59] çalışmasında ise 5-100 μ M konsantrasyon aralığındaki melatonin insan kemik hücreleri olan HOB-M hücreleri ve insan osteoblastik hücre hattı olan SV-HFO hücrelerinin ALP aktivitesi üzerinde belirgin bir etkisinin olmadığı belirtilmiştir. Roth ve ark’nın [56] çalışmasında ise nanomolar düzeydeki melatonin MC3T3-E1 hücreleriyle etkileştirilmiş ve melatonin ile etkileşen grupların ALP aktivitesinin

arttığı sonucuna varılmıştır. Mikromolar düzeydeki (0-250 μ M) serbest melatonin konsantrasyonlarının preosteoblastik MC3T3-E1 hücrelerinin osteojenik farklılaşması üzerindeki etkisi Son ve ark. [57] tarafından hipoksik koşullar altında incelenmiş ve hücrelerin ALP aktivitesinin melatonin konsantrasyonuna bağlı olarak arttığı belirlenmiştir.

Çalışma kapsamında elde edilen ALP sonuçları, kitosan/HAp+Mp ve kitosan/HAp-Mp doku iskelelerinden salınan melatoninin MC3T3-E1 hücrelerinin erken dönem osteojenik farklılaşmasını desteklediğini göstermiştir. Bu doku iskelelerinden salınan melatoninin hücre kültür ortamındaki konsantrasyonu mikromolar düzeyde olduğundan, elde edilen verilerin literatür ile de uyumlu olduğu sonucuna varılmıştır.

4.6.2.5. Kollajen analizi

Kemik matris proteinlerinin yaklaşık %90'ını tip-1 kollajen oluşturmaktadır ve kollajen sentezi hücrelerin erken dönem farklılaşmasında artış göstermektedir [183]. Hidroksiprolin ise insan vücudunda sadece kollajende bulunmaktadır ve kollajen sentezi sırasında kollajenin polipeptit prekürsörüne bağlanan pirolin, sentezin son aşamasında hidroksillenerek hidroksiproline dönüşmektedir. Tez kapsamında sentezlenen kollajen miktarı, kültürde oluşan hidroksiprolin miktarının ölçümü ile belirlenmiş ve elde edilen grafik Şekil 4.52'de verilmiştir.



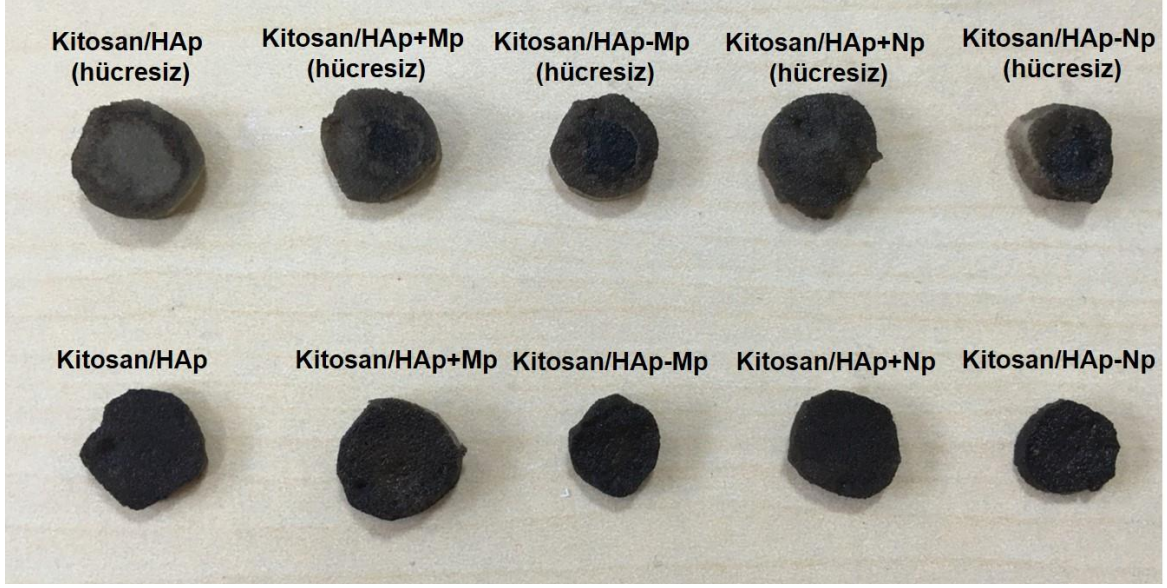
Şekil 4.52. Kitosan/HAp-bazlı doku iskelelerinde sentezlenen kollajen miktarları. (İstatistiksel olarak anlamlı farklar: n=3, * p<0.05, ** p<0.01, *** p<0.001, kitosan/HAp kontrol grubudur).

Kültürün 7. gününde kitosan/HAp+Mp ve kitosan/HAp-Mp iskelelerinde üreyen hücrelerin sentezlediği kollajen miktarının kontrole göre istatistiksel olarak anlamlı derecede yüksek olduğu ($p<0.01$) ve kontrol grubuna ait kollajen miktarının yaklaşık 2.3 katı olduğu belirlenmiştir. Kültürün 14. gününde ise yine mikropartikül yüklü doku iskelelerine ait kollajen miktarının diğer gruplara göre yüksek olduğu ve kontrolle arasında istatistiksel olarak belirgin bir fark olduğu görülmüştür ($p<0.05$). Kültür süresi boyunca nanopartikül yüklü kitosan/HA doku iskelelerinde üreyen hücrelerin sentezlediği kollajen miktarlarında kontrole göre belirgin bir fark görülmemiştir ($p>0.05$). Erken dönem farklılaşmanın bir göstergesi olan kollajen analizi sonucunda, kitosan/HAp+Mp ve kitosan/HAp-Mp doku iskelelerinin MC3T3-E1 hücrelerinin farklılaşmasını desteklediği belirlenmiştir.

Nakade ve ark.'nın yaptığı çalışmada mikromolar konsantrasyondaki melatoninin insan kemik hücreleri (HOB-M) ve insan osteoblastik hücre hattı (SV-HFO) üzerindeki etkisi incelenmiş ve melatonin varlığının hücre üremesini ve tip-1 kollajen sentezinin artışı desteklediği sonucuna varılmıştır [59]. Dolayısıyla, tez kapsamında gerçekleştirilen kollajen analizi sonucunda elde edilen veriler literatür ile de uyumludur.

4.6.2.6. Matris mineralizasyonunun incelenmesi

Doku iskelelerinin içerisinde üreyen ve farklılaşan hücrelerin hücre dışı matrislerinde biriken kalsiyumun belirlenmesi amacıyla Von Kossa boyaması gerçekleştirilmiştir. Hücre kültürünün 28. gününde gerçekleştirilen bu çalışmada, hücre içermeyen doku iskeleleri kontrol amacıyla kullanılmışlardır. Von Kossa ile boyanan hücre içeren ve içermeyen doku iskelelerinin görüntüleri Şekil 4.53'te sunulmuştur.

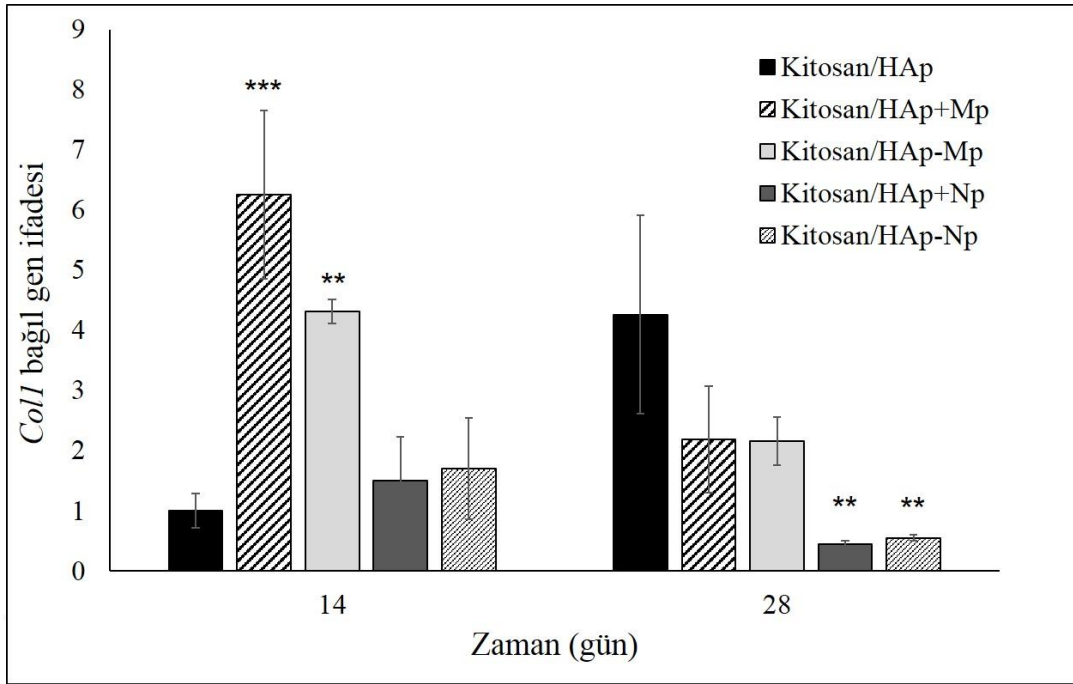


Şekil 4.53. Kitosan/HAp-bazlı doku iskelelerinin Von Kossa boyaması sonrası görüntüsü.

Kullanılan doku iskeleleri içerisinde HAp bulunduğundan hücre içermeyen iskelelerde de boyanma gözlenmiş, ancak hücreli doku iskelelerinin çok daha yoğun bir şekilde boyandığı belirlenmiştir. Buna karşın, hücreli doku iskelelerinde biriken kalsiyum miktarı açısından gruplar arasında belirgin bir fark görülmemiştir.

4.6.2.7. RT-PCR analizi

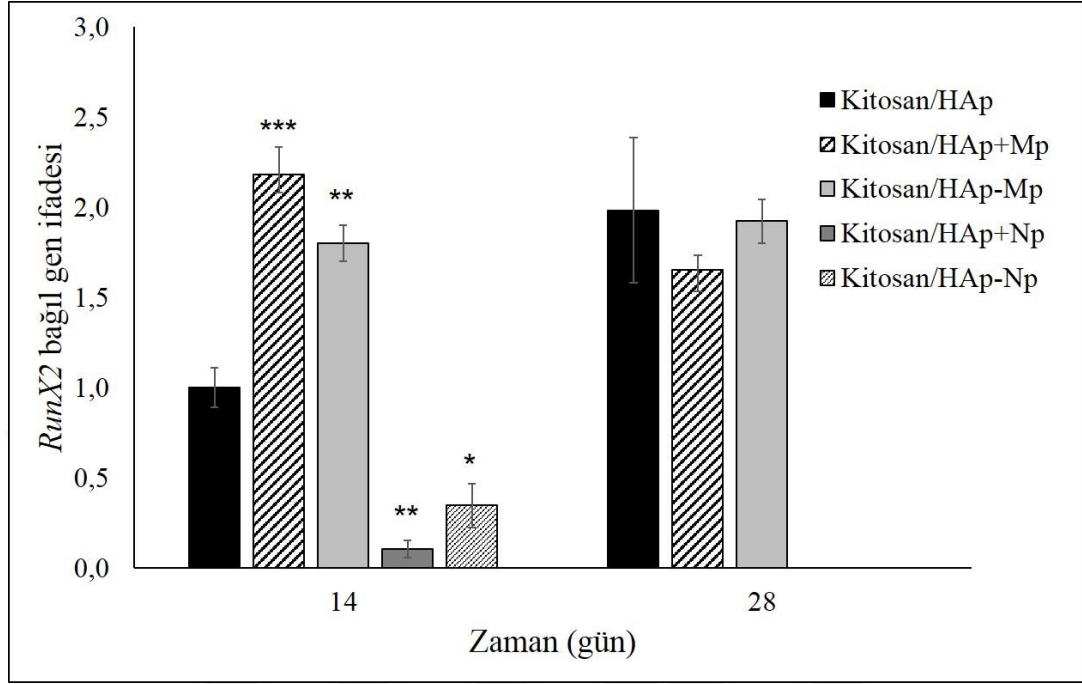
Çalışma kapsamında, kitosan/HAp-bazlı doku iskelelerinde üreyen MC3T3-E1 hücrelerinin osteojenik farklılaşmasının incelenmesi amacıyla RT-PCR ile hücrelerdeki *Col1*, *RunX2*, *Ocn* ve *Opn* gen ifadeleri belirlenmiş ve her bir gen için elde edilen grafikler, sırasıyla Şekil 4.54, Şekil 4.55, Şekil 4.56 ve Şekil 4.57’de verilmiştir.



Şekil 4.54. Kitosan/HAp-bazlı iskelelerde üreyen MC3T3-E1 hücrelerine ait bağıl *Col1* gen ifadesi grafiği. (İstatistiksel olarak anlamlı farklılık, n=3, kontrol grubu kitosan/HAp iken * p<0.05, ** p<0.01, *** p<0.001).

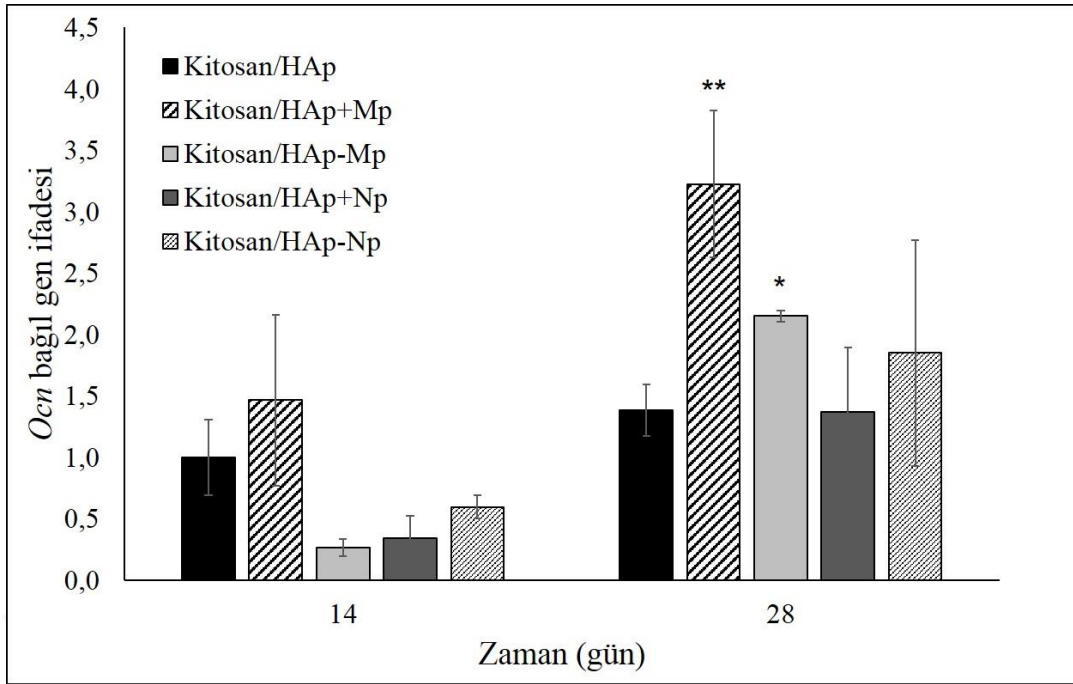
Yeni kemiğin oluşumu sırasında ilk önce hücre çoğalması gerçekleşmekte ve çoğalan osteoblastlar tip 1 kollajen (*Col1*) salgılamaktadırlar. Osteoblastların farklılaşma ve olgunlaşma döneminde ise *Col1* üretimi azalmaktadır [184]. Çalışma kapsamında, kitosan/HAp-bazlı doku iskelelerinde üreyen MC3T3-E1 hücrelerinin *Col1* gen ekspresyonları incelendiğinde (Şekil 4.54), kültürün 14. gününde kitosan/HAp+Mp grubunun ekspresyon seviyesinin kitosan/HAp grubuna göre anlamlı derecede yüksek olduğu görülmüştür (p<0.001). Aynı şekilde kitosan/HAp-Mp grubunun da *Col1* gen ekspresyonunun kontrole göre istatistiksel olarak önemli derecede yüksek olduğu belirlenmiştir (p<0.01). PLGA nanopartikül içeren iskelelerin (kitosan/HAp+Np ve kitosan/HAp-Np) *Col1* gen ekspresyon seviyelerinde ise kontrole göre önemli bir fark görülmemiştir (p>0.05). Kitosan/HAp grubunun ekspresyon değerleri 14. günden 28. güne artış gösterirken, kitosan/HAp+Mp ve kitosan/HAp-Mp gruplarının ekspresyon seviyelerinde düşüş meydana gelmiştir. Bu durum da mikropartikül yüklü iskelelerden salınan melatoninin hücrelerin osteojenik farklılaşmasını kültürün erken aşamasında indüklediğini göstermektedir. Kültürün 28. gününde kitosan/HAp+Np ve kitosan/HAp-Np gruplarının *Col1* gen ekspresyon seviyesinde kültürün 14. gününe göre herhangi bir artış olmadığı gibi, kontrol grubu ile arasında anlamlı derecede bir fark meydana gelmiştir (p<0.01). Dolayısıyla, kitosan/HAp+Np ve kitosan/HAp-Np doku iskelelerinin hücrelerin

Col1 gen ekspresyonu üzerinde olumlu bir etkisinin olmadığı belirlenmiştir. Sonuç olarak, kitosan/HAp+Mp ve kitosan/HAp-Mp iskelelerindeki hücrelerin osteoblastik farklılaşmaya yöneldikleri açıkça anlaşılmaktadır.



Şekil 4.55. Kitosan/HAp-bazlı iskelelerde üreyen MC3T3-E1 hücrelerine ait bağl *RunX2* gen ifadesi grafiği. (İstatistiksel olarak anlamlı farklılık, n=3, kontrol grubu kitosan/HAp iken * p<0.05, ** p<0.01, *** p<0.001).

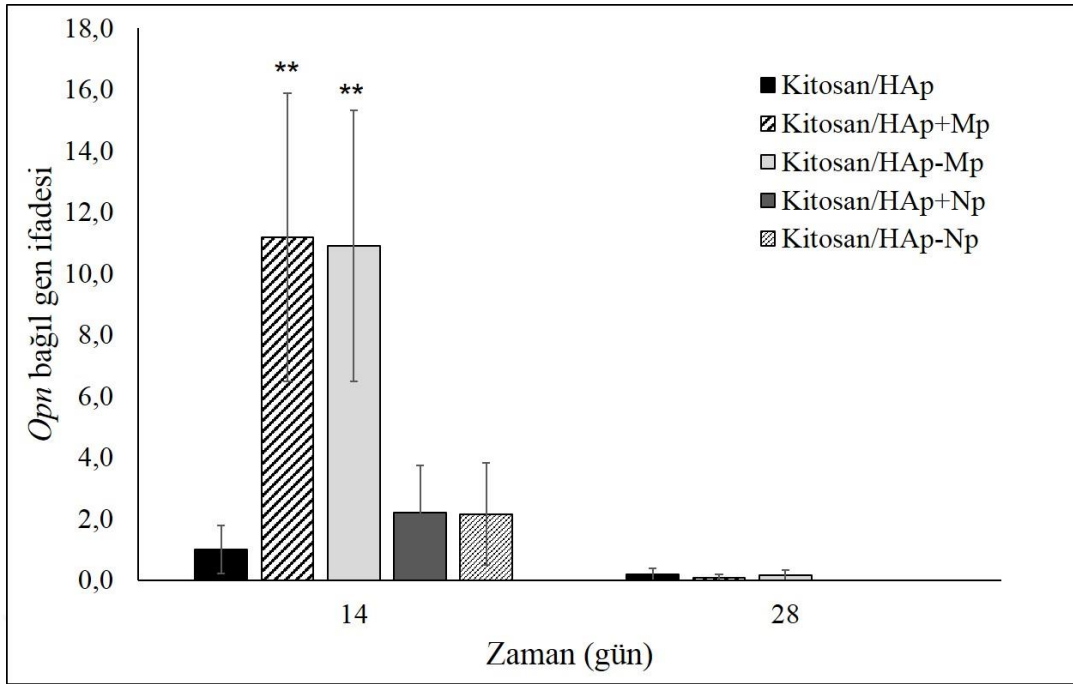
Erken dönem osteoblast farklılaşmasında temel bir transkripsiyon faktörü olan *RunX2*, önemli kemik matris proteinlerinin ekspresyonunu tetiklemektedir. Yapılan çalışmalarda *RunX2* gen mutasyonuna sahip farelerde osteoblast yetersizliğinden dolayı kemik dokunun oluşmadığı gözlenmiştir [185, 186]. Kitosan/HAp bazlı doku iskelelerinde üreyen MC3T3-E1 hücrelerinin *RunX2* gen ekspresyonlarının (Şekil 4.55), kültürün 14. gününde kontrole göre kitosan/HAp+Mp (p<0.001) ve kitosan/HAp-Mp (p<0.01) gruplarında istatistiksel olarak anlamlı derecede yüksek olduğu belirlenmiştir. Kitosan/HAp+Np (p<0.01) ve kitosan/HAp-Np (p<0.05) gruplarının kültürün 14. günündeki *RunX2* gen ekspresyon seviyelerinin kontrole göre düşük olduğu; kültürün 28. gününde ise bu gruplara ait *RunX2* gen ekspresyonunun olmadığı belirlenmiştir. Bununla birlikte yine kültürün 28. gününde gruplar arasında istatistiksel olarak anlamlı bir fark görülmemiştir (p>0.05).



Şekil 4.56. Kitosan/HAp-bazlı iskelelerde üreyen MC3T3-E1 hücrelerine ait bağıl *Ocn* gen ifadesi grafiği. (İstatistiksel olarak anlamlı farklılık, n=3, kontrol grubu kitosan/HAp iken * p<0.05, ** p<0.01, *** p<0.001).

Olgun osteoblast oluşumunun bir göstergesi olan osteokalsin (*Ocn*), farklılaşmanın geç dönemlerinde ortaya çıkmaktadır [185, 187]. Hücrelerin *Ocn* gen ekspresyon seviyeleri incelendiğinde (Şekil 4.56), kültürün 14. gününde gruplar arasında istatistiksel olarak anlamlı bir fark gözlenmemiştir (p>0.05). Kültürün 21. gününde ise, tüm grupların *Ocn* gen ekspresyon seviyelerinde kültürün 14. günündeki ekspresyon seviyeleri ile kıyaslandığında bir artış gözlenmiştir. Ancak sadece kitosan/HAp+Mp (p<0.01) ve kitosan/HAp-Mp (p<0.1) gruplarının *Ocn* gen ekspresyonlarının kontrole göre anlamlı derecede yüksek olduğu belirlenmiştir.

Son ve ark.'nın [57] yaptıkları çalışmada 50-250 µM konsantrasyonlarındaki melatoninin MC3T3-E1 hücrelerinin *Ocn* gen ekspresyonunu hipoksik koşullarda önemli derecede arttırdığı belirlenmiştir. Zhang ve ark.'nın [61] çalışmasında ise PLGA mikropartiküllerden salınan mikromolar mertebedeki melatoninin hMSClerin *Ocn* ekspresyonunu arttırdığı belirlenmiştir. Geç dönem osteojenik farklılaşmanın bir belirteci olan *Ocn* gen ekspresyon seviyelerinin kültürün 28. gününde kitosan/HA+Mp ve kitosan/HAp-Mp doku iskelelerinde yüksek olması, bu iskelelerin MC3T3-E1 hücrelerinin farklılaşması açısından uygun olduğunu göstermektedir ve elde edilen bu sonuçlar literatür ile de uyumludur.



Şekil 4.57. Kitosan/HAp-bazlı iskelelerde üreyen MC3T3-E1 hücrelerine ait bağıl *Opn* gen ifadesi grafiği. (İstatistiksel olarak anlamlı farklılık, n=3, kontrol grubu kitosan/HAp iken * $p<0.05$, ** $p<0.01$, *** $p<0.001$).

Fosforlanmış bir glikoprotein olan osteopontin (*Opn*), olgunlaşmamış osteoblastlar tarafından kültürün erken aşamasında salgılanmaktadır [182, 185]. Şekil 4.57’de verilen *Opn* ekspresyon seviyelerine bakıldığında, kültürün 14. gününde kitosan/HAp+Mp ve kitosan/HAp-Mp doku iskelelerinde üreyen hücrelere ait değerlerin kontrole göre anlamlı derecede yüksek olduğu belirlenmiştir ($p<0.01$). Kültürün 28. gününde ise kitosan/HAp ve PLGA mikropartikül içeren (kitosan/HAp+Mp ve kitosan/HAp-Mp) doku iskelelerine ait *Opn* ekspresyon seviyelerinde düşüş meydana gelirken, PLGA nanopartikül içeren (kitosan/HAp+Np ve kitosan/HAp-Np) doku iskelelerinde *Opn* gen ekspresyonu gözlenmemiştir. Daha önce de bahsedildiği gibi, *Opn* erken dönem osteojenik farklılaşmada görülen bir proteindir, dolayısıyla kültürün 14. gününde PLGA mikropartikül yüklü doku iskelelerinde yüksek olması beklenen bir durumdur. Zhang ve ark’ı [61], PLGA mikropartiküllerden kontrollü bir şekilde salınan melatoninin hMSClerin *Opn* ekspresyonu üzerindeki etkisini de incelemişler ve melatoninin olumlu etkisini görmüşlerdir. Elde edilen sonuçlar literatür ile de uyumludur.

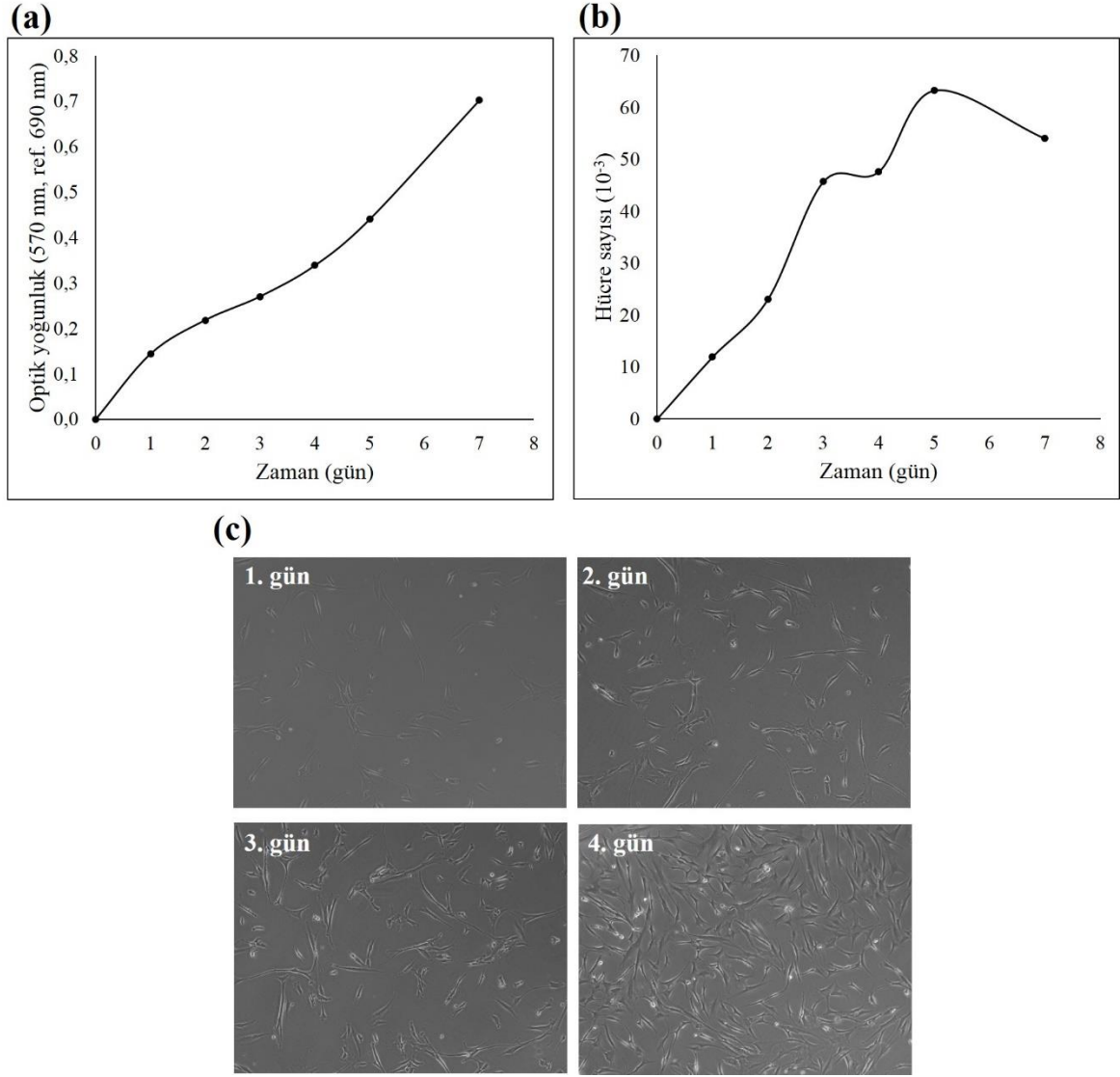
RT-PCR analizi sonucunda, kitosan/HAp+Mp ve kitosan/HAp-Mp doku iskelelerinden salınan melatoninin MC3T3-E1 hücrelerinin osteojenik farklılaşmasını desteklediği sonucuna varılmıştır. Bununla birlikte, kitosan/HAp+Np ve kitosan/HAp-Np doku

iskelelerinde üreyen hücrelerin gen ekspresyonlarının çok tutarlı olmadığı ve bu nedenle bu iskelelerin hücre farklılaşmasını desteklemediği belirlenmiştir. RT-PCR analizinden elde edilen sonuçlar ALP ve kollajen analizi verileri ile de uyumludur. PLGA nanopartikül yüklü kitosan/HAp doku iskelelerinin hücre farklılaşmasını desteklememesinin, bu iskelelerden salınan melatonin ile ilgili olmadığı düşünülmektedir. Nanopartiküllerin doku iskelesinin gözeneklerinden uzaklaşarak hücre içerisine alındıkları ve bu durumun da hücre farklılaşmasını olumsuz yönde etkilediği sonucuna varılmıştır. Tüm analiz verileri incelendiğinde, genel olarak daha olumlu sonuçlar verdiğinden, çalışmanın bundan sonraki aşamalarında kullanılmak üzere kitosan/HAp+Mp doku iskeleleri seçilmiştir.

4.7. hMSCler ile Yürütülen *In Vitro* Hücre Kültür Çalışmaları

4.7.1. hMSClerin karakterizasyonu

Sekizinci pasajdaki hMSClerin karakterizasyonu için 7 gün süren *in vitro* hücre kültür çalışmaları gerçekleştirilmiştir. Hücrelerin üremeleri ve morfolojileri 24 gözlü kültür kaplarında incelenmiştir. Karakterizasyon çalışmaları sonucunda, MTT analizi ile elde edilen absorbans değerleri (Şekil 4.58-a) ve hemositometrik sayım ile hesaplanan hücre sayısı değerlerinin (Şekil 4.58-b) zamana karşı grafikleri elde edilmiştir.



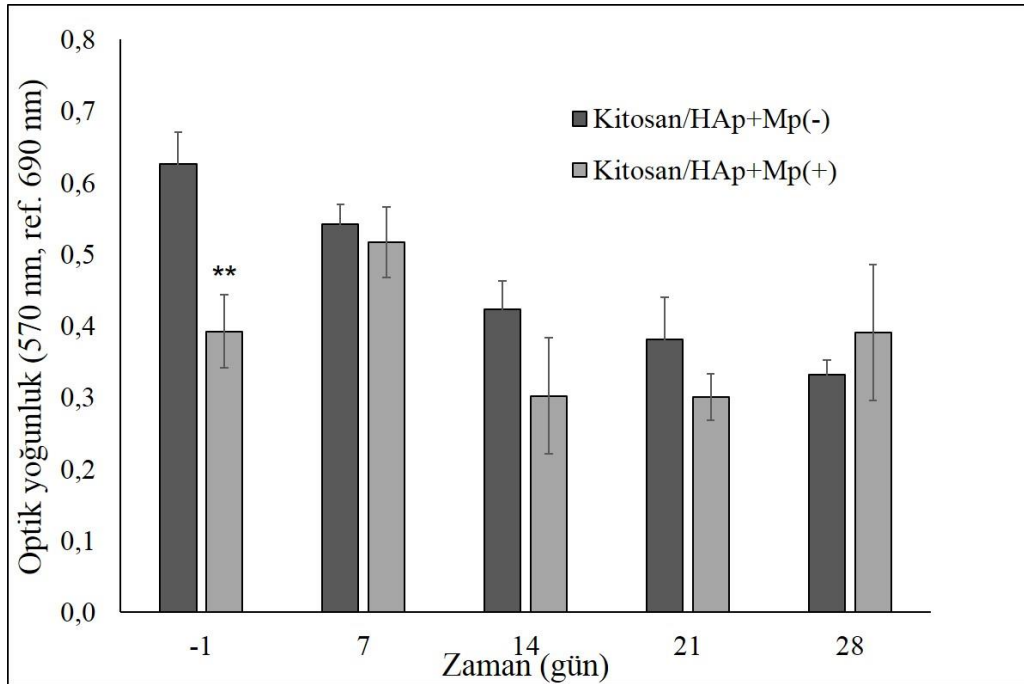
Şekil 4.58. hMSClere ait (a) MTT analizi sonucu elde edilen hücre üreme grafiği, (b) hemositometrik sayım sonucu elde edilen üreme grafiği ve (c) optik mikroskop görüntüleri (10 X).

Şekil 4.58-b'den elde edilen veriler kullanılarak, hMSClerin özgül üreme hızı 0.017 sa^{-1} , ikilenme süresi ise 41 sa olarak hesaplanmıştır. Literatürdeki çalışmalar incelendiğinde kemik iliği kökenli hMSClerin ikilenme süresinin 40 sa civarında olduğu belirtilmiş, dolayısıyla yapılan karakterizasyon çalışmaları sonucu elde edilen ikilenme süresinin ilgili literatürle uyumlu olduğu görülmüştür [188, 189]. Hücrelerin kültür süresince morfolojilerini incelemek amacıyla kültürün ilk 4 günü boyunca optik mikroskop görüntüleri alınmıştır. Şekil 4.58-c'de verilen optik mikroskop görüntülerinden, hücrelerin kültür süresi boyunca sağlıklı bir şekilde kültür kabında üredikleri belirlenmiştir.

4.7.2. Kitosan/HAp+Mp doku iskeleleri ile yürütülen *in vitro* hücre kültür çalışmaları

Preosteoblastik MC3T3-E1 hücrelerinin osteojenik farklılaşmasını en çok destekleyen doku iskelesinin kitosan/HAp+Mp olduğu yapılan *in vitro* hücre kültür çalışmaları ile belirlenmişti. Tez çalışması kapsamında seçilen bu iskelenin hMSClerin farklılaşması üzerinde de olumlu etkisinin olup olmadığının incelenmesi amacıyla 28 gün süren hücre kültür çalışmaları gerçekleştirilmiştir. Kontrol amacıyla melatonin içermeyen (boş) PLGA mikropartiküllerin iskelenin üretimi aşamasında yapıya katılmasıyla elde edilen kitosan/HAp iskeleler kullanılmıştır. Boş ve melatonin yüklü PLGA mikropartikülleri içeren doku iskeleleri sırasıyla, kitosan/HAp+Mp(-) ve kitosan/HAp+Mp(+) şeklinde ifade edilmiştir. Kitosan/HAp+Mp(-) doku iskeleleri kontrol amacıyla kullanılmıştır.

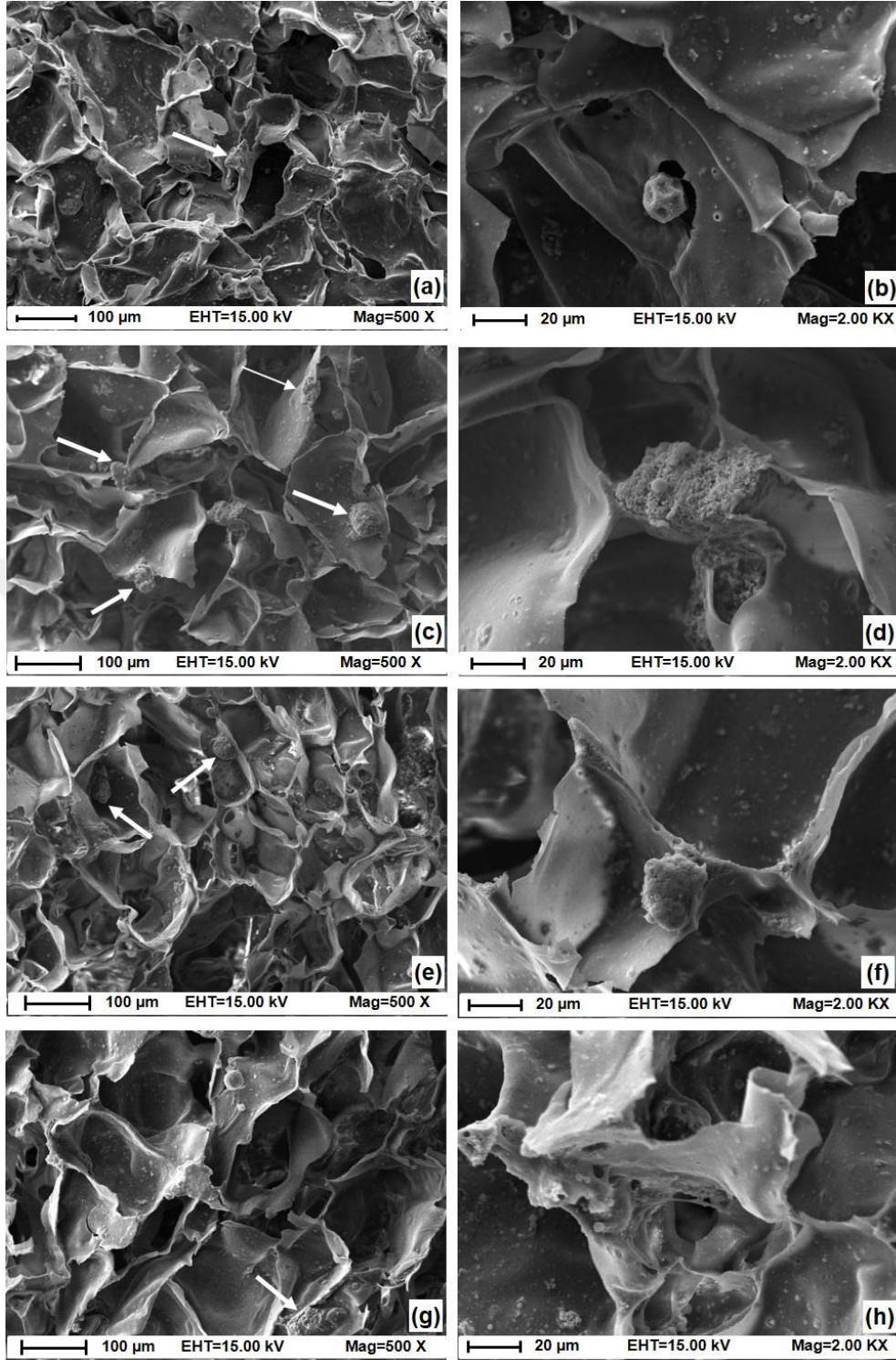
Doku iskeleleri içerisinde üreyen hücrelerin mitokondriyal aktiviteleri MTT analizi ile belirlenmiş ve elde edilen grafik Şekil 4.59’da verilmiştir. Osteojenik ortamı eklenmeden 1 gün öncesinde kitosan/HAp+Mp(+) doku iskelelerinde üreyen hMSClerin mitokondriyal aktivitelerinin kontrole göre anlamlı derecede düşük olduğu görülmüş ($p<0.01$), kültürün ilerleyen günlerinde ise gruplar arasında anlamlı bir fark gözlenmemiştir ($p>0.05$). Aynı zamanda, her iki doku iskelesinde üreyen hücrelerin canlılığında kültür süresi boyunca artış gözlenmediği gibi, özellikle kitosan/HAp+Mp(-) iskelelerdeki hücrelerin mitokondriyal aktivitelerinin giderek düştüğü belirlenmiştir.



Şekil 4.59. Kitosan/HAp+Mp doku iskelelerinde kültüre edilen hMSClerin MTT sonuçları. (İstatistiksel olarak anlamlı farklar: $n=3$, $*p<0.05$, $**p<0.01$, $***p<0.001$, kitosan/HAp+Mp(-) kontrol grubudur).

Hücrelerin doku iskelelerindeki yayılımları ve morfolojilerini gözlemlemek amacıyla kültürün 7. ve 28. günlerinde SEM görüntüleri çekilmiştir (Şekil 4.60). SEM görüntülerinde beyaz oklar iskele içerisindeki hücreleri göstermektedir. Buna göre, oldukça az sayıda hücrenin iskelelere tutunduğu ve bu hücrelerin küresel morfoloji oluşturup yayılmadıkları gözlemlenmiştir. MTT verileri ile birlikte değerlendirildiğinde, uyumlu sonuçlar elde edilmiş ve geliştirilen doku iskelesinin hMSClerin tutunması ve çoğalması için uygun olmadığı sonucuna varılmıştır. Bunun nedeninin de kitosandan kaynaklı olduğu düşünülmüştür. Literatürde kitosanın kök hücrelerin yapışmasını desteklemediğini belirten çeşitli çalışmalar bulunmaktadır [190, 191].

Kitosanın boncuk formdaki HAp ile modifiye edilmesi, preosteoblastik özellikteki MC3T3-E1 hücrelerinin iskelelere tutunup iskeleler içerisinde çoğalmasını desteklemesine rağmen, hMSCler üzerinde herhangi olumlu bir etki göstermemiştir. Sonuç olarak, hMSCler iskeleye tutunup çoğalmadığından, geliştirilen kitosan/HAp+Mp doku iskelelerinden salınan melatoninin hMSClerin osteojenik farklılaşması üzerindeki etkisi incelenememiştir.



Şekil 4.60. Kitosan/HAp+Mp(-) iskelelerinde üreyen hMSClerin SEM görüntüleri: (a) 7.gün (500 X), (b) 7. gün (2,000 X), (c) 28. gün (500 X), (d) 28. gün (2,000 X); Kitosan/HAp+Mp(+) iskelelerinde üreyen hMSClerin SEM görüntüleri: (e) 7.gün (500 X), (f) 7. gün (2,000 X), (g) 28. gün (500 X), (h) 28. gün (2,000 X). Beyaz oklar hücreleri göstermektedir.

4.8. Kitosan/HAp Doku İskelelerine Melatonin/HP β CD İnküzyon Kompleksinin Yüklmesi, Karakterizasyon ve *In Vitro* Hücre Kültür Çalışmaları

Melatoninin çeşitli kanser türleri üzerinde onkostatik (tümör gelişimini durdurucu) etki gösterdiği belirlenmiş ve osteosarkom hücreleri üzerinde milimolar mertebedeki konsantrasyonlarının hücre proliferasyonunu azalttığı görülmüştür [91]. Geliştirilen doku iskelesi-temelli sistemin osteosarkom üzerinde de etkili olabilmesi için bu doku iskelelerine melatonin/HP β CD inküzyon kompleksinin yüklmesine karar verilmiştir. Çünkü melatonin her ne kadar oldukça önemli özelliklere sahip olsa da, sudaki çözünürlüğü sınırlıdır (~2 g/L) ve bu nedenden dolayı kullanımı kısıtlıdır [27]. Melatoninin sahip olduğu amfifilik yapı, siklodekstrinlerin hidrofobik boşluğuna girerek inküzyon kompleksi oluşturmak için de oldukça uygundur [27, 133]. Çalışma kapsamında, melatonin/HP β CD inküzyon kompleksinin üretimi ile hem doku iskelelerine yüksek miktarda melatonin yüklmesi hem de hızlı bir salım sağlanarak osteosarkom hücrelerinin inhibisyonu hedeflenmiştir.

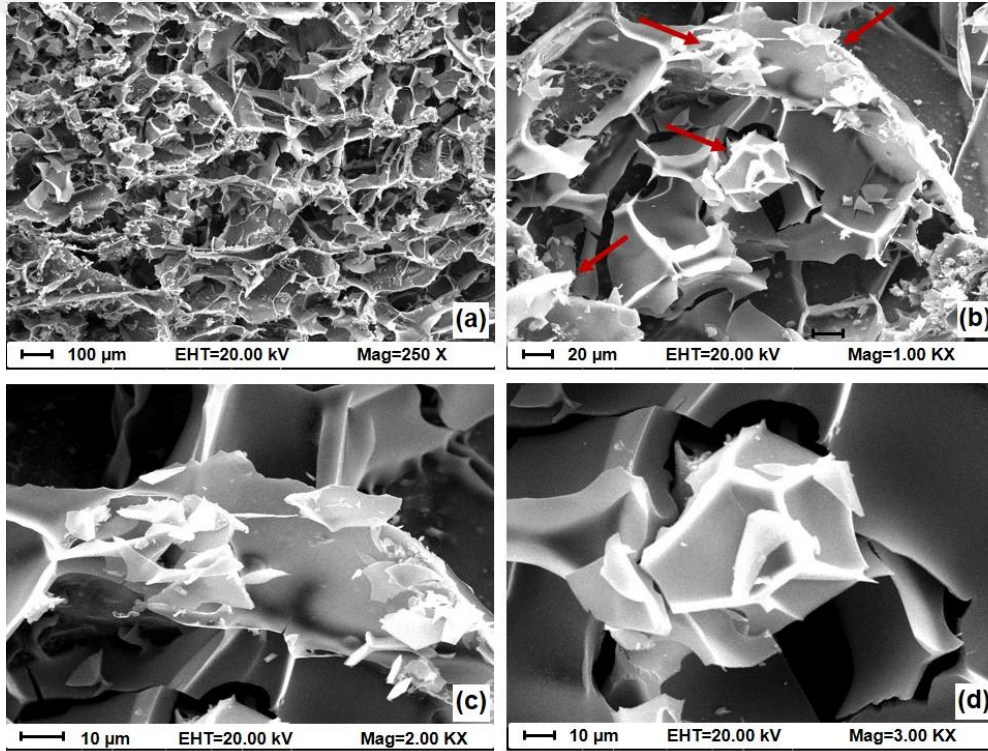
Melatoninin osteosarkom üzerindeki etkilerini inceleyen sınırlı sayıda çalışma bulunmaktadır ve bu çalışmalarda mikro/milimolar mertebedeki melatonin konsantrasyonlarının kültür ortamına doğrudan eklendiği durumda çeşitli osteosarkom hücrelerinin proliferasyonunu inhibe ettiği belirlenmiştir. Örneğin, Cheng ve ark.'nın [97] yaptıkları çalışmada, 250 μ M, 500 μ M ve 1000 μ M konsantrasyonundaki melatoninin insan osteosarkom hücreleri olan SOSP-9607 hücre hattı üzerindeki etkisi incelenmiş ve hücre proliferasyonunun melatonin konsantrasyonundaki artışa bağlı olarak azaldığı belirlenmiştir. Liu ve ark. [91] ise 0-10 mM aralığındaki melatonin konsantrasyonunun insan osteosarkom hücreleri olan MG-63 hücrelerine olan etkilerini incelemiştir. Sonuç olarak, 4-10 mM konsantrasyonundaki melatoninin hücre proliferasyonunu önemli derecede inhibe ettiği belirtilmiştir. Literatürdeki sınırlı sayıdaki çalışmalar göz önünde bulundurulduğunda, kitosan/HAp+Mp doku iskelelerine yüklenecek melatonin miktarının hücre kültüründe ~8 mM'a denk gelecek şekilde olmasına karar verilmiştir.

Grubumuz tarafından daha önce yapılan bir çalışmada, oda koşullarında 3 gün süren melatonin/HP β CD inküzyon kompleks oluşumu, mikrodalga enerjisiyle 90 s gibi oldukça kısa bir süreye düşürülmüştür. Gerçekleştirilen faz çözünürlük çalışmaları sonucunda melatonin/HP β CD inküzyon kompleksinin oluşumu için optimum mikrodalga koşulları ise 900 W, 90 s ve 60°C olarak belirlenmiştir [133]. Üretilen ve karakterize edilen bu melatonin/HP β CD inküzyon kompleksi tez kapsamında geliştirilen kitosan/HAp+Mp doku

iskelelerine yüklenmiş ve yükleme veriminin belirlenmesine yönelik yapılan çalışmalarda iskele başına yüklenen melatonin miktarı 2.27 ± 0.24 mg olarak belirlenmiştir. Bu değer de hücre kültüründe yaklaşık olarak 8 mM'a denk gelmektedir.

4.8.1. SEM analizi

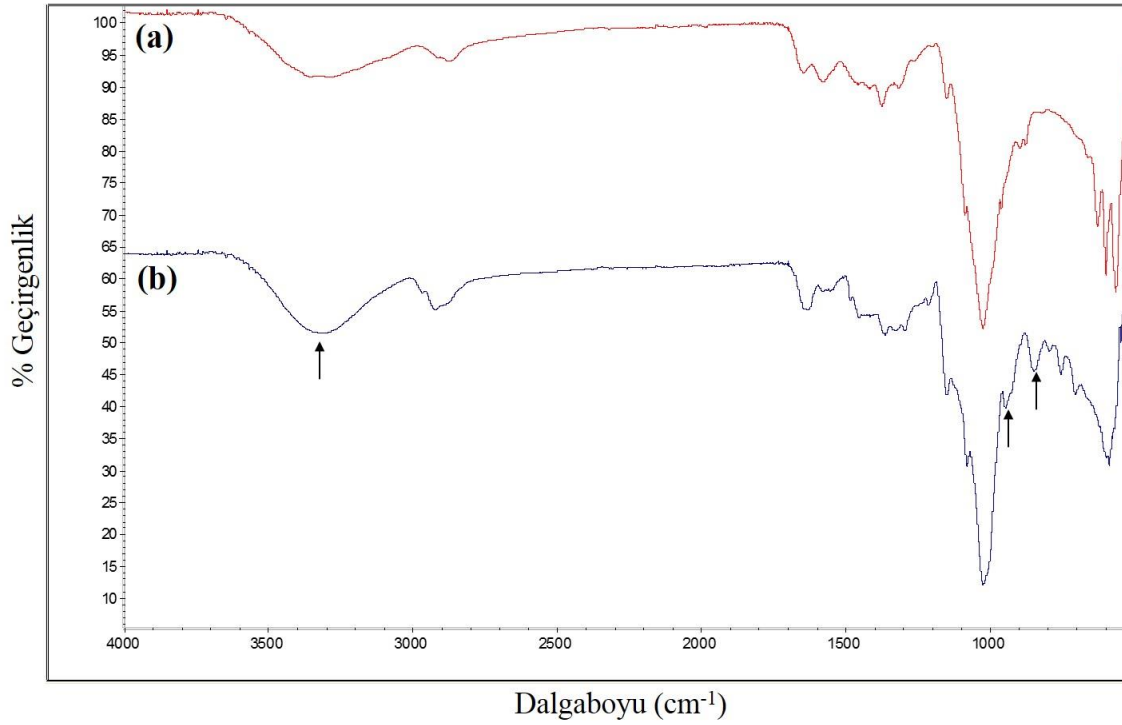
Üretilen melatonin/HP β CD inklüzyon kompleksi yüklü kitosan/HAp+Mp doku iskeleleri içerisindeki inklüzyon kompleksinin dağılımını belirlemek amacıyla SEM görüntüleri çekilmiştir. Şekil 4.61'de verilen SEM görüntülerinde kırmızı okla gösterilen inklüzyon komplekslerinin iskele içerisine homojen bir şekilde dağıldıkları, iskele gözenekliliğini ve gözeneklerin içsel olarak bağlantısını olumsuz yönde etkilemedikleri belirlenmiştir. Ayrıca, amorf yapıyı ifade eden düzensiz partiküller, melatonin/HP β CD inklüzyon kompleksinin başarılı bir şekilde oluştuğunu kanıtlamaktadır.



Şekil 4.61. Melatonin/HP β CD yüklü kitosan/HAp+Mp doku iskelelerinin farklı büyütme ölçeklerindeki SEM görüntüleri: (a) 250 X, (b) 1,000 X, (c) 2,000 X ve (d) 3,000 X. (Kırmızı oklar iskele içerisindeki melatonin/HP β CD inklüzyon kompleksini göstermektedir).

4.8.2. ATR-FTIR analizi

Melatonin/HP β CD inklüzyon kompleksinin kitosan/HAp+Mp doku iskelesinin yapısına katılıp katılmadığının değerlendirilmesi amacıyla ATR-FTIR analizi gerçekleştirilmiştir. Inklüzyon kompleksi içermeyen ve içeren doku iskelelerinin spektrumları, sırasıyla Şekil 4.62-a ve Şekil 4.62-b’de sunulmuştur.

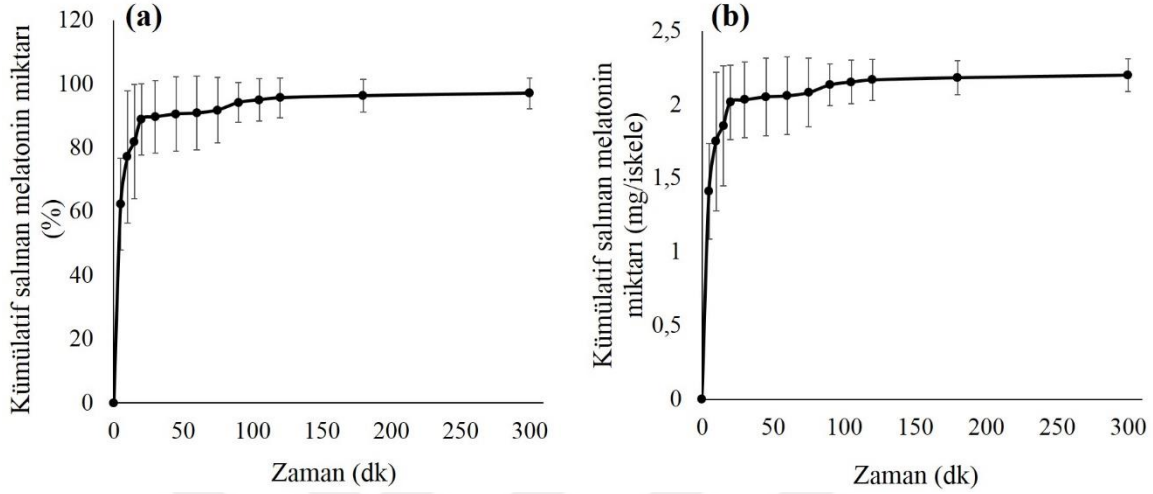


Şekil 4.62. (a) Kitosan/HA+Mp ve (b) kitosan/HA+Mp/ik doku iskelelerine ait ATR-FTIR spektrumları.

Şekil 4.62-a’daki piklerden farklı olarak, Şekil 4.62-b’de 3350 cm⁻¹ dalga boyunda görülen geniş pik HP β CD’in yapısındaki O-H gruplarına, 945 cm⁻¹ ve 855 cm⁻¹’deki pikler ise HP β CD’nin metilen gruplarının asimetrik gerilme titreşimlerine aittir [192, 193]. HP β CD’e ait tüm bu piklerin varlığı, kitosan/HA+Mp doku iskelesinin yapısına melatonin/HP β CD inklüzyon kompleksinin başarılı bir şekilde yüklendiğini kanıtlamaktadır. Ayrıca, Şekil 4.62-b’de melatonine ait 2500-3000 cm⁻¹ dalga boyu aralığındaki karakteristik C-H piklerinin görülmemesi, HP β CD moleküllerinin içerisine giren melatonine ait pikleri maskeleyesinden kaynaklanmakta ve bu durum da inklüzyon kompleksinin başarılı bir şekilde oluştuğunu kanıtlamaktadır.

4.8.3. *In vitro* melatonin salımı

Melatonin/HP β CD yüklü kitosan/HAp+Mp doku iskeleleri ile 5 gün boyunca yürütülen *in vitro* melatonin salım çalışmalarının sonuçlarını gösteren grafikler Şekil 4.63'te sunulmuştur.

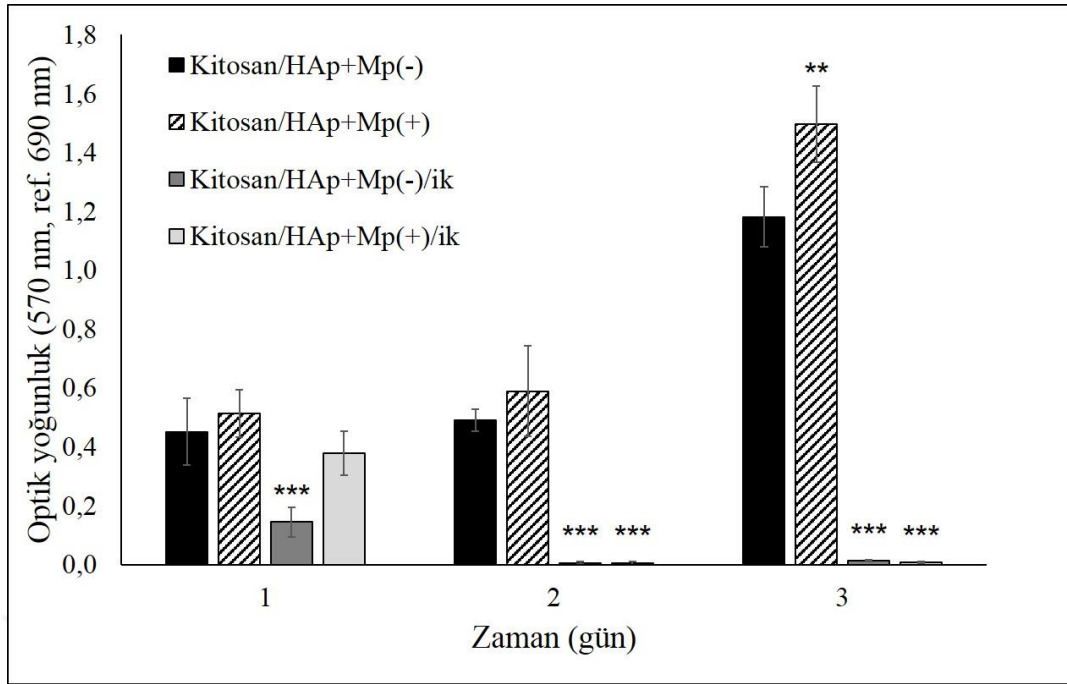


Şekil 4.63. Kitosan/HAp+Mp doku iskelelerinden salınan melatoninin: a) yüzde kümülatif salım değerleri, b) iskele başına salınan miktarları.

Doku iskelelerine yüklenen melatoninin salımın ilk 20 dk'sına kadar yaklaşık %80'inin (~2.02 mg), kalan melatoninin ise 5 günün sonunda tamamının doku iskelelerinden salındığı belirlenmiştir (~2.27 mg). Tez çalışması kapsamında, MG-63 insan osteosarkom hücrelerinin proliferasyonunun ani salınan yüksek konsantrasyondaki melatonin sayesinde inhibe edilmesi hedeflendiğinden, elde edilen ani ve kısa süreli melatonin salımı istenilen bir salım davranışıdır.

4.8.4. MTT analizi

Hazırlanan melatonin/HP β CD inklüzyon kompleksi, hem boş hem de melatonin yüklü PLGA mikropartikülleri içeren kitosan/HAp iskelelerine yüklenmiş ve insan osteosarkom hücreleri olan MG-63 hücreleri ile 3 gün süren *in vitro* hücre kültür çalışmaları gerçekleştirilmiştir. Hücreler, TCPS yüzeylere ekildikten 24 sa sonra üzerlerine doku iskeleleri konulmuş ve doku iskelelerinden salınan melatoninin hücreler üzerindeki etkisi dolaylı olarak incelenmiştir. Hücre kültür çalışmalarında ayrıca inklüzyon kompleksi yüklü olmayan kitosan/HAp+Mp iskeleleri de kullanılmıştır. Hücre canlılığını gösteren MTT analiz sonuçları Şekil 4.64'te sunulmuştur.



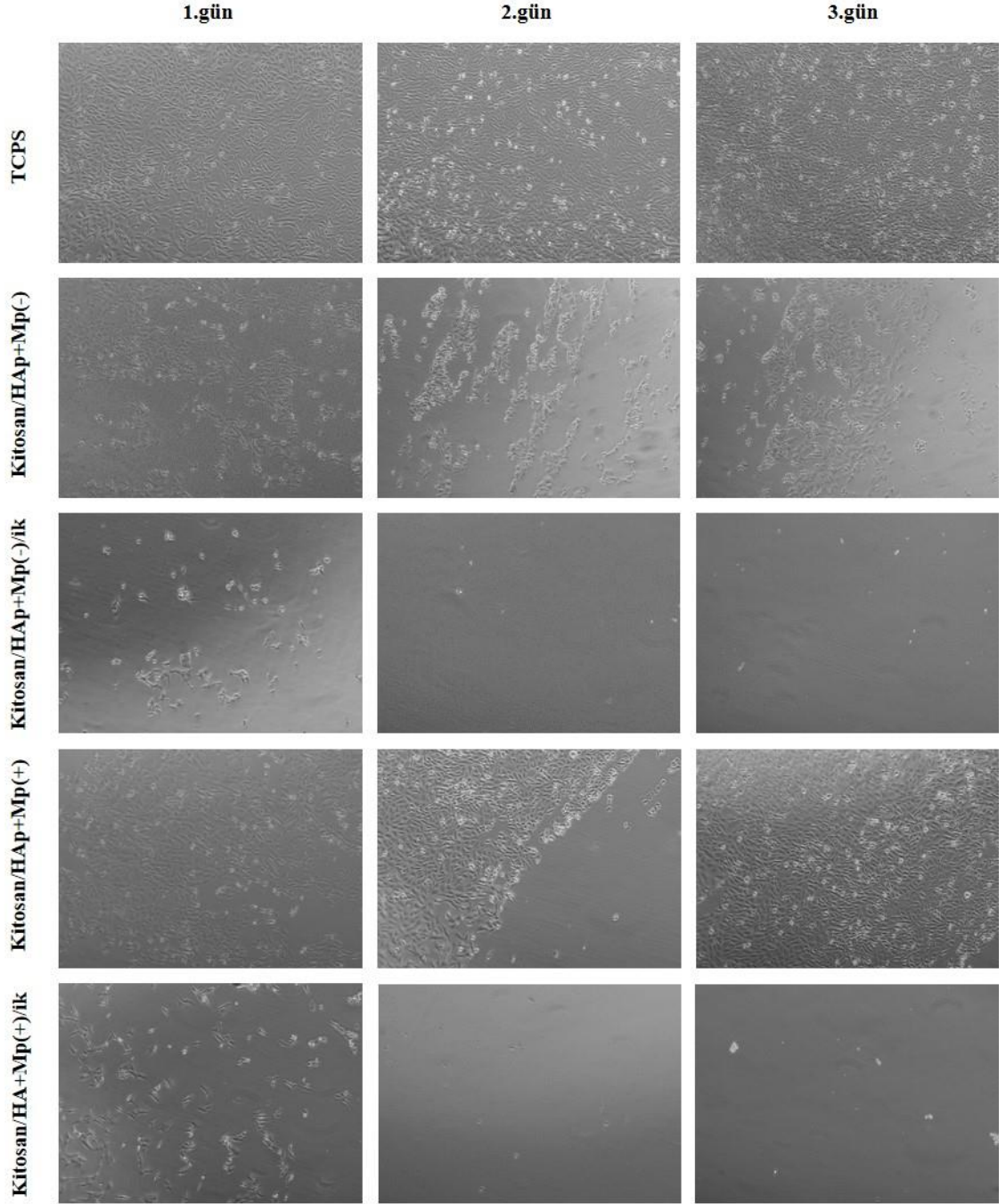
Şekil 4.64. Kitosan/HAp doku iskeleleri ile dolaylı olarak etkileşen MG-63 hücrelerinin MTT sonuçlarını gösteren grafik. (İstatistiksel olarak anlam farklılığı, kitosan/HAp+Mp(-) kontrol grubu iken, * $p<0.05$, ** $p<0.01$, *** $p<0.001$).

Şekil 4.64'te verilen MTT sonuçları incelendiğinde, kültürün ilk gününde kitosan/HAp+Mp(-)/ik grubuna ait optik yoğunluk değerinin kontrole göre istatistiksel olarak anlamlı derecede düşük olduğu belirlenmiştir ($p<0.001$). Kültürün 2. ve 3. günlerinde ise tüm inklüzyon kompleks yüklü iskelelerden (kitosan/HAp+Mp(-)/ik ve kitosan/HAp+Mp(+)/ik) salınan melatoninin hücrelerin proliferasyonunu önemli derecede azalttığı görülmüştür ($p<0.001$). Kültürün son gününde ise, kitosan/HAp+Mp(+)/ik doku iskeleleri ile etkileşen MG-63 hücrelerinin MTT değerlerinin kontrole göre anlamlı derecede yüksek olduğu görülmüştür ($p<0.01$). Bu durumun, PLGA mikropartiküllerinden salınan melatoninin hücre proliferasyonunu arttırmasından dolayı kaynaklandığı düşünülmüştür.

4.8.5. Optik mikroskop ile görüntüleme

Hücrelerin kültür süresi boyunca canlılıklarını ve morfolojisilerini incelemek amacıyla optik mikroskop görüntüleri çekilmiştir (Şekil 4.65). Inklüzyon kompleksi yüklü doku iskeleleri (kitosan/HAp+Mp(-)/ik ve kitosan/HAp+Mp(+)/ik) ile etkileşen hücrelerin morfolojilerinin kültürün ilk gününden itibaren bozulmaya başladığı ve kültürün ilerleyen günlerinde hücrelerin neredeyse tamamının yıkama işlemi sonucu kültür kabından uzaklaştığı belirlenmiştir. Inklüzyon kompleksi içermeyen iskelelerle (kitosan/HAp+Mp(+)) ve kitosan/HAp+Mp(-)) etkileşen hücrelerin ise kültür kabının ortasında az sayıda oldukları

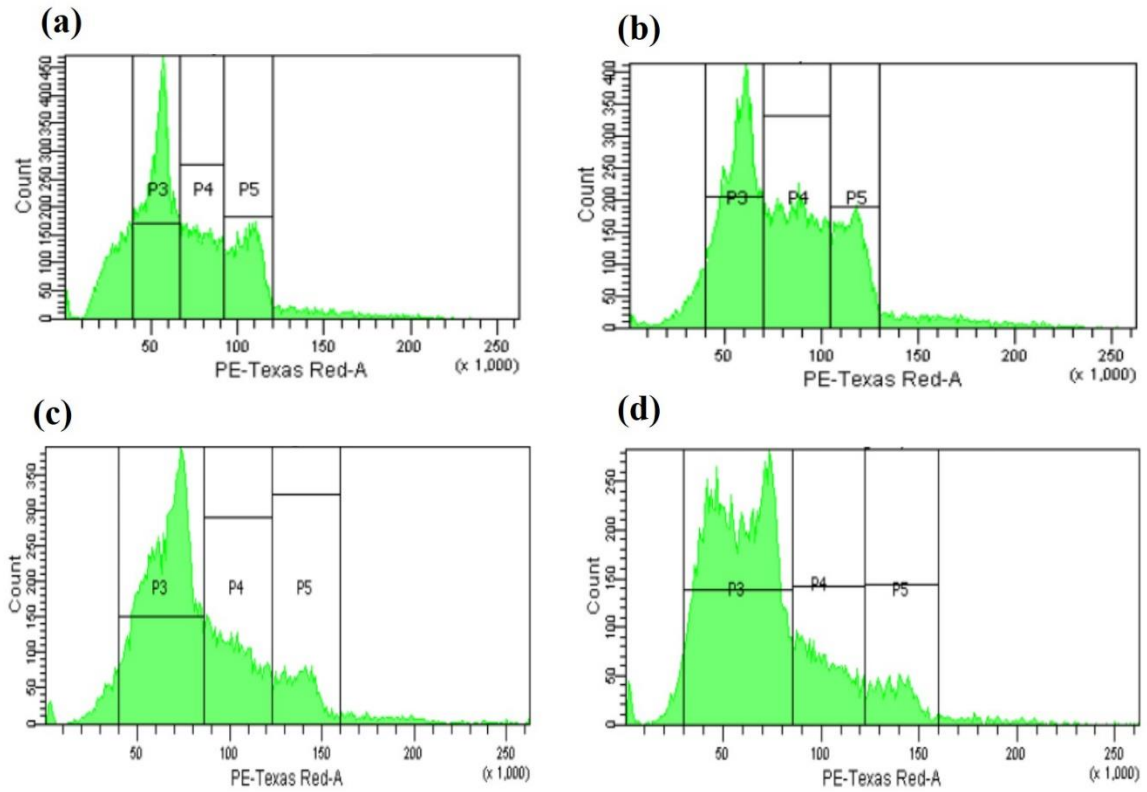
belirlenmiştir. Bunun nedeninin, doku iskelelerinin kültür kabı içerisinde hücrelerin üzerinde bulunmasına bağlı olarak hücrelerin ortamdaki oksijen ve besinlerden yeterince yararlanamamaları olduğu düşünülmüştür. İskelelerin etrafında ise hücrelerin çoğaldığı, özellikle kitosan/HAp+Mp(+) iskeleleri ile etkileşen hücrelerin sağlıklı bir şekilde çoğaldığı ve morfolojilerini koruduğu belirlenmiştir. Optik mikroskop görüntülerinin MTT değerleri ile de uyumlu olduğu sonucuna varılmıştır.



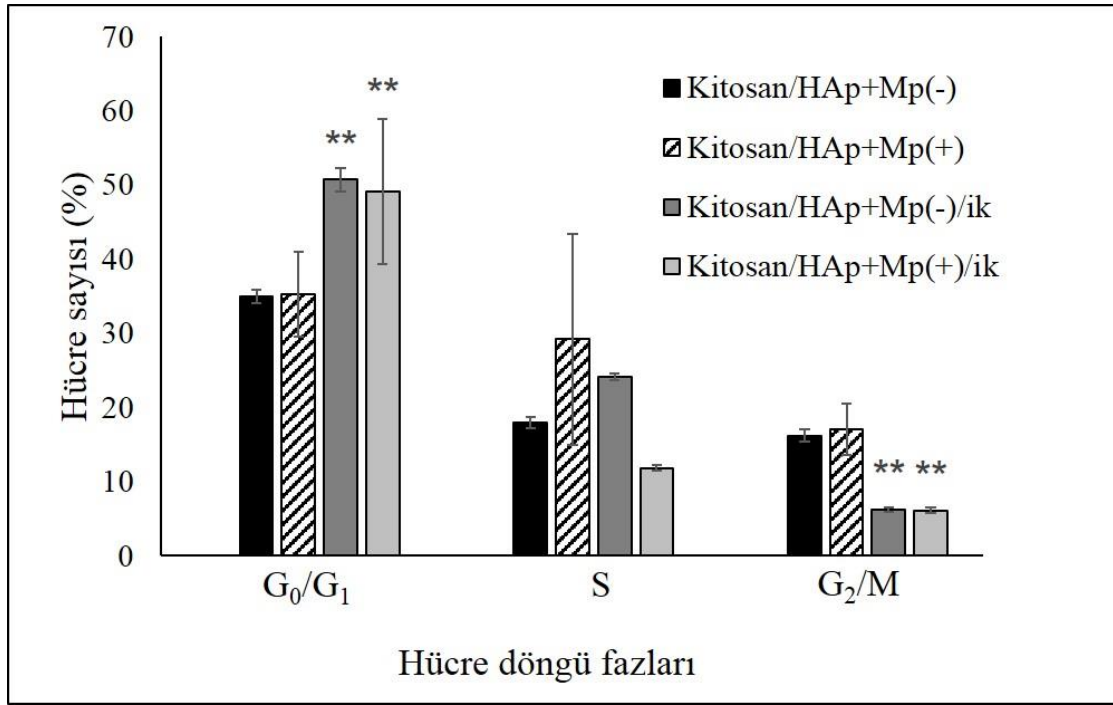
Şekil 4.65. Doku iskeleleri ile etkileştirilen MG-63 hücrelerine ait optik mikroskop görüntüleri (10 X).

4.8.6. Hücre döngü analizi

Doku iskelelerinden hızlı ve yüksek miktarda salınan melatoninin MG-63 hücrelerinin proliferasyonunu hücre döngüsünün hangi fazında inhibe ettiğinin belirlenmesi amacıyla akış sitometri ile hücre döngü analizi gerçekleştirilmiştir. Akış sitometrisinden elde edilen histogramlar ve bu histogramlardaki veriler kullanılarak oluşturulan grafikler, sırasıyla Şekil 4.66 ve Şekil 4.67’de verilmiştir.



Şekil 4.66. Akış sitometrisinden elde edilen histogramlar: (a) Kitosan/HAp+Mp(-), (b) Kitosan/HAp+Mp(+), (c) Kitosan/HAp+Mp(-)/ik ve (d) Kitosan/HAp+Mp(+)/ik.



Şekil 4.67. Doku iskeleleri ile dolaylı olarak etkileşen MG-63 hücrelerinin hücre döngü analiz sonuçları. (İstatistiksel olarak anlam farklılığı, kitosan/HAp+Mp(-) kontrol grubu iken, * $p<0.05$, ** $p<0.01$, *** $p<0.001$).

Hücre döngü analizi diploid hücrelerde oldukça başarılı sonuç vermektedir. MG-63 hücreleri hipotriploid yapıda olduklarından hücre döngü fazları çok net ayırt edilememekle birlikte (Şekil 4.66), elde edilen sonuçların anlamlı olduğu görülmüştür. Hücre döngü analizi için kontrol grubu olarak kitosan/HAp+Mp(-) doku iskeleleri seçilmiştir. İnklüzyon kompleksi yüklü kitosan/HAp doku iskeleleri (kitosan/HAp+Mp(+)/ik ve kitosan/HAp+Mp(-)/ik) ile etkileştirilen MG-63 hücrelerinin G₀/G₁ fazındaki sayılarının, diğer gruplara göre istatistiksel olarak anlamlı derecede yüzdece yüksek olduğu belirlenmiştir ($p<0.01$). S fazında ise gruplar arasında belirgin bir fark gözlenmemiş ($p>0.05$), ancak G₂/M fazında kitosan/HAp+Mp(-)/ik ve kitosan/HAp+Mp(+)/ik gruplarına ait hücre sayısı yüzdelерinin kontrole göre anlamlı derecede düşük olduğu görülmüştür ($p<0.01$). Sonuç olarak inklüzyon kompleksi yüklü kitosan/HAp doku iskelelerinden salınan melatoninin MG-63 insan osteosarkom hücrelerinin proliferasyonunu G₀/G₁ fazında inhibe ettiği belirlenmiştir (Şekil 4.67).

Literatürdeki bir çalışmada, 4-10 mM konsantrasyon aralığındaki serbest melatoninin MG-63 insan osteosarkom hücrelerinin döngüsünde G₀/G₁ fazındaki hücrelerin artmasına, S ve G₂/M fazındaki hücrelerin sayısının ise azalmasına neden olduğu belirlenmiştir [91]. Bir diğer çalışmada ise 1 nM-1 mM konsantrasyon aralığındaki melatonin, normal insan fetal

osteoblastik hücre hattı (hFOB) ile etkileştirilmiş ve bu konsantrasyonlardaki melatoninin hücre döngüsü üzerindeki etkisi incelenmiştir. Sonuçta, 1 mM melatonin konsantrasyonunun G₀/G₁ fazındaki hücrelerin sayısını arttırırken, G₂/M fazındaki hücrelerin sayısını azalttığı belirlenmiştir [158]. Tez çalışması kapsamında hücre döngü analizinden elde edilen sonuçların literatür ile de uyumlu olduğu belirlenmiştir.

Yürütülen hücre kültür çalışmaları sonucunda, geliştirilen doku iskelesi-temelli sistemin MG-63 insan osteosarkom hücrelerinin inhibisyonuna neden olduğu ve bundan dolayı da osteosarkom tedavisinde kullanılabilir olduğu anlaşılmıştır. Bu sistemin, kemik tümörüne sahip hastalarda tümörün cerrahi işlemle alınmasının ardından oluşan hasarlı bölgeye lokal olarak uygulanması sonucunda, hızlı ve milimolar mertebede melatonin salımı ile bir yandan çevre dokularda kalmış olabilecek kanser hücrelerinin ortadan kaldırılması, bir yandan da doku iskelesi içerisindeki mikropartiküllerden kontrollü ve uzun dönemde salınan mikromolar mertebedeki melatonin sayesinde yeni kemik doku oluşumunun sağlanabileceği düşünülmektedir.

4.9. İpek Filmlerin Üretimi, Melatonin ile Modifikasyonu ve Hücre Kültür Çalışmaları

Çalışmanın bu aşaması Tübitak Yurt Dışı Doktora Sırası Araştırma Burs Programı desteği ile Tufts Üniversitesi Biyomedikal Mühendisliği Bölümü'nden Prof. Dr. David L. Kaplan'ın laboratuvarında gerçekleştirilmiştir.

4.9.1. İpek filmlerin üretimi

İpek, ipekböcekleri, örümcekler ve akrepler gibi bazı lepidoptera larvaları tarafından fiber halde üretilen fibröz bir proteindir ve ikincil yapılarında tekrar eden β -tabaka yapıları bulunmaktadır. İpek proteinleri, genellikle epitel hücrelerinde gerçekleşen biyosentezden sonra özelleşmiş bezler içerisinde üretilir ve burada fiberlere dönüşmeden önce depolanır. İpeğin bileşimi, yapısı ve özellikleri elde edildiği kaynağa bağlı olarak değişiklik göstermektedir. En çok kullanılan ipekler ipek böceği (*Bombyx mori*) ve örümceklerden (*Nephila clavipes* ve *Araneus diadematus*) elde edilenlerdir [194].

Bombyx mori ipek böceği kozalarından elde edilen ipek, temel olarak fibroin proteini ve etrafındaki serisin proteininden oluşmaktadır. İpek fibroin proteini, hafif zincir (Mw ~26 kDa) ve ağır zincirden (Mw ~390 kDa) oluşmaktadır ve bu zincirler birbirine disülfid bağlarıyla bağlıdır. İpek fibroinin yapısında %90 oranında glisin, alanin ve serin aminoasitleri bulunmakta ve bu aminoasitler kristalin β -tabaka yapıları oluşturarak ipek fiberlerin stabilitesini sağlamaktadır. Serisin proteini ise, yapışkan bir yapıdadır ve ipek

böceği kozasının ağırlığının yaklaşık %25-30'unu oluşturmaktadır. Serisin proteini bağışıklık sisteminin tepkisine neden olmakta ve bu nedenle biyomedikal uygulamalardan önce bu proteinin ipeğin yapısından uzaklaştırılması gerekmektedir [194-196]. Serisin, ipeğin Na_2CO_3 içeren suda kaynatılmasıyla kolaylıkla yapıdan uzaklaştırılabilmektedir [196].

İpek, biyouyumlu olması, bozunma davranışının ve mekanik özelliklerinin ayarlanabilmesi ile oda koşullarında kolayca işlenebilmeleri gibi avantajlarından dolayı birçok doku mühendisliği ve rejeneratif tıp uygulamalarında sıklıkla tercih edilmektedir. Ayrıca, birçok biyomedikal uygulamalar için kimyasal olarak kolayca modifiye edilebildiği gibi [197-200], film, hidrojel, fiber ve küre gibi oldukça çeşitli formlarda da hazırlanabilmektedir [196].

İpeğin yapısında daha önceden de bahsedildiği gibi, antiparalel β -tabaka konformasyonları bulunmaktadır ve ipeğin fiziksel özellikleri yapıdaki bu β -tabaka kristallerinin miktarı ile ilişkilidir. Bu yapılar ne kadar fazlaysa, ipek o kadar kararlı olmakta ve sudaki çözünmezliği artmaktadır. İpeğin yapısındaki β -tabaka kristallerini arttırmak amacıyla şimdiye kadar en çok kullanılan yöntem ipeğin metanol veya etanol gibi organik çözücülere daldırılmasıdır. “Alkol ile tavlama” olarak ifade edilen bu yöntemlerde ipeğin β -tabaka içeriği metanol ile tavlama $\sim\%55$, etanol ile tavlama ise $\sim\%36$ 'ya çıkmaktadır. İpeğin kristalin yapısını arttırmak amacıyla kullanılan bir diğer yöntem ise “su ile tavlama”dır. Bu yöntemde su buharı yardımıyla yüksek basınç ve sıcaklık altında ipeğin tavlama işlemi gerçekleştirilmekte ve ipeğin içeriğindeki β -tabaka miktarı $\sim\%60$ 'lara kadar çıkabilmektedir. Bu yöntemin oda sıcaklığında gerçekleştirildiği durumda ise β -tabaka miktarı $\sim\%30$ 'lar civarında olmaktadır [134].

Tez çalışması kapsamında ipek çözeltisinin 24 gözlü kültür kaplarına eklenerek 1 gece boyunca kurutulması ile ipek filmler üretilmiştir. İpeğin kristalinitesinin artırılması amacıyla “metanol ile tavlama” ve oda sıcaklığında “su ile tavlama” işlemleri gerçekleştirilmiştir.

4.9.2. İpek filmlerin yüzeyinin melatonin ile modifikasyonu

İpek-bazlı malzemeler, biyolojik olarak daha fonksiyonel hale gelmeleri için çeşitli moleküllerle modifiye edilebilmektedirler. İpeğin işleme proseslerinde yapısal özelliklerinin kolayca kontrol edilebilmesi sayesinde birçok hassas molekülün biyolojik aktivitesinde önemli bir azalış meydana gelmeden ipek malzemelere yüklenmesi

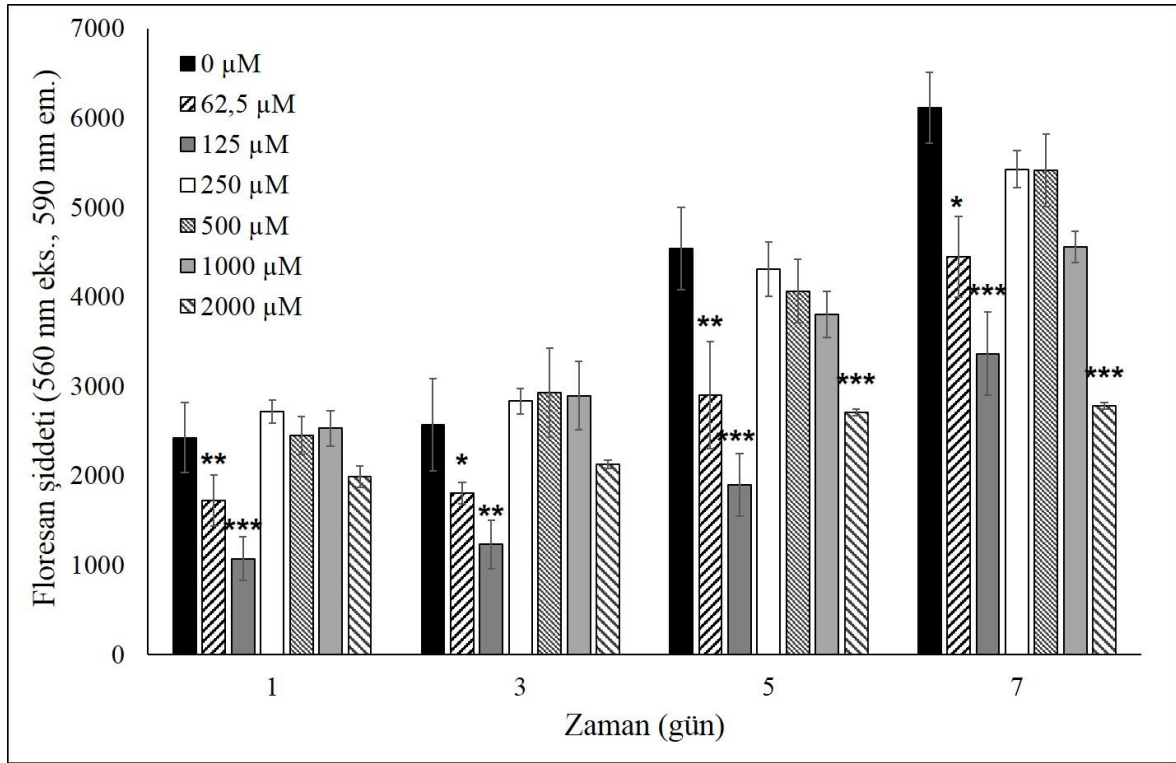
mümkündür [198, 201, 202]. İpek her ne kadar kemik doku mühendisliği için ilgi çekici bir malzeme olsa da, osteojenik farklılaşmayı arttırması için modifiye edilmesi gerekmektedir.

Literatürde gerçekleştirilen çalışmaların birinde, ipek filmler paratiroid hormonu (PTH) ve arjinin-glisin-aspartik asit tripeptit (RGD) ile fonksiyonalleştirilmiş ve bu yapıların osteoblast-benzeri hücreler olan SAOS-2 hücrelerinin osteojenik aktivitesini, fonksiyonalleştirilmemiş yapılara göre önemli derecede arttırdığı belirlenmiştir [203]. Bir diğer çalışmada ise, kemik morfogenetik protein-2 (BMP-2) doğrudan ipek filmler üzerine immobilize edilmiş ve insan kemik iliği stroma hücrelerinin bu sistem üzerindeki osteojenik farklılaşması incelenmiştir [204]. Osteojenik farklılaşma ortamında gerçekleştirilen bu çalışmada, BMP-2 ile modifiye edilmemiş ipek iskeleler üzerinde üreyen hücrelerin farklılaşma kapasitesinin oldukça düşük olduğu; modifiye edilen gruptaki hücrelerin ise yüksek ALP aktivitesi ve kalsiyum birikimi gösterdiği, ayrıca yüksek miktarlarda kollajen tip 1, kemik sialoproteini, osteokalsin ve osteopontin eksprese ettikleri belirlenmiştir.

Görüldüğü üzere, ipek filmler, yapılan çalışmalarda çeşitli biyokimyasal moleküllerle modifiye edilmiş ve bu sistemlerin kemik doku mühendisliği açısından kullanılabilirliği incelenmiştir. Ancak, literatürde ipek-bazlı malzemelerin melatoninle modifikasyonuna ait herhangi bir çalışmaya rastlanmamıştır. Bu amaçla, sunulan tez çalışmasında melatoninin hMSClerin proliferasyonu ve osteojenik farklılaşması üzerindeki etkilerini incelemek için farklı konsantrasyonlardaki (0-2,000 μ M) melatonin çözeltisi ipek filmlere emdirme yöntemiyle yüklenmiş ve böylece ipek filmlerin yüzeyi melatonin ile modifiye edilmiştir.

4.9.3. Melatoninin hMSClerin proliferasyonuna etkisinin incelenmesi

Kemik rejenerasyonu sırasında hücresel toksisite ve hücre canlılığı oldukça önemlidir. Bu nedenle öncelikle farklı konsantrasyonlarda (0-2,000 μ M) melatonin yüklü ipek filmler üretilmiş ve bu konsantrasyonlardaki melatoninin ipek filmler üzerinde kültüre edilen hMSClerin proliferasyonu üzerindeki etkileri 7 gün süren *in vitro* hücre kültür çalışmaları ile incelenmiştir. Hücrelerin metabolik aktiviteleri Alamar Mavisi analizi ile belirlenmiş ve elde edilen sonuçlar Şekil 4.68’de gösterilmiştir.



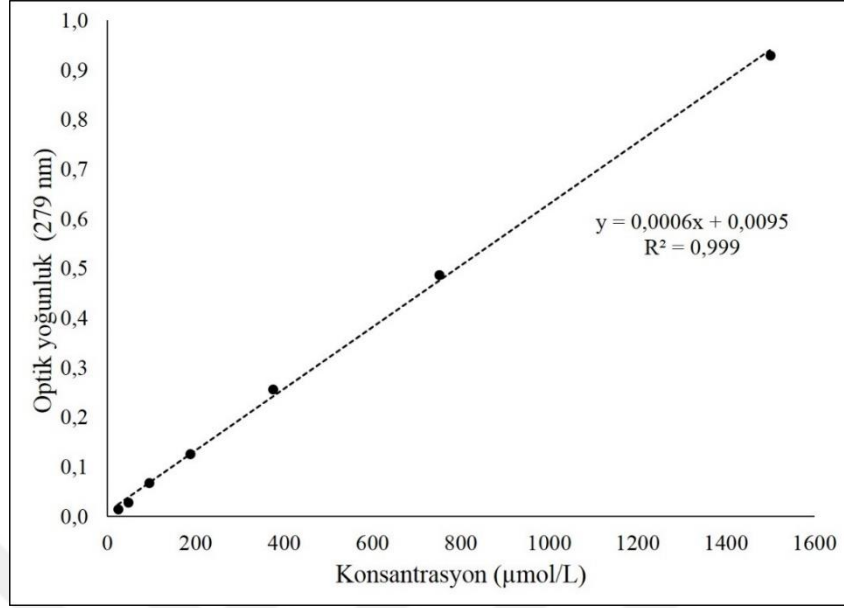
Şekil 4.68. Melatonin ile modifiye edilmiş ipek filmler üzerinde kültüre edilen hMSClerin mitokondriyal aktiviteleri. (İstatistiksel olarak anlam farklılığı, 0 µM kontrol grubu iken, * $p<0.05$, ** $p<0.01$, *** $p<0.001$).

Alamar Mavisi sonuçlarına göre farklı melatonin konsantrasyonlarının ipek filmler üzerinde kültüre edilen hMSCler üzerinde 7 gün süren çalışmalar boyunca belirgin bir toksik etki yaratmadığı ve hücrelerin kültürün ilerleyen günlerinde çoğalmaya devam ettikleri belirlenmiştir (Şekil 4.68). Ancak, 62.5 µM ve 125 µM melatonin konsantrasyonlarının kültürün ilk gününde hücrelerin proliferasyonunu azalttığı ($p<0.01$ ve $p<0.001$) ve kültürün ilerleyen günlerinde de bu değerlere ait floresan şiddetlerinin kontrole göre istatistiksel olarak anlamlı derecede düşük olduğu görülmüştür. Kültürün 5. ve 7. günlerinde ise 2,000 µM melatonin konsantrasyonu, hücre proliferasyonunu önemli derecede azaltmıştır ($p<0.001$). Melatoninin 250 µM, 500 µM ve 1,000 µM konsantrasyonlarının ise kültürün tüm günlerinde hMSClerin mitokondriyal aktiviteleri üzerinde olumsuz bir etkisi olmadığı belirlenmiş ($p>0.05$) ve bu nedenle çalışmanın ilerleyen kısımlarında bu üç konsantrasyonun kullanılmasına karar verilmiştir.

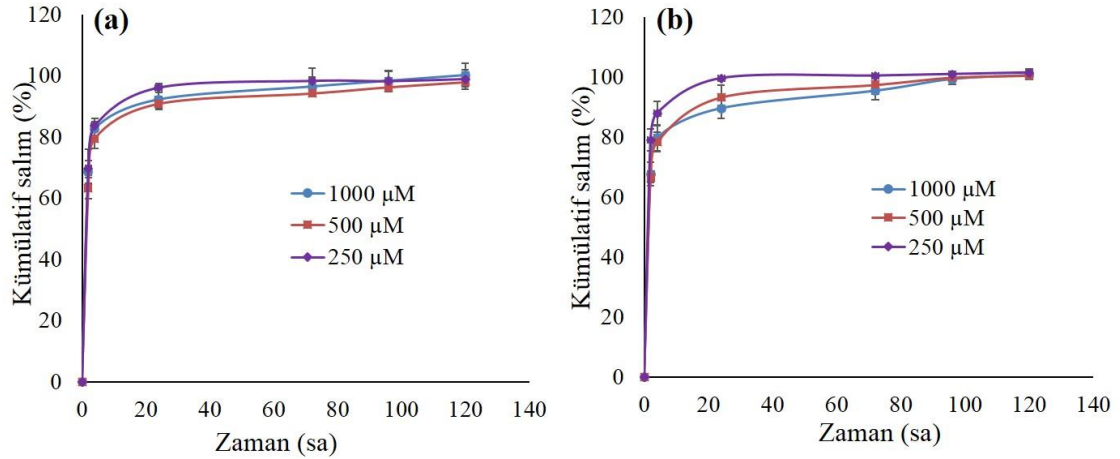
4.9.4. *İn vitro* melatonin salım çalışmaları

İn vitro salım çalışmaları “metanol ile tavlanmış” ve “su ile tavlanmış” ipek filmler kullanılarak 4 paralel örnek ile gerçekleştirilmiştir. Salınan melatonin konsantrasyonunun

belirlenmesi için kullanılan kalibrasyon grafiği Şekil 4.69’da sunulmuştur. Beş gün süren salım çalışmaları sonucunda kümülatif melatonin salım kinetiği Şekil 4.70’de verilmiştir.



Şekil 4.69. Salınan melatonin konsantrasyonunun belirlenmesi için kullanılan kalibrasyon grafiği.



Şekil 4.70. (a) Metanol ile tavllanmış, (b) su ile tavllanmış ipek filmlerden kümülatif yüzde melatonin salımı.

Hem metanol ile tavllanmış hem de su ile tavllanmış ipek filmlerden melatonin salımının büyük bir kısmı ilk 24 saatte ani patlama etkisi ile gerçekleşmiş ve sonrasında 5 gün boyunca kontrollü bir şekilde devam etmiştir (Şekil 4.70). İpek filmlerin β -tabaka miktarlarını arttırmak için uygulanan tavlama yöntemlerinin melatonin salımı üzerinde belirgin bir etkisinin olmadığı görülmüştür. Farklı konsantrasyonlarda melatonin içeren ipek filmlerden

salınan kümülatif melatonin miktarları incelendiğinde, 250 μM , 500 μM ve 1,000 μM melatonin konsantrasyonlarına ait melatonin salım değerleri 5 günün sonunda sırasıyla, yaklaşık 17 μg , 35 μg ve 70 μg olarak belirlenmiştir. Bu grafikten yararlanılarak belirli zamanlarda ipek filmlerden salınan kümülatif melatonin miktarları Çizelge 4.7’de sunulmuştur.

Çizelge 4.7. İpek filmlerden salınan kümülatif melatonin miktarları.

Metanol ile Tavlama	Salınan Melatonin Miktarı ($\mu\text{g}/300 \mu\text{L PBS}$)						
Melatonin konsantrasyonu (μM)	0 sa	2 sa	4 sa	24 sa	72 sa	96 sa	120 sa
1000	0.00	50.69	61.19	68.21	71.34	72.73	74.11
500	0.00	23.37	29.41	33.60	34.84	35.60	36.21
250	0.00	11.83	14.21	16.33	16.70	16.71	16.81
Su ile Tavlama	Salınan Melatonin Miktarı ($\mu\text{g}/300 \mu\text{L PBS}$)						
Melatonin konsantrasyonu (μM)	0 sa	2 sa	4 sa	24 sa	72 sa	96 sa	120 sa
1000	0.00	50.10	59.00	66.28	70.59	73.47	74.44
500	0.00	24.59	29.00	34.51	36.05	36.95	37.19
250	0.00	13.43	14.95	16.92	17.07	17.15	17.24

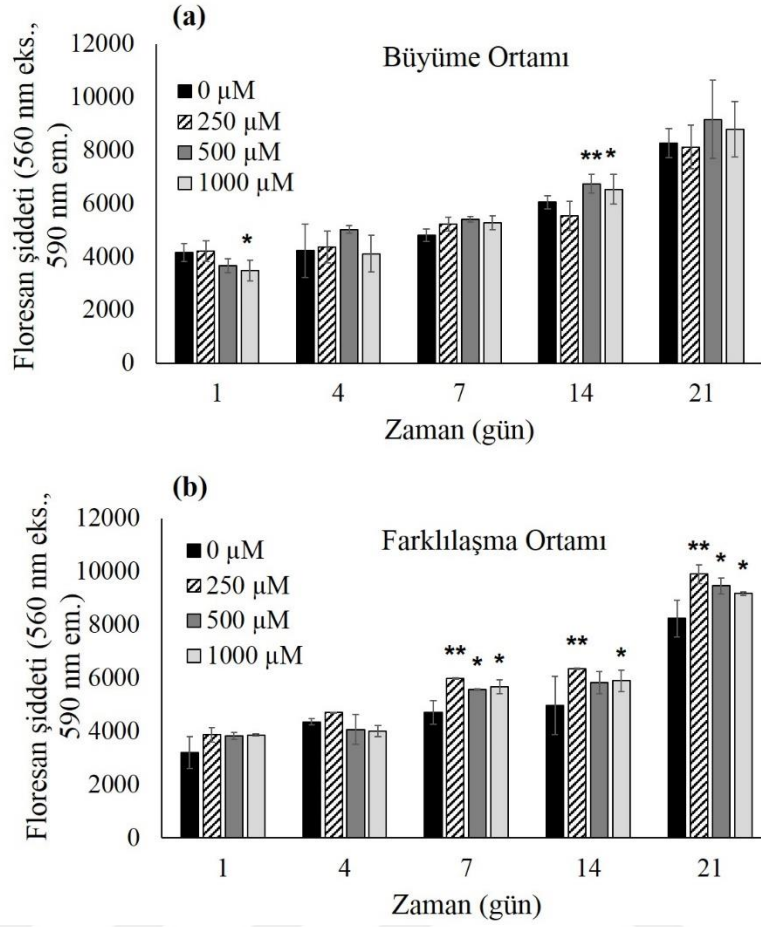
Melatoninin ipek filmlerden salım davranışında belirgin bir fark olmamasından dolayı, çok daha kısa süren bir yöntem olduğundan çalışmanın bundan sonraki aşamalarında ipek filmlerin β -tabaka içeriğinin artırılması için metanol ile tavlama kararı verilmiştir.

4.9.5. İpek filmler üzerinde kültüre edilen hMSClerin osteojenik farklılaşmasının incelenmesi

Melatoninin üç farklı konsantrasyonunun (250, μM , 500 μM ve 1,000 μM) metanol ile tavlama ipek filmlerde kültüre edilen hMSClerin osteojenik farklılaşması üzerindeki etkisinin incelenmesi amacıyla 21 gün süren *in vitro* hücre kültür çalışmaları gerçekleştirilmiştir. Ayrıca, seçilen melatonin konsantrasyonlarının, osteojenik farklılaşma faktörlerinin bulunmadığı durumda hücrelerin farklılaşması üzerinde etkisinin olup olmadığının incelenmesi amacıyla sadece büyüme ortamı ile de çalışmalar sürdürülmüştür.

4.9.5.1. Hücre canlılığının belirlenmesi

Melatonin yüklü ipek filmler üzerinde kültüre edilen hücrelerin metabolik aktiviteleri Alamar Mavisi analizi ile 21 gün boyunca incelenmiştir. Büyüme ortamı ve farklılaşma ortamında kültüre edilen hücrelere ait grafikler, sırasıyla, Şekil 4.71-a ve Şekil 4.71-b’de sunulmuştur.



Şekil 4.71. İpek filmler üzerinde kültüre edilen hücrelerin mitokondriyal aktiviteleri: (a) büyüme ortamı, (b) farklılaşma ortamı. (İstatistiksel olarak anlam farklılığı, 0 µM kontrol grubu iken, * $p<0.05$, ** $p<0.01$, *** $p<0.001$).

Melatonin ile modifiye edilmiş ipek filmler üzerinde kültüre edilen hMSClerin büyüme ortamındaki mitokondriyal aktiviteleri ilk 7 gün boyunca tüm melatonin konsantrasyonları için benzerdir ve sadece kültürün ilk gününde 1,000 µM melatonin konsantrasyonu haricinde ($p<0.05$) kontrolle arasında istatistiksel olarak anlamlı bir fark bulunmamaktadır ($p>0.05$). Ancak, kültürün 14. gününde, 500 µM ($p<0.05$) ve 1,000 µM ($p<0.01$) melatonin konsantrasyonlarının hücrelerin mitokondriyal aktivitelerini önemli derecede arttırdığı görülmüştür (Şekil 4.71-a). Melatoninin hücre üremesi üzerindeki etkisi farklılaşma ortamında kültüre edilen hücrelerde çok daha belirgin bir şekilde gözlenmiştir (Şekil 4.71-b). Kültürün 7. gününden itibaren, tüm melatonin konsantrasyonlarının hücrelerin mitokondriyal aktivitelerini kontrole göre istatistiksel olarak belirgin bir şekilde arttırdığı görülmüştür.

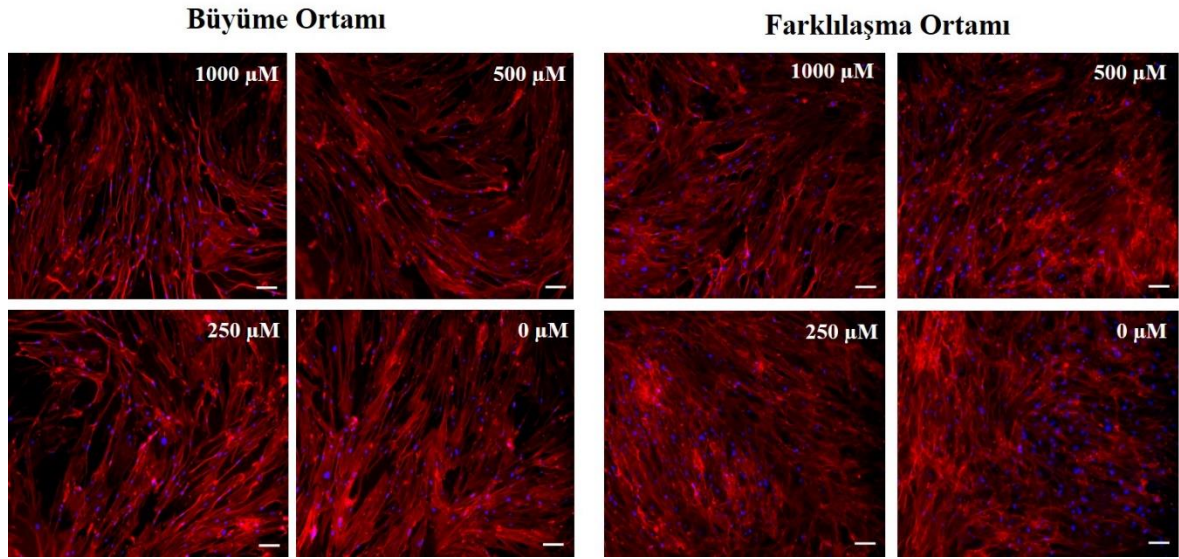
Literatürde büyüme ortamında gerçekleştirilen bir çalışmada, mikromolar mertebedeki (50 µM, 100 µM ve 150 µM) melatonin konsantrasyonlarının kemik iliği kökenli hMSClerin

proliferasyonunu konsantrasyon bağımlı olarak arttırdığı belirtilmiştir [177]. Bunun yanı sıra, yapılan bir çalışmada serbest haldeki farklı melatonin konsantrasyonlarının (0.01 μ M, 1 μ M ve 100 μ M) hMSClerin proliferasyonu üzerinde belirgin bir etkisinin olmadığı görülmüştür [205]. Bir diğer çalışmada ise, melatonin yüklü PLGA mikropartiküller üretilmiş ve mikropartiküllerden salınan melatoninin farklılaşma ortamında kültüre edilen hMSClerin proliferasyonu üzerinde belirgin bir etkisinin olmadığı görülmüştür [61].

Tez kapsamında gerçekleştirilen çalışmada ise, melatoninin mikromolar konsantrasyonlarının (250 μ M, 500 μ M ve 1,000 μ M) ipek filmler üzerinde kültüre edilen hMSClerin proliferasyonunu büyüme ortamında pek etkilemediği, ancak farklılaşma ortamında özellikle kültürün ilerleyen günlerinde arttırdığı sonucuna varılmıştır.

4.9.5.2. Hücre morfolojisinin incelenmesi

Melatonin ile modifiye edilmiş ipek filmler üzerinde büyüme ve farklılaşma ortamı içerisinde kültüre edilen hMSClerin morfolojilerini incelemek amacıyla kültürün 7. gününde F-aktin/DAPI boyaması gerçekleştirilmiş ve hücrelerin floresan mikroskop görüntüleri Şekil 4.72’de verilmiştir.



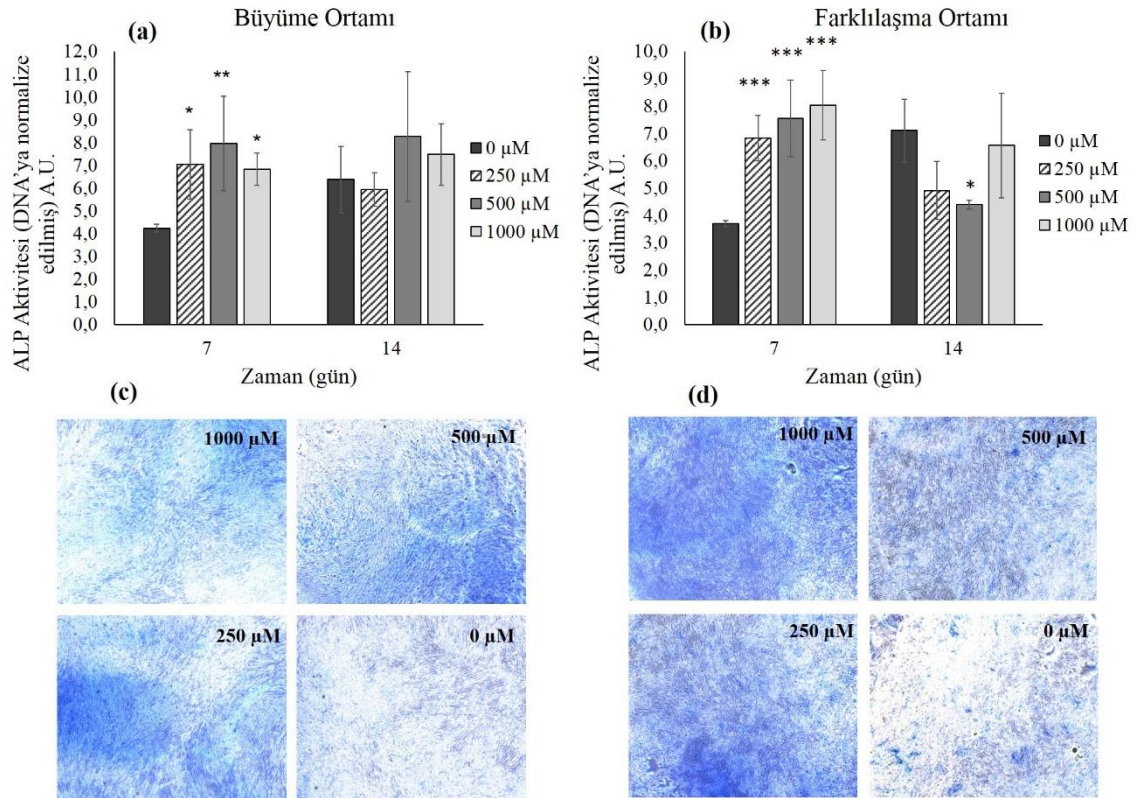
Şekil 4.72. İpek filmler üzerinde büyüme ve farklılaşma ortamında kültüre edilen hücrelerin kültürün 7. gününe ait floresan mikroskop görüntüleri (mavi renk: hücre çekirdeğini; kırmızı renk: aktin filamentlerini göstermektedir, 10 X büyütme, ölçek çubukları 100 μ M’yi temsil etmektedir).

Mezenkimal kök hücreler, kendini sürekli yenileyebilme kapasitesine sahip olan, kemik, kıkırdak, yağ, kas ve sinir hücresi gibi birçok dokuya ait hücreye dönüşebilme yeteneği olan hücrelerdir. Hücre yapışması, büyümesi ve sinyalizasyon gibi çeşitli hücre davranışlarında

mezenkimal kök hücrelerin hücre iskeletlerinde meydana gelen değişimler oldukça önemli bir rol oynamaktadır. Böylece, hücreler göç etmekte, bölünmekte ve farklılaşma sırasında şekillerini korumaktadırlar [206, 207]. Sunulan çalışmada, büyüme ve farklılaşma ortamında kültüre edilen hücrelerin morfolojilerinde çok belirgin bir değişim olmamakla birlikte, detaylı incelendiğinde büyüme ortamındaki hücrelerin aktin filamentlerinin daha uzun ve birbirine paralel olduğu, osteojenik ortamdakilerin ise daha yoğun ve karmaşık bir yapıda oldukları belirlenmiştir. Bu da literatürde de belirtildiği gibi hücrelerin osteojenik farklılaşmaya başladığının bir göstergesidir [207].

4.9.5.3. ALP aktivitesinin tayini

Yüzeyi melatonin ile modifiye edilmiş ipek filmler üzerinde hem büyüme ortamı hem de farklılaşma ortamı içerisinde kültüre edilen hMSClerin ALP aktiviteleri, kültürün 7. ve 14. günlerinde ALP boyaması ile tayin edilmiştir. ALP boyamalarının floresan şiddeti spektrofotometrik olarak belirlenmiş ve her grup için DNA miktarına göre normalize edilmiştir. Hücrelerin ALP aktivitelerini gösteren grafikler ve kültürün 7. gününe ait ALP boyamaları Şekil 4.73'te verilmiştir.



Şekil 4.73. İpek filmler üzerinde kültüre edilen hMSClerin ALP aktiviteleri: (a) büyüme ortamı, (b) farklılaşma ortamı. (İstatistiksel olarak anlam farklılığı, 0 μ M kontrol grubu iken, * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$); (c) büyüme ortamında ve (d) farklılaşma ortamında kültüre edilen hMSClerin kültürün 7. günündeki ALP boyama görüntüleri (4 X).

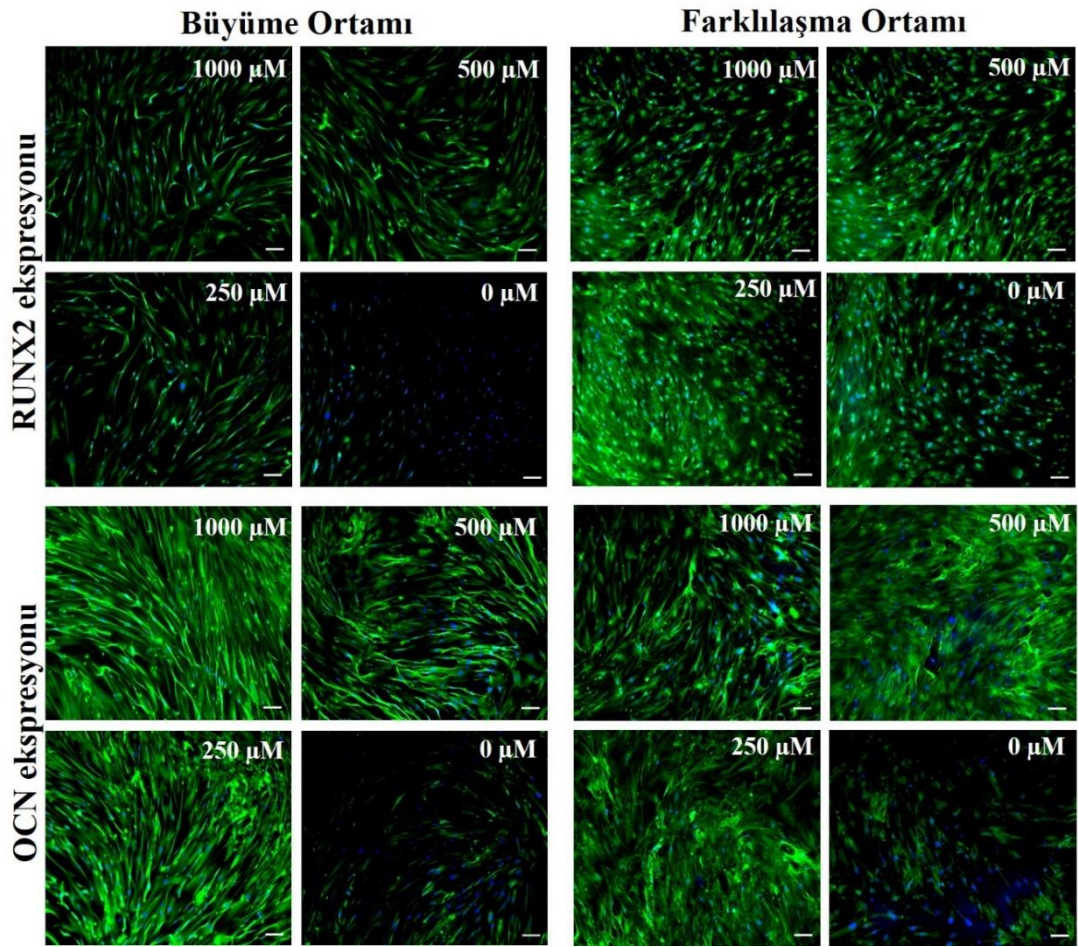
Daha önceden de bahsedildiği gibi ALP, erken dönem osteojenik farklılaşmanın bir göstergesidir. Kültürün 7. gününde, büyüme ortamında kültüre edilen hücrelerin ALP aktivitelerinde 250 μ M ve 500 μ M melatonin konsantrasyonlarında bir miktar artış olurken ($p<0.05$), 1,000 μ M melatonin konsantrasyonunda çok daha fazla bir artış meydana gelmiştir ($p<0.01$). Kültürün 14. gününde ise gruplar arasında belirgin bir fark görülmemiştir (Şekil 4.73-a). Buna karşın, melatoninin tüm konsantrasyonları, osteojenik ortamda kültüre edilen hücrelerin ALP aktivitesini kültürün 7. gününde istatistiksel olarak önemli derecede arttırmıştır ($p<0.001$). Kültürün 14. gününde ise, 500 μ M melatonin konsantrasyonuna ait ALP aktivitesi kontrole göre bir miktar düşükkken ($p<0.05$), diğer gruplar arasında fark görülmemiştir. ALP aktivitesinin kültürün 14. gününde 500 μ M melatonin konsantrasyonunda diğer gruplara göre düşük olması, bu grubun maksimum ALP değerine diğerler gruplardan daha önce ulaştığı ve sonrasında diğer gruplardaki ALP aktiviteleri hala artış gösterirken, bu grupta düşmeye başlaması ile açıklanabilir. Ayrıca, melatonin içermeyen ipek filmlerde hem büyüme hem de osteojenik ortamda kültüre edilen hücrelerin ALP aktiviteleri kültürün 7. gününden 14. gününe bir artış göstermiştir. Dolayısıyla ipek filmlerin yüzeyinin melatonin ile modifikasyonu, hücrelerin kontrole göre daha erken farklılaşmasını sağlamıştır. Sonuç olarak 250 μ M, 500 μ M ve 1,000 μ M melatonin konsantrasyonları hem büyüme hem de osteojenik ortamda kültüre edilen hücrelerin erken dönem osteojenik farklılaşmasını indüklemiştir. Ancak, osteojenik ortamdaki β -gliserol fosfat, askorbik asit ve deksametazon gibi farklılaşma faktörlerinin varlığında melatoninin etkisi çok daha belirgindir.

Literatürde, melatoninin farklı konsantrasyonlarının osteojenik farklılaşma faktörlerinin varlığında ve yokluğunda hMSClerin farklılaşması üzerindeki etkilerini aynı anda inceleyen bir çalışma bulunmamaktadır. Calvo-Guirado ve ark., 50 μ M melatonin konsantrasyonunun büyüme ortamında kültüre edilen kemik iliği kökenli hMSClerin ALP aktivitesini arttırdığını belirtmişlerdir [Calvo-Guirado et al., 2015]. Zhang ve ark. [Zhang et al., 2013] ise, PLGA mikropartiküllerden kontrollü bir şekilde salınan mikromolar konsantrasyondaki melatoninin osteojenik farklılaşma ortamında kültüre edilen kemik iliği kökenli hMSClerin ALP aktivitesini arttırdığını vurgulamışlardır. Sonuç olarak, ALP aktivitesinin tayini sonucu elde edilen sonuçların literatür ile de uyumlu olduğu görülmüştür.

4.9.5.4. İmmün boyama çalışmaları

Melatoninin, hMSClerin ve preosteoblastların olgun osteoblastlara dönüşmesindeki etki mekanizmasının ERK 1/2 ve Wnt/ β -katenin sinyal yolları üzerinden gerçekleştiği

bilinmektedir. Bu sinyal yollarında melatonin ile aktive olan melatonin reseptörleri MAPK aktivitesinin artmasına yol açmakta ve bu da sitoplazma içerisinde ALP aktivitesini arttırmaktadır. MAPKların aktivasyonu ile aynı zamanda RUNX2 ekspresyonunda artış gözlenmekte ve sonrasında da OCN ekspresyonu tetiklenmektedir [46, 208]. Bu nedenle, ipek filmler üzerinde kültüre edilen hMSClerin büyüme ve farklılaşma ortamlarındaki osteojenik farklılaşma kapasiteleri, sırasıyla erken ve geç dönem osteojenik farklılaşma belirteçleri olan RUNX2 ve OCN proteinlerinin ekspresyon seviyelerinin immün boyamalarla belirlenmesi ile incelenmiştir. Kültürün 7. ve 14. gününe ait floresan mikroskop görüntüleri, sırasıyla, Şekil 4.74 ve Şekil 4.75'te verilmiştir.

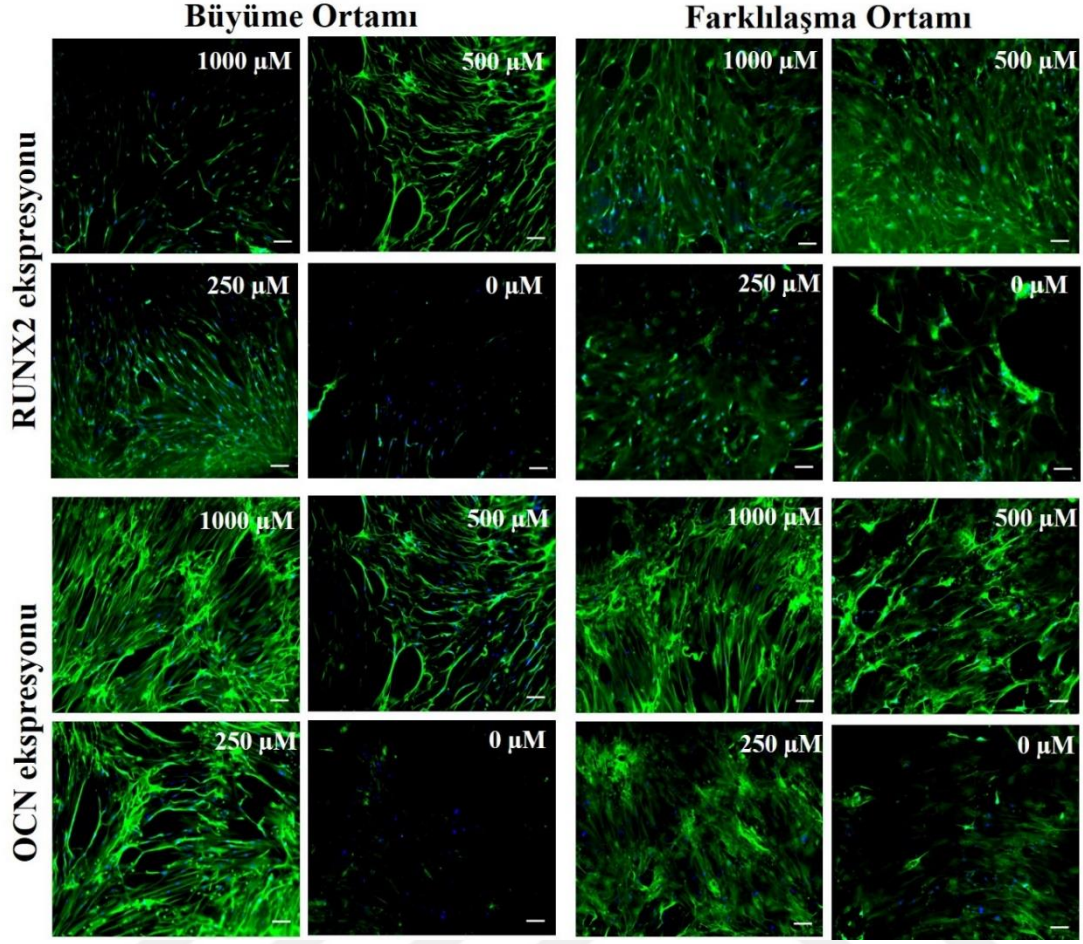


Şekil 4.74. Büyüme ve farklılaşma ortamında yüzeyi melatonin ile modifiye edilmiş ipek filmler üzerinde kültüre edilen hMSClerin kültürün 7. gününe ait RUNX2 ve OCN immün boyama görüntüleri (mavi renk: hücre çekirdeğini; yeşil renk: RUNX2 ve OCN ekspresyonlarını göstermektedir, 10 X büyütme, ölçek çubukları 100 µM'yi temsil etmektedir).

RUNX2 proteini, osteojenik farklılaşma için temel farklılaşma faktörlerindendir ve olgunlaşmamış osteoblastlarda ekspresyonu artarken, olgun osteoblastlarda azalmaktadır [209]. Kültürün 7. gününe ait floresan mikroskop görüntüleri incelendiğinde (Şekil 4.74),

büyüme ortamında melatonin olmadığı koşulda, neredeyse hiç RUNX2 ekspresyonu gözlenmemiştir. Ancak, 250 μ M, 500 μ M ve 1,000 μ M melatonin konsantrasyonlarında kontrole göre RUNX2 ekspresyonunda belirgin bir artış meydana gelmiştir. Farklılaşma ortamında ise tüm gruplarda büyüme ortamına göre RUNX2 ekspresyon şiddetinde artış meydana gelmiştir. Bu beklenen bir sonuçtur çünkü farklılaşma ortamında bulunan β -gliserol fosfat, askorbik asit ve dekzametazon gibi faktörler osteojenik farklılaşmayı indüklemiştir. Bununla birlikte, farklılaşma ortamında kültüre edilen hücreler melatonin varlığında daha fazla RUNX2 proteini eksprese etmişlerdir ve en yüksek ekspresyon seviyesi 250 μ M melatonin konsantrasyonunda görülmüştür.

OCN ise sadece kemik dokusuna özgü bir hücre dışı matris proteinidir ve farklılaşmanın geç dönemlerinde farklılaşmış osteoblastlar ve olgun osteositler tarafından sentezlenirken, osteoprojenitör hücreler veya mezenkimal kök hücreler tarafından sentezlenmezler [210]. İpek filmler üzerinde hem büyüme hem de farklılaşma ortamında kültüre edilen hücrelerin kültürün 7. gününe ait OCN ekspresyon seviyeleri 250 μ M, 500 μ M ve 1,000 μ M melatonin konsantrasyonları ile etkileşen hücrelerde melatonin içermeyen gruplara göre daha fazladır. OCN her ne kadar geç dönem osteojenik farklılaşma belirteci olsa da, kültürün 7. gününde melatonin içeren gruplarda OCN ekspresyonunun görülmesi, melatoninin hMSClerin farklılaşmasını indüklediğini kanıtlamaktadır.



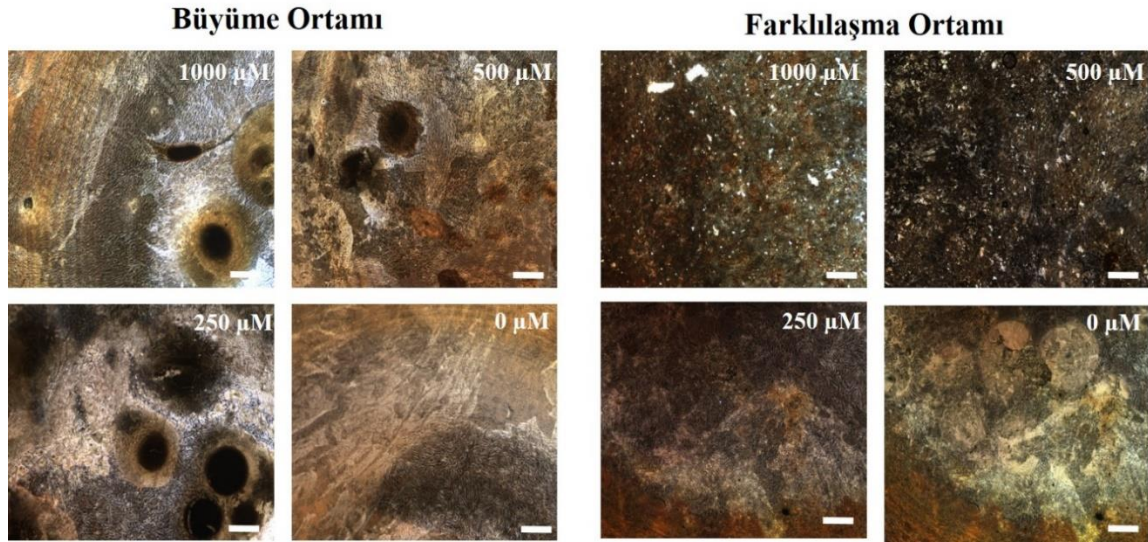
Şekil 4.75. Büyüme ve farklılaşma ortamında yüzeyi melatonin ile modifiye edilmiş ipek filmler üzerinde kültüre edilen hMSClerin kültürün 14. gününe ait RUNX2 ve OCN immün boyama görüntüleri (mavi renk: hücre çekirdeğini; yeşil renk: RUNX2 ve OCN ekspresyonlarını göstermektedir, 10 X büyütme, ölçek çubukları 100 μM 'yi temsil etmektedir).

Kültürün 14. gününde de RUNX2 ve OCN ekspresyonları incelenmiş ve elde edilen immün boyama görüntüleri Şekil 4.75'te sunulmuştur. Bu görüntülerde de 7. gün ile benzer sonuçlar elde edilmiştir. Ancak, hücreler bazı bölgelerde iyice çoğalıp ipek filmlerin yüzeyinden boyama ve yıkama işlemleri sırasında kalktıklarından, 7. gündeki kadar belirgin görüntüler elde edilememiştir.

Yakın zamanda yapılan bir çalışmada, melatoninin kemik iliği kökenli mezenkimal kök hücrelerin adipogenezini inhibe ederken, osteogenezi indüklediği belirlenmiştir [205]. Bu da, kemik rejenerasyonunda kemik iliği kökenli kök hücrelerinin kullanılmasının önemini vurgulamaktadır.

4.9.5.5. Matris mineralizasyonu

Kemik farklılaşmasının geç dönemlerinde kalsiyum birikimi oldukça önemlidir. Tez çalışmasında, melatonin ile modifiye edilmiş ipek filmler üzerinde büyüme ve farklılaşma ortamlarında kültüre edilen hMSCler tarafından salgılanan kalsiyum birikimi Von Kossa boyaması ile kültürün 21. gününde incelenmiş ve elde edilen görüntüler Şekil 4.76’da verilmiştir.



Şekil 4.76. İpek filmler üzerinde kültüre edilen hMSClerin kültürün 21. günündeki Von Kossa boyama görüntüleri (4 X büyütme, ölçek çubukları 100 µM’yi temsil etmektedir).

Büyüme ortamında kültüre edilen hücrelerde melatoninin tüm konsantrasyonlarında (250 µM, 500 µM ve 1,000 µM) kontrole göre belirgin derecede kalsiyum birikimi gözlenmiştir. Ayrıca, farklılaşma ortamındaki hücrelerde daha koyu boyanmalar olmuş ve yine kontrole kıyaslandığında, melatoninin tüm konsantrasyonlarına ait gruplarda daha fazla boyanma meydana gelmiştir. Sonuç olarak, 250 µM, 500 µM ve 1,000 µM melatonin konsantrasyonları ipek filmler üzerinde hem büyüme hem de farklılaşma ortamında kültüre edilen hücrelerin kalsiyum salgısını arttırmıştır.

Gerçekleştirilen tüm hücre kültür çalışmaları sonucunda, melatoninin mikromolar konsantrasyonlarının ipek filmler üzerinde hem büyüme hem de farklılaşma ortamında kültüre edilen hMSClerin osteojenik farklılaşması üzerinde oldukça etkili olduğu belirlenmiştir. Her ne kadar ipek filmlerden melatoninin salımı 5 gün gibi kısa bir sürede gerçekleşse de, hücrelerin farklılaşması üzerindeki etkileri 3 hafta boyunca devam etmiştir. Melatonin ile modifikasyon sonucu ipek filmlerin osteoindüktivitesi artırılmış ve ileride yapılacak çalışmalarda, çeşitli ipek malzemeler üzerine melatonin adsorpsiyonu veya ipek

fibroin çözeltisi ile proses sırasında melatoninin karıştırılması ile üretilecek doku iskeleleri, mezenkimal kök hücrelerin kemik doku mühendisliği uygulamalarında gelecek vaat etmektedir.



5. GENEL SONUÇLAR

Sunulan tez çalışması kapsamında, melatoninin hem kemik doku mühendisliği hem de osteosarkom üzerindeki ikili etkisi incelenmiştir. Melatoninin kemik doku mühendisliği üzerindeki etkisinin incelenmesi amacıyla, öncelikle melatonin yüklü PLGA nano/mikropartikülleri üretilmiş ve ardından bu partiküllerin kitosan/HAp yapısına katılması ile doku iskeleleri hazırlanmıştır. Kitosan/HAp-bazlı doku iskelelerinden kontrollü ve uzun dönemde salınan melatoninin preosteoblastik MC3T3-E1 hücrelerinin osteojenik farklılaşması üzerindeki etkileri *in vitro* hücre kültür çalışmaları ile incelenmiştir. Melatoninin osteosarkom üzerindeki etkisinin incelenmesi amacıyla, kitosan/HAp-bazlı doku iskelelerine melatonin-siklodekstrin inklüzyon kompleksi yüklenerek bu sistemden melatoninin yüksek miktarda ve hızlı salımı ile insan osteosarkom MG-63 hücrelerinin inhibisyonu sağlanmıştır. Çalışmanın son kısmında, melatonin ile modifiye edilmiş ipek filmler üzerinde kültüre edilen hMSClerin osteojenik farklılaşma davranışları büyüme ve farklılaşma ortamlarında incelenmiştir. Tez çalışması kapsamında elde edilen önemli sonuçlar aşağıda özetlenmiştir.

- PLGA nanopartiküllerin üretiminin optimizasyonu için homojenizasyon hızının ve süresinin partikül üretim verimine olan etkileri incelenmiş ve en uygun homojenizasyon hızı ve süresi, sırasıyla 15,000 rpm ve 7 dk olarak belirlenmiştir.
- PLGA mikropartiküllerin emülsiyon oluşturma/çözücü buharlaştırma yöntemi ile üretiminde, organik çözücü olarak DCM'in, stabilizör olarak da PVA'nın kullanımının partikül boyutu ve enkapsülasyon verimi üzerinde oldukça belirleyici olduğu görülmüştür.
- PLGA nano/mikropartiküllerin üretimi sırasında melatoninin amfifilik yapısından dolayı sulu faza difüzlenme eğilimi olmuş, bu nedenle de enkapsülasyon verim değerleri düşük çıkmıştır. Bunu önlemek amacıyla sulu faza melatonin eklenerek enkapsülasyon verimi artırılmıştır.
- PLGA nano-10, PLGA nano-20, PLGA mikro-10 ve PLGA mikro-20 partiküllerinin melatonin enkapsülasyon verimleri, sırasıyla 14.2 ± 3.1 %, 10.3 ± 4.4 %, 27.2 ± 2.8 ve 17.3 ± 3.4 olarak belirlenmiştir.
- *In vitro* salım çalışmaları sonucunda melatoninin PLGA nano/mikropartiküllerden uzun dönemde ve kontrollü bir şekilde salındığı belirlenmiştir. Ayrıca salım davranışının matematiksel olarak incelenmesi sonucunda, melatonin salımının

Higuchi modeline uyduğu ve dolayısıyla melatoninin partiküllerden difüzyon mekanizmasıyla salındığı görülmüştür.

- MG-63 insan osteosarkom hücrelerinin karakterizasyonu sonucunda hücrelerin özgül üreme hızı 0.026 sa^{-1} , ikilenme süresi ise 27 sa olarak hesaplanmıştır.
- Melatoninin farklı konsantrasyonlarının (0-8 mM) hem MC3T3-E1 hücreleri hem de MG-63 hücreleri üzerindeki etkileri incelenmiş ve melatoninin bu hücrelerin proliferasyonunu sırasıyla, 2 mM ve 4 mM'dan itibaren inhibe ettiği belirlenmiştir. Dolayısıyla, kanser hücrelerinin yüksek melatonin konsantrasyonuna karşı normal hücrelere göre daha dayanıklı olduğu sonucuna varılmıştır.
- PLGA nanopartiküllerin MC3T3-E1 ve MG-63 hücreleri ile etkileşimi sonucunda boyutlarından dolayı hücre içerisine alınarak hücreler üzerinde toksik etki gösterdikleri ve kanser hücreleri tarafından alınan partikül miktarının normal hücrelere göre daha fazla olduğu belirlenmiştir.
- Kitosan doku iskeleleri dondurarak-kurutma yöntemi ile başarıyla üretilmiştir. Doku iskelelerinin nötralizasyonu hem etanol ile hem de sodyum karbonat ile gerçekleştirilmiş ve yapılan çalışmalar sonucunda sodyum karbonat nötralizasyonunun iskelenin stabilizasyonu açısından daha başarılı olduğu görülmüştür.
- Kitosan doku iskeleleri ve MC3T3-E1 hücreleri ile gerçekleştirilen *in vitro* öncül hücre kültür çalışmaları sonucunda kitosanın hücre yapışması ve üremesini desteklemediği sonucuna varılmış ve bu nedenle kitosan doku iskelelerinin HAp ile modifiye edilmesine karar verilmiştir.
- Toz ve boncuk formundaki HAp partiküller kitosan yapısına üretim aşamasında katılarak dondurarak-kurutma yöntemi ile hazırlanmış ve MC3T3-E1 hücreleri ile gerçekleştirilen *in vitro* hücre kültür çalışmaları sonucunda boncuk formunda HAp partiküllerin eklenmesi ile üretilen doku iskelelerinin hücre proliferasyonu ve farklılaşması açısından daha olumlu sonuçlar verdiği belirlenmiştir.
- PLGA nano/mikropartikülleri, kitosan/HAp doku iskelelerine hem iskele üretimi sırasında doğrudan yapıya katılarak hem üretim sonrasında iskeleye emdirilerek başarılı bir şekilde yüklenmiştir.
- Kitosan/HAp doku iskelelerine yüklenecek PLGA nano/mikropartiküllerin miktarının belirlenmesi amacıyla SEM analizinden yararlanılmıştır. İskele

gözenekliliğine zarar vermediğinden, partiküllerin iskele başına 0.5 mg olacak şekilde yüklenmesine karar verilmiştir.

- *In vitro* salım çalışmaları sonucunda, hazırlanan PLGA nano/mikropartikül yüklü kitosan/HAp doku iskelelerinden salınan melatonin mikromolar konsantrasyonda olduğu ve Higuchi salım modeline uyduğu belirlenmiştir.
- Hazırlanan kitosan/HAp-bazlı doku iskeleleri ve MC3T3-E1 hücreleri ile *in vitro* hücre kültür çalışmaları gerçekleştirilmiş ve PLGA mikropartikül yüklü kitosan/HAp doku iskelelerinin, hücrelerin osteojenik farklılaşmasını desteklediği belirlenmiştir. Bu gruplar arasında en iyi sonucu veren doku iskelesi ise kitosan/HAp+Mp olarak seçilmiştir.
- Kitosan/HAp+Mp doku iskelelerinden salınan melatonin hMSClerin osteojenik farklılaşması üzerindeki etkilerini incelemek amacıyla *in vitro* hücre kültür çalışmaları gerçekleştirilmiş ancak bu iskelelerin hMSClerin yapışması ve üremesini desteklemediği görülmüştür.
- Melatonin hem sudaki çözünürlüğünün artırılarak yüksek miktarda doku iskelelerine yüklenebilmesi, hem de iskelelerden hızlı bir şekilde salınması amacıyla melatonin-siklodekstrin inklüzyon kompleksi mikrodalga teknolojisi kullanılarak üretilmiş ve kitosan/HAp doku iskelelerine başarılı bir şekilde yüklenmiştir.
- Melatonin-siklodekstrin inklüzyon kompleksi yüklü kitosan/HAp doku iskelelerinden melatonin 5 gün gibi oldukça kısa bir zamanda salındığı ve salınan melatonin milimolar konsantrasyonda olduğu belirlenmiştir.
- Geliştirilen melatonin-siklodekstrin inklüzyon kompleksi yüklü kitosan/HAp doku iskelelerinin dolaylı olarak MG-63 hücreleri ile etkileştirilmesi sonucunda hücrelerin hücre döngüsünün G₀/G₁ fazında inhibe olduğu belirlenmiştir.
- İpek filmlerin yapısındaki β -tabakaların miktarının artırılması için “metanol ile tavlama” ve “su ile tavlama” yöntemleri kullanılmıştır. Melatonin salımında belirgin bir fark olmadığından ve çok daha kolay bir yöntem olduğundan “metanol ile tavlama” yönteminin daha avantajlı olduğu sonucuna varılmıştır.
- İpek filmlerin yüzeyi farklı konsantrasyonlarda (250 μ M, 500 μ M ve 1000 μ M) melatonin ile modifiye edilmiş ve *in vitro* salım çalışmaları sonucunda melatonin ipek filmlerden 5 gün gibi kısa bir sürede tamamen salındığı belirlenmiştir.
- Yüzeyi melatonin ile modifiye edilmiş ipek filmler ve hMSCler ile hem büyüme hem de farklılaşma ortamında gerçekleştirilen *in vitro* hücre kültür çalışmaları sonucunda,

melatonin varlığının hMSClerin osteojenik farklılaşmasını belirgin derecede desteklediği sonucuna varılmıştır.

Tez kapsamında elde edilen tüm bu bulgular ışığında, melatoninin hem kemik rejenerasyonu hem de osteosarkom üzerinde etkisinin incelenebildiği doku iskelesi-temelli bir taşıyıcı sistem geliştirilmiş ve bu sistemin osteosarkom tedavisinde lokal olarak kullanılabilecek bir *in vitro* model olabileceği yorumu yapılmıştır.



KAYNAKLAR

- [1] Stevens, M.M., Biomaterials for bone tissue engineering, *Materials Today*, 11, 18-25, **2008**.
- [2] Liu, X., Ma, P.X., Polymeric scaffolds for bone tissue engineering, *Annals of Biomedical Engineering*, 32, 477-486, **2004**.
- [3] Dass, C.R., Choong, P.F., Zoledronic acid inhibits osteosarcoma growth in an orthotopic model, *Molecular Cancer Therapeutics*, 6, 3263-3270, **2007**.
- [4] Janeway, K.A., Walkley, C.R., Modeling human osteosarcoma in the mouse: From bedside to bench, *Bone*, 47, 859-865, **2010**.
- [5] Salgado, A.J., Coutinho, O.P., Reis, R.L., Bone tissue engineering: state of the art and future trends, *Macromolecular Bioscience*, 4, 743-765, **2004**.
- [6] Wei, G., Ma, P.X., Structure and properties of nano-hydroxyapatite/polymer composite scaffolds for bone tissue engineering, *Biomaterials*, 25, 4749-4757, **2004**.
- [7] Gürsoy, A.Z., *Kontrollü Salım Sistemleri*, Kontrollü Salım Sistemleri Derneği, İstanbul, **2002**.
- [8] Cardinali, D.P., Ladizesky, M.G., Boggio, V., Cutrera, R.A., Mautalen, C., Melatonin effects on bone: experimental facts and clinical perspectives, *Journal of Pineal Research*, 34, 81-87, **2003**.
- [9] Liu, J., Huang, F., He, H.-W., Melatonin effects on hard tissues: Bone and tooth, *International Journal of Molecular Sciences*, 14, 10063-10074, **2013**.
- [10] Satomura, K., Tobiume, S., Tokuyama, R., Yamasaki, Y., Kudoh, K., Maeda, E., Nagayama, M., Melatonin at pharmacological doses enhances human osteoblastic differentiation in vitro and promotes mouse cortical bone formation in vivo, *Journal of Pineal Research*, 42, 231-239, **2007**.
- [11] Lissoni, P., Is there a role for melatonin in supportive care?, *Supportive Care in Cancer*, 10, 110-6, **2002**.
- [12] Srinivasan, V., Spence, D.W., Pandi-Perumal, S.R., Trakht, I., Cardinali, D.P., Therapeutic actions of melatonin in cancer: possible mechanisms, *Integrative Cancer Therapies*, 7, 189-203, **2008**.
- [13] Gong, T., Xie, J., Liao, J., Zhang, T., Lin, S., Lin, Y., Nanomaterials and bone regeneration, *Bone Research*, 3, 1-7, **2015**.
- [14] Sommerfeldt, D.W., Rubin, C.T., Biology of bone and how it orchestrates the form and function of the skeleton, *European Spine Journal*, 10, 86-95, **2001**.
- [15] Kapinas, K., Delany, A.M., MicroRNA biogenesis and regulation of bone remodeling, *Arthritis Research & Therapy*, 13, 1-11, **2011**.
- [16] Amini, A.R., Laurencin, C.T., Nukavarapu, S.P., Bone tissue engineering: Recent advances and challenges, *Critical Reviews in Biomedical Engineering*, 40, 363-408, **2012**.
- [17] Henkel, J., Woodruff, M.A., Epari, D.R., Steck, R., Glatt, V., Dickinson, I.C., Choong, P.F.M., Schuetz, M.A., Hutmacher, D.W., Bone regeneration based on

- tissue engineering conceptions- A 21st century perspective, *Bone Research*, 3, 216-248, **2013**.
- [18] Drosse, I., Volkmer, E., Capanna, R., De Biase, P., Mutschler, W., Schieker, M., Tissue engineering for bone defect healing: an update on a multi-component approach, *Injury*, 39(2), 9-20, **2008**.
 - [19] Albrektsson, T., Johansson, C., Osteoinduction, osteoconduction and osseointegration, *European Spine Journal*, 10 Suppl 2, 96-101, **2001**.
 - [20] Burg, K.J.L., Porter, S., Kellam, J.F., Biomaterial developments for bone tissue engineering, *Biomaterials*, 21, 2347-2359, **2000**.
 - [21] Ishaug, S.L., Crane, G.M., Miller, M.J., Yasko, A.W., Yaszemski, M.J., Mikos, A.G., Bone formation by three-dimensional stromal osteoblast culture in biodegradable polymer scaffolds, *Journal of Biomedical Materials Research*, 36, 17-28, **1997**.
 - [22] Ma, P.X., Zhang, R., Xiao, G., Franceschi, R., Engineering new bone tissue in vitro on highly porous poly(α -hydroxyl acids)/hydroxyapatite composite scaffolds, *Journal of Biomedical Materials Research*, 54, 284-293, **2001**.
 - [23] Webster, T.J., Ergun, C., Doremus, R.H., Siegel, R.W., Bizios, R., Specific proteins mediate enhanced osteoblast adhesion on nanophase ceramics, *Journal of Biomedical Materials Research*, 51, 475-483, **2000**.
 - [24] Park, K.H., Kang, J.W., Lee, E.M., Kim, J.S., Rhee, Y.H., Kim, M., Jeong, S.J., Park, Y.G., Kim, S.H., Melatonin promotes osteoblastic differentiation through the BMP/ERK/Wnt signaling pathways, *Journal of Pineal Research*, 51, 187-194, **2011**.
 - [25] Yonei, Y., Hattori, A., Tsutsui, K., Okawa, M., Ishizuka, B., Effects of melatonin: basics studies and clinical applications, *Anti-Aging Medicine*, 7, 85-91, **2010**.
 - [26] Clausturat, B., Brun, J., Chazot, G., The basic physiology and pathophysiology of melatonin, *Sleep Medicine Reviews*, 9, 11-24, **2005**.
 - [27] Bongiorno, D., Ceraulo, L., Mele, A., Panzeri, W., Selva, A., Turco Liveri, V., Structural and physicochemical characterization of the inclusion complexes of cyclomaltooligosaccharides (cyclodextrins) with melatonin, *Carbohydrate Research*, 337, 743-754, **2002**.
 - [28] Lerner, A.B., Case, J.D., Takahashi, Y., Lee, T.H., Mori, W., Isolation of melatonin, the pineal gland factor that lightens melanocytes, *Journal of the American Chemical Society*, 80, 2587-2587, **1958**.
 - [29] Koch, B.C., Nagtegaal, J.E., Kerkhof, G.A., ter Wee, P.M., Circadian sleep-wake rhythm disturbances in end-stage renal disease, *Nature Reviews Nephrology* 5, 407-416, **2009**.
 - [30] Özçelik, F., Erdem, M., Bolu, A., Gülsün, M., Melatonin: Genel özellikleri ve psikiyatrik bozukluklardaki rolü, *Psikiyatriye Güncel Yaklaşımlar*, 5, 179-203, **2013**.
 - [31] Şener, G., Karanlığın hormonu: Melatonin, *Marmara Eczacılık Dergisi*, 14, 112-20, **2010**.

- [32] Waldhauser, F., Dietzel, M., Daily and annual rhythms in human melatonin secretion: role in puberty control, *Annals of the New York Academy of Sciences*, 453, 205-214, **1985**.
- [33] Çetin, E., Melatonin ve bağışıklık sistemi, *Erciyes Üniversitesi Veterinerlik Fakültesi Dergisi*, 2, 119-123, **2005**.
- [34] Gümüşderelioğlu, M., Çetin Altındal, D., Melatonin: Drakula hormonu, *Tübitak Yayınları: Bilim ve Teknik Özel Eki*, 24-7, **2014**.
- [35] Reiter, R.J., Melatonin: clinical relevance, *Best Practice & Research Clinical Endocrinology & Metabolism*, 17, 273-285, **2003**.
- [36] Topal, T., Öter, Ş., Korkmaz, A., Melatonin ve kanserle ilişkisi, *Genel Tıp Dergisi*, 19, 137-143, **2009**.
- [37] Hardeland, R., Pandi-Perumal, S.R., Cardinali, D.P., Melatonin, *The international Journal of Biochemistry & Cell Biology*, 38, 313-316, **2006**.
- [38] Ishii, H., Tanaka, N., Kobayashi, M., Kato, M., Sakuma, Y., Gene structures, biochemical characterization and distribution of rat melatonin receptors, *The Journal of Physiological Sciences*, 59, 37-47, **2009**.
- [39] Carlberg, C., Gene regulation by melatonin, *Annals of the New York Academy Sciences*, 917, 387-396, **2000**.
- [40] Ekmekcioglu, C., Melatonin receptors in humans: biological role and clinical relevance, *Biomedicine & Pharmacotherapy*, 60, 97-108, **2006**.
- [41] Inoh, H., Kawakami, N., Matsuyama, Y., Aoki, T., Kanemura, T., Natsume, N., Iwata, H., Correlation between the age of pinealectomy and the development of scoliosis in chickens, *Spine*, 26, 1014-1021, **2001**.
- [42] Machida, M., Miyashita, Y., Murai, I., Dubousset, J., Yamada, T., Kimura, J., Role of serotonin for scoliotic deformity in pinealectomized chicken, *Spine*, 22, 1297-1301, **1997**.
- [43] Conti, A., Conconi, S., Hertens, E., Skwarlo-Sonta, K., Markowska, M., Maestroni, J.M., Evidence for melatonin synthesis in mouse and human bone marrow cells, *Journal of Pineal Research*, 28, 193-202, **2000**.
- [44] Tan, D.X., Manchester, L.C., Reiter, R.J., Qi, W.B., Zhang, M., Weintraub, S.T., Cabrera, J., Sainz, R.M., Mayo, J.C., Identification of highly elevated levels of melatonin in bone marrow: its origin and significance, *Biochimica et Biophysica Acta*, 1472, 206-214, **1999**.
- [45] Hakanson, D.O., Bergstrom, W.H., Phototherapy-induced hypocalcemia in newborn rats: prevention by melatonin, *Science*, 214, 807-809, **1981**.
- [46] Maria, S., Witt-Enderby, P.A., Melatonin effects on bone: potential use for the prevention and treatment for osteopenia, osteoporosis, and periodontal disease and for use in bone-grafting procedures, *Journal of Pineal Research*, 56, 115-25, **2014**.
- [47] Ramírez-Fernández, M., Calvo-Guirado, J., de-Val, J., Delgado-Ruiz, R., Negri, B., Pardo-Zamora, G., Peñarrocha, D., Barona, C., Granero, J., Alcaraz-Baños, M., Melatonin promotes angiogenesis during repair of bone defects: a radiological and histomorphometric study in rabbit tibiae, *Clinical Oral Investigations*, 17, 147-158, **2013**.

- [48] Munoz, F., Lopez-Pena, M., Mino, N., Gomez-Moreno, G., Guardia, J., Cutando, A., Topical application of melatonin and growth hormone accelerates bone healing around dental implants in dogs, *Clinical Implant Dentistry and Related Research*, 14, 226-235, **2012**.
- [49] Takechi, M., Tatehara, S., Satomura, K., Fujisawa, K., Nagayama, M., Effect of FGF-2 and melatonin on implant bone healing: a histomorphometric study, *Journal of Materials Science: Materials in Medicine*, 19, 2949-2452, **2008**.
- [50] Ostrowska, Z., Kos-Kudla, B., Swietochowska, E., Marek, B., Kajdaniuk, D., Ciesielska-Kopacz, N., Influence of pinealectomy and long-term melatonin administration on GH-IGF-I axis function in male rats, *Neuroendocrinology Letters*, 22, 255-262, **2001**.
- [51] Koyama, H., Nakade, O., Takada, Y., Kaku, T., Lau, K.H., Melatonin at pharmacologic doses increases bone mass by suppressing resorption through down-regulation of the RANKL-mediated osteoclast formation and activation, *Journal of Bone and Mineral Research*, 17, 1219-1229, **2002**.
- [52] Collin-Osdoby, P., Li, L., Rothe, L., Anderson, F., Kirsch, D., Oursler, M.J., Osdoby, P., Inhibition of avian osteoclast bone resorption by monoclonal antibody 121F: a mechanism involving the osteoclast free radical system, *Journal of Bone and Mineral Research*, 13, 67-78, **1998**.
- [53] Forsling, M.L., Wheeler, M.J., Williams, A.J., The effect of melatonin administration on pituitary hormone secretion in man, *Clinical Endocrinology*, 51, 637-642, **1999**.
- [54] Luchetti, F., Canonico, B., Bartolini, D., Arcangeletti, M., Ciffolilli, S., Murdolo, G., Piroddi, M., Papa, S., Reiter, R.J., Galli, F., Melatonin regulates mesenchymal stem cell differentiation: a review, *Journal of Pineal Research*, 56, 382-397, **2014**.
- [55] Vriend, J., Reiter, R.J., Melatonin, bone regulation and the ubiquitin-proteasome connection: A review, *Life Sciences*, 145, 152-160, **2016**.
- [56] Roth, J.A., Kim, B.G., Lin, W.L., Cho, M.I., Melatonin promotes osteoblast differentiation and bone formation, *Journal of Biological Chemistry*, 274, 22041-22047, **1999**.
- [57] Son, J.H., Cho, Y.C., Sung, I.Y., Kim, I.R., Park, B.S., Kim, Y.D., Melatonin promotes osteoblast differentiation and mineralization of MC3T3-E1 cells under hypoxic conditions through activation of PKD/p38 pathways, *Journal of Pineal Research*, 57, 385-392, **2014**.
- [58] Rahman, M.Z., Shigeishi, H., Sasaki, K., Ota, A., Ohta, K., Takechi, M., Combined effects of melatonin and FGF-2 on mouse preosteoblast behavior within interconnected porous hydroxyapatite ceramics - in vitro analysis, *Journal of Applied Oral Science*, 24, 153-161, **2016**.
- [59] Nakade, O., Koyama, H., Arijji, H., Yajima, A., Kaku, T., Melatonin stimulates proliferation and type I collagen synthesis in human bone cells in vitro, *Journal of Pineal Research*, 27, 106-110, **1999**.
- [60] Radio, N.M., Doctor, J.S., Witt-Enderby, P.A., Melatonin enhances alkaline phosphatase activity in differentiating human adult mesenchymal stem cells grown in osteogenic medium via MT2 melatonin receptors and the MEK/ERK (1/2) signaling cascade, *Journal of Pineal Research*, 40, 332-342, **2006**.

- [61] Zhang, L., Zhang, J., Ling, Y., Chen, C., Liang, A., Peng, Y., Chang, H., Su, P., Huang, D., Sustained release of melatonin from poly (lactic-co-glycolic acid) (PLGA) microspheres to induce osteogenesis of human mesenchymal stem cells in vitro, *Journal of Pineal Research*, 54, 24-32, **2013**.
- [62] Alibek, K., Mektepbayeva, D., Irving, S., Atinbayeva, N., Mussurova, S., Mussakhan, S., Anticancer effects and uses of melatonin: A review, *Austin Journal of Cancer and Clinical Research*, 2, 1-9, **2015**.
- [63] Jung, B., Ahmad, N., Melatonin in cancer management: progress and promise, *Cancer Research*, 66, 9789-9793, **2006**.
- [64] Hotchkiss, A.K., Nelson, R.J., Melatonin and immune function: hype or hypothesis?, *Critical Reviews in Immunology*, 22, 351-371, **2002**.
- [65] Esquifino, A.I., Pandi-Perumal, S.R., Cardinali, D.P., Circadian organization of the immune response: A role for melatonin, *Clinical and Applied Immunology Reviews*, 4, 423-433, **2004**.
- [66] Palaoğlu, Ö.S., Beşkonaklı, E., Pineal bez ve yaşlanma, *Geriatrici*, 1, 13-18, **1998**.
- [67] Miller, S.C., Pandi-Perumal, S.R., Esquifino, A.I., Cardinali, D.P., Maestroni, G.J., The role of melatonin in immuno-enhancement: potential application in cancer, *International Journal of Experimental Pathology*, 87, 81-87, **2006**.
- [68] Garcia-Maurino, S., Gonzalez-Haba, M.G., Calvo, J.R., Rafii-El-Idrissi, M., Sanchez-Margalet, V., Goberna, R., Guerrero, J.M., Melatonin enhances IL-2, IL-6, and IFN-gamma production by human circulating CD4+ cells: a possible nuclear receptor-mediated mechanism involving T helper type 1 lymphocytes and monocytes, *The Journal of Immunology*, 159, 574-581, **1997**.
- [69] Morrey, K.M., McLachlan, J.A., Serkin, C.D., Bakouche, O., Activation of human monocytes by the pineal hormone melatonin, *The Journal of Immunology*, 153, 2671-2680, **1994**.
- [70] Hill, S.M., Frasch, T., Shulin, X., Lin, Y., Duplessis, T., Lulu, M., Molecular mechanisms of melatonin anticancer effects, *Integrative Cancer Therapies*, 8, 337-346, **2009**.
- [71] Lissoni, P., Barni, S., Ardizzioia, A., Tancini, G., Conti, A., Maestroni, G., A randomized study with the pineal hormone melatonin versus supportive care alone in patients with brain metastases due to solid neoplasms, *Cancer*, 73, 699-701, **1994**.
- [72] Turjanski, A.G., Leonik, F., Estrin, D.A., Rosenstein, R.E., Doctorovich, F., Scavenging of NO by Melatonin, *Journal of the American Chemical Society*, 122, 10468-10469, **2000**.
- [73] Korkmaz, A., Reiter, R.J., Topal, T., Manchester, L.C., Oter, S., Tan, D.X., Melatonin: an established antioxidant worthy of use in clinical trials, *Molecular Medicine*, 15, 43-50, **2009**.
- [74] Bonnefont-Rousselot, D., Collin, F., Melatonin: action as antioxidant and potential applications in human disease and aging, *Toxicology*, 278, 55-67, **2010**.
- [75] Reiter, R.J., Mechanisms of cancer inhibition by melatonin, *Journal of Pineal Research*, 37, 213-214, **2004**.

- [76] Mills, E., Wu, P., Seely, D., Guyatt, G., Melatonin in the treatment of cancer: a systematic review of randomized controlled trials and meta-analysis, *Journal of Pineal Research*, 39, 360-366, **2005**.
- [77] Reiter, R.J., Tan, D.X., Sainz, R.M., Mayo, J.C., Lopez-Burillo, S., Melatonin: reducing the toxicity and increasing the efficacy of drugs, *The Journal of Pharmacy and Pharmacology*, 54, 1299-1321, **2002**.
- [78] Cos, S., Mediavilla, M.D., Fernandez, R., Gonzalez-Lamuno, D., Sanchez-Barcelo, E.J., Does melatonin induce apoptosis in MCF-7 human breast cancer cells in vitro?, *Journal of Pineal Research*, 32, 90-96, **2002**.
- [79] Sanchez-Hidalgo, M., Lee, M., de la Lastra, C.A., Guerrero, J.M., Packham, G., Melatonin inhibits cell proliferation and induces caspase activation and apoptosis in human malignant lymphoid cell lines, *Journal of Pineal Research*, 53, 366-373, **2012**.
- [80] Petranka, J., Baldwin, W., Biermann, J., Jayadev, S., Barrett, J.C., Murphy, E., The oncostatic action of melatonin in an ovarian carcinoma cell line, *Journal of Pineal Research*, 26, 129-136, **1999**.
- [81] Kanishi, Y., Kobayashi, Y., Noda, S., Ishizuka, B., Saito, K., Differential growth inhibitory effect of melatonin on two endometrial cancer cell lines, *Journal of Pineal Research*, 28, 227-233, **2000**.
- [82] Watanabe, M., Kobayashi, Y., Takahashi, N., Kiguchi, K., Ishizuka, B., Expression of melatonin receptor (MT1) and interaction between melatonin and estrogen in endometrial cancer cell line, *Journal of Obstetrics and Gynaecology Research*, 34, 567-573, **2008**.
- [83] Gilad, E., Laufer, M., Matzkin, H., Zisapel, N., Melatonin receptors in PC3 human prostate tumor cells, *Journal of Pineal Research*, 26, 211-220, **1999**.
- [84] Subramanian, P., Mirunalini, S., Dakshayani, K.B., Pandi-Perumal, S.R., Trakht, I., Cardinali, D.P., Prevention by melatonin of hepatocarcinogenesis in rats injected with N-nitrosodiethylamine, *Journal of Pineal Research*, 43, 305-312, **2007**.
- [85] Hansen, J., Light at night, shiftwork, and breast cancer risk, *Journal of The National Cancer Institute*, 93, 1513-1515, **2001**.
- [86] Wilson, S.T., Blask, D.E., Lemus-Wilson, A.M., Melatonin augments the sensitivity of MCF-7 human breast cancer cells to tamoxifen in vitro, *The Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism*, 75, 669-670, **1992**.
- [87] Cabadak, H., Hücre siklusu ve kanser, *Adnan Menderes Üniversitesi Tıp Fakültesi Dergisi*, 9, 51-61, **2008**.
- [88] Pucci, B., Kasten, M., Giordano, A., Cell Cycle and apoptosis, *Neoplasia* 2, 291-299, **2000**.
- [89] Tabbl, A., Ismail, H., The use of flow cytometric DNA ploidy analysis of liver biopsies in liver cirrhosis and hepatocellular carcinoma, *Liver Biopsy*, Chapter 7, 87-108, **2011**.
- [90] Di Bella, G., Mascia, F., Gualano, L., Di Bella, L., Melatonin anticancer effects: review, *International Journal of Molecular Sciences*, 14, 2410-2430, **2013**.
- [91] Liu, L., Xu, Y., Reiter, R.J., Melatonin inhibits the proliferation of human osteosarcoma cell line MG-63, *Bone*, 55, 432-438, **2013**.

- [92] Heare, T., Hensley, M.A., Dell'Orfano, S., Bone tumors: osteosarcoma and Ewing's sarcoma, *Current Opinion in Pediatrics*, 21, 365-372, **2009**.
- [93] Kantar, M., Osteosarkom, *Klinik Gelişim Dergisi*, 20, 120-4, **2007**.
- [94] Mirabello, L., Troisi, R.J., Savage, S.A., International osteosarcoma incidence patterns in children and adolescents, middle ages and elderly persons, *International Journal of Cancer*, 125, 229-234, **2009**.
- [95] Han, X.R., Sun, Y., Bai, X.Z., The anti-tumor role and mechanism of integrated and truncated PDCD5 proteins in osteosarcoma cells, *Cellular Signalling*, 24, 1713-1721, **2012**.
- [96] Panzer, A., Melatonin in osteosarcoma: an effective drug?, *Medical Hypotheses*, 48, 523-525, **1997**.
- [97] Cheng, Y., Cai, L., Jiang, P., Wang, J., Gao, C., Feng, H., Wang, C., Pan, H., Yang, Y., SIRT1 inhibition by melatonin exerts antitumor activity in human osteosarcoma cells, *European Journal of Pharmacology*, 715, 219-229, **2013**.
- [98] Baker, Ş.B., Kontrollü İlaç Salım Hidrojel Sistemleri ve Uygulama Çalışmaları, Yüksek Lisans Tezi, Eskişehir Osmangazi Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü, Eskişehir, **2012**.
- [99] Fonseca, A.C., Ferreira, P., Cordeiro, R.A., Mendonça, P.V., Góis, J.R., Gil, M.H., Coelho, J.F.J. *Drug Delivery Systems for Predictive Medicine: Polymers as Tools for Advanced Applications*. Springer Netherlands; 399-455, **2013**.
- [100] Singhvi, G., Singh, M., Review: in-vitro drug release characterization models, *International Journal of Pharmaceutical Studies and Research*, 2, 77-84, **2011**.
- [101] Shoaib, M.H., Tazeen, J., Merchant, H.A., Yousuf, R.I., Evaluation of drug release kinetics from ibuprofen matrix tablets using HPMC, *Pakistan journal of Pharmaceutical Sciences*, 19, 119-124, **2006**.
- [102] Bozkır, A., Karataş, A., Hasçıçek, C., Canefe, K., Kılıçarslan, M., Tırmıcı, N., Yüksel, N., Gönül, N., Özdemir, N., Baykara, T., Kılıç-Şen, T., Çomoğlu, T., *Farmasötik Teknoloji Deneysel Uygulamalar Kitabı*, Ankara Üniversitesi Eczacılık Fakültesi, **2012**.
- [103] Higuchi, T., Mechanism of sustained-action medication. Theoretical analysis of rate of release of solid drugs dispersed in solid matrices, *Journal of Pharmaceutical Sciences*, 52, 1145-1149, **1963**.
- [104] Hixson, A.W., Crowell, J.H., Dependence of reaction velocity upon surface and agitation, *Industrial & Engineering Chemistry*, 23, 923-931, **1931**.
- [105] Korsmeyer, R.W., Peppas, N.A., Macromolecular and modeling aspects of swelling-controlled systems, *Controlled Release Delivery Systems*, 4, 77-90, **1983**.
- [106] Mohanraj, V.J., Chen, Y., Nanoparticles: A review, *Tropical Journal of Pharmaceutical Research*, 5, 561-573, **2006**.
- [107] Silva, G.A., Coutinho, O.P., Ducheyne, P., Reis, R.L., Materials in particulate form for tissue engineering. 2. Applications in bone, *Journal of Tissue Engineering and Regenerative Medicine*, 1, 97-109, **2007**.

- [108] Nagavarma, B.V.N., Hemant, K.S.Y., Ayaz, A., Vasudha, L.S., Shivakumar, H.G., Different techniques for preparation of polymeric nanoparticles-a review, *Asian Journal of Pharmaceutical and Clinical Research*, 5, 16-23, **2012**.
- [109] Christoforidis, J.B., Chang, S., Jiang, A., Wang, J., Cebulla, C.M., Intravitreal devices for the treatment of vitreous inflammation, *Mediators of Inflammation*, 2012, 1-8, **2012**.
- [110] Kumari, A., Yadav, S.K., Yadav, S.C., Biodegradable polymeric nanoparticles based drug delivery systems, *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*, 75, 1-18, **2010**.
- [111] Lassalle, V., Ferreira, M.L., PLA nano- and microparticles for drug delivery: an overview of the methods of preparation, *Macromolecular Bioscience*, 7, 767-783, **2007**.
- [112] Rao, J.P., Geckeler, K.E., Polymer nanoparticles: Preparation techniques and size-control parameters, *Progress in Polymer Science*, 36, 887-913, **2011**.
- [113] Akagi, T., Baba, M., Akashi, M. *Biodegradable nanoparticles as vaccine adjuvants and delivery systems: Regulation of immune responses by nanoparticle-based vaccine*. Polymers in Nanomedicine. Berlin, Heidelberg: Springer Berlin Heidelberg, 31-64, **2012**.
- [114] Derman, S., Kızılbey, K., Akdeste, Z.M., Polimerik nanopartiküller, *Mühendislik ve Fen Bilimleri Dergisi*, 31, 107-120, **2013**.
- [115] Salata, O., Applications of nanoparticles in biology and medicine, *Journal of Nanobiotechnology*, 2, 1-6, **2004**.
- [116] Gümüşderelioğlu, M., Biyomalzemeler, *Bilim ve Teknik Özel Eki*, 1-23, **2002**.
- [117] Steichen, S.D., Caldorera-Moore, M., Peppas, N.A., A review of current nanoparticle and targeting moieties for the delivery of cancer therapeutics, *European Journal of Pharmaceutical Sciences*, 48, 416-427, **2013**.
- [118] Mody, V.V., Cox, A., Shah, S., Singh, A., Bevins, W., Parihar, H., Magnetic nanoparticle drug delivery systems for targeting tumor, *Applied Nanoscience*, 4, 385-392, **2014**.
- [119] Mohanty, C., Das, M., Kanwar, J.R., Sahoo, S.K., Receptor mediated tumor targeting: an emerging approach for cancer therapy, *Current Drug Delivery*, 8, 45-58, **2011**.
- [120] Misiuk, W., Zalewska, M., Investigation of inclusion complex of trazodone hydrochloride with hydroxypropyl- β -cyclodextrin, *Carbohydrate Polymers*, 77, 482-488, **2009**.
- [121] Singh, R., Bharti, N., Madan, J., Hiremath, S.N., Characterization of cyclodextrin inclusion complexes-a review, *Journal of Pharmaceutical Science and Technology*, 2, 171-183, **2010**.
- [122] Zhou, J., Ritter, H., Cyclodextrin functionalized polymers as drug delivery systems, *Polymer Chemistry*, 1, 1552-1559, **2010**.
- [123] Astray, G., Gonzalez-Barreiro, C., Mejuto, J.C., Rial-Otero, R., Simal-Gándara, J., A review on the use of cyclodextrins in foods, *Food Hydrocolloids*, 23, 1631-1640, **2009**.

- [124] Del Valle, E.M.M., Cyclodextrins and their uses: a review, *Process Biochemistry*, 39, 1033-1046, **2004**.
- [125] Granero, G.E., Maitre, M.M., Garnero, C., Longhi, M.R., Synthesis, characterization and in vitro release studies of a new acetazolamide-HP- β -CD-TEA inclusion complex, *European Journal of Medicinal Chemistry*, 43, 464-470, **2008**.
- [126] Saha, S., Ray, T., Basak, S., Roy, M.N., NMR, surface tension and conductivity studies to determine the inclusion mechanism: thermodynamics of host-guest inclusion complexes of natural amino acids in aqueous cyclodextrins, *New Journal of Chemistry*, 40, 651-661, **2016**.
- [127] Sambasevam, K.P., Mohamad, S., Sarih, N.M., Ismail, N.A., Synthesis and Characterization of the Inclusion Complex of beta-cyclodextrin and Azomethine, *International Journal of Molecular Sciences*, 14, 3671-3682, **2013**.
- [128] Bongiorno, D., Ceraulo, L., Ferrugia, M., Filizzola, F., Ruggirello, A., Liveri, V.T., Inclusion complexes of cyclomaltooligosaccharides (cyclodextrins) with melatonin in solid phase, *Archive for Organic Chemistry*, 2005, 118-130, **2005**.
- [129] Babu, R.J., Dayal, P., Singh, M., Effect of cyclodextrins on the complexation and nasal permeation of melatonin, *Drug Delivery*, 15, 381-388, **2008**.
- [130] Maeda, H., Ogawa, Y., Nakayama, H., Inclusion complexes of melatonin with modified cyclodextrins, *Journal of Inclusion Phenomena and Macrocyclic Chemistry*, 78, 217-224, **2014**.
- [131] Peng, P., She, D., Isolation, structural characterization, and potential applications of hemicelluloses from bamboo: A review, *Carbohydrate Polymers*, 112, 701-720, **2014**.
- [132] Zhao, D., Liao, K., Ma, X., Yan, X., Study of the Supramolecular Inclusion of β -Cyclodextrin with Andrographolide, *Journal of Inclusion Phenomena and Macrocyclic Chemistry*, 43, 259-264, **2002**.
- [133] Topal, B., Cetin Altindal, D., Gumusderelioglu, M., Melatonin/HPbetaCD complex: Microwave synthesis, integration with chitosan scaffolds and inhibitory effects on MG-63CELLS, *International Journal of Pharmaceutics*, 496, 801-811, **2015**.
- [134] Hu, X., Shmelev, K., Sun, L., Gil, E.S., Park, S.H., Cebe, P., Kaplan, D.L., Regulation of silk material structure by temperature-controlled water vapor annealing, *Biomacromolecules*, 12, 1686-1696, **2011**.
- [135] Uhrich, K.E., Cannizzaro, S.M., Langer, R.S., Shakesheff, K.M., Polymeric Systems for Controlled Drug Release, *Chemical Reviews*, 99, 3181-3198, **1999**.
- [136] Hoffmeister, C.R., Durli, T.L., Schaffazick, S.R., Raffin, R.P., Bender, E.A., Beck, R.C., Pohlmann, A.R., Guterres, S.S., Hydrogels containing redispersible spray-dried melatonin-loaded nanocapsules: a formulation for transdermal-controlled delivery, *Nanoscale Research Letters*, 7, 251-264, **2012**.
- [137] Danhier, F., Ansorena, E., Silva, J.M., Coco, R., Le Breton, A., Preat, V., PLGA-based nanoparticles: an overview of biomedical applications, *Journal of Controlled Release*, 161, 505-522, **2012**.

- [138] Makadia, H.K., Siegel, S.J., Poly lactic-co-glycolic acid (PLGA) as biodegradable controlled drug delivery carrier, *Polymers*, 3, 1377-1397, **2011**.
- [139] Çetin Altındal, D., Gumusderelioglu, M., Melatonin releasing PLGA micro/nanoparticles and their effect on osteosarcoma cells, *Journal of Microencapsulation*, 33, 53-63, **2016**.
- [140] Anarjan, N., Jafarizadeh-Malmiri, H., Nehdi, I.A., Sbihi, H.M., Al-Resayes, S.I., Tan, C.P., Effects of homogenization process parameters on physicochemical properties of astaxanthin nanodispersions prepared using a solvent-diffusion technique, *International Journal of Nanomedicine*, 10, 1109-1118, **2015**.
- [141] Lee, S.-J., Jeong, J.-R., Shin, S.-C., Kim, J.-C., Chang, Y.-H., Chang, Y.-M., Kim, J.-D., Nanoparticles of magnetic ferric oxides encapsulated with poly(D,L lactide-co-glycolide) and their applications to magnetic resonance imaging contrast agent, *Journal of Magnetism and Magnetic Materials*, 272–276, 2432-2433, **2004**.
- [142] Kwon, H.-Y., Lee, J.-Y., Choi, S.-W., Jang, Y., Kim, J.-H., Preparation of PLGA nanoparticles containing estrogen by emulsification–diffusion method, *Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects*, 182, 123-130, **2001**.
- [143] Sahana, D.K., Mittal, G., Bhardwaj, V., Kumar, M.N., PLGA nanoparticles for oral delivery of hydrophobic drugs: influence of organic solvent on nanoparticle formation and release behavior in vitro and in vivo using estradiol as a model drug, *Journal of Pharmaceutical Sciences*, 97, 1530-1542, **2008**.
- [144] Tan, D.X., Hardeland, R., Manchester, L.C., Korkmaz, A., Ma, S., Rosales-Corral, S., Reiter, R.J., Functional roles of melatonin in plants, and perspectives in nutritional and agricultural science, *Journal of Experimental Botany*, 63, 577-597, **2012**.
- [145] Musumeci, T., Bucolo, C., Carbone, C., Pignatello, R., Drago, F., Puglisi, G., Polymeric nanoparticles augment the ocular hypotensive effect of melatonin in rabbits, *International Journal of Pharmaceutics*, 440, 135-140, **2013**.
- [146] Mittal, G., Sahana, D.K., Bhardwaj, V., Ravi Kumar, M.N.V., Estradiol loaded PLGA nanoparticles for oral administration: Effect of polymer molecular weight and copolymer composition on release behavior in vitro and in vivo, *Journal of Controlled Release*, 119, 77-85, **2007**.
- [147] Cooper, D.L., Harirforoosh, S., Design and optimization of PLGA-based diclofenac loaded nanoparticles, *Plos One*, 9, e87326-e87335, **2014**.
- [148] Marques, D.R., Santos, L.A., Schopf, L.F., Fraga, J., Analysis of poly(lactic-co-glycolic acid)/poly(isoprene) polymeric blend for application as biomaterial, *Polimeros*, 23, 579-584, **2013**.
- [149] Testereci, H.N., Akın-Öktem, G., Öktem, Z., Electrochemical polymerization of 4-allyl-1,2-dimethoxybenzene, *Reactive and Functional Polymers*, 61, 183-189, **2004**.
- [150] Mansur, H.S., Sadahira, C.M., Souza, A.N., Mansur, A.A.P., FTIR spectroscopy characterization of poly (vinyl alcohol) hydrogel with different hydrolysis degree and chemically crosslinked with glutaraldehyde, *Materials Science and Engineering: C*, 28, 539-548, **2008**.

- [151] Budhian, A., Siegel, S.J., Winey, K.I., Controlling the in vitro release profiles for a system of haloperidol-loaded PLGA nanoparticles, *International Journal of Pharmaceutics*, 346, 151-159, **2008**.
- [152] Avgoustakis, K., Beletsi, A., Panagi, Z., Klepetsanis, P., Karydas, A.G., Ithakissios, D.S., PLGA-mPEG nanoparticles of cisplatin: in vitro nanoparticle degradation, in vitro drug release and in vivo drug residence in blood properties, *Journal of Controlled Release*, 79, 123-135, **2002**.
- [153] Ruan, G., Feng, S.S., Preparation and characterization of poly(lactic acid)-poly(ethylene glycol)-poly(lactic acid) (PLA-PEG-PLA) microspheres for controlled release of paclitaxel, *Biomaterials*, 24, 5037-5044, **2003**.
- [154] Hua, X., Tan, S., Bandara, H.M.H.N., Fu, Y., Liu, S., Smyth, H.D.C., Externally controlled triggered-release of drug from PLGA micro and nanoparticles, *Plos One*, 9, 1-17, **2014**.
- [155] Ardakani, J.V., Walker, J., Qujeq, D., Serum factors induced the nuclear location of annexin V in the human osteosarcoma cell line (MG-63), *Iranian Biomedical Journal*, 4, 117-122, **2000**.
- [156] Billiau, A., Edy, V.G., Heremans, H., Van Damme, J., Desmyter, J., Georgiades, J.A., De Somer, P., Human interferon: mass production in a newly established cell line, MG-63, *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 12, 11-15, **1977**.
- [157] Aday, S., *Biyomimetik Apatit Kaplı ve Heparin Fonksiyonaliyesine Sahip Kitosan Doku İskelelerinde Kondrosit ve Osteoblast Aktivitelerinin İncelenmesi*, Yüksek Lisans Tezi, Hacettepe Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü, Ankara, **2008**.
- [158] Liu, L., Zhu, Y., Xu, Y., Reiter, R.J., Melatonin delays cell proliferation by inducing G1 and G2 /M phase arrest in a human osteoblastic cell line hFOB 1.19, *Journal of Pineal Research*, 50, 222-231, **2011**.
- [159] De Jong, W.H., Borm, P.J.A., Drug delivery and nanoparticles: Applications and hazards, *International Journal of Nanomedicine*, 3, 133-149, **2008**.
- [160] Kreuter, J., Range, P., Petrov, V., Hamm, S., Gelperina, S.E., Engelhardt, B., Alyautdin, R., von Briesen, H., Begley, D.J., Direct evidence that polysorbate-80-coated poly(butylcyanoacrylate) nanoparticles deliver drugs to the CNS via specific mechanisms requiring prior binding of drug to the nanoparticles, *Pharmaceutical Research*, 20, 409-416, **2003**.
- [161] Olivier, J.C., Fenart, L., Chauvet, R., Pariat, C., Cecchelli, R., Couet, W., Indirect evidence that drug brain targeting using polysorbate 80-coated polybutylcyanoacrylate nanoparticles is related to toxicity, *Pharmaceutical Research*, 16, 1836-1842, **1999**.
- [162] Zhao, W., Lu, X., Yuan, Y., Liu, C., Yang, B., Hong, H., Wang, G., Zeng, F., Effect of size and processing method on the cytotoxicity of realgar nanoparticles in cancer cell lines, *International Journal of Nanomedicine*, 6, 1569-1577, **2011**.
- [163] Dam, D.H., Lee, J.H., Sisco, P.N., Co, D.T., Zhang, M., Wasielewski, M.R., Odom, T.W., Direct observation of nanoparticle-cancer cell nucleus interactions, *ACS Nano*, 6, 3318-3326, **2012**.
- [164] Chitkara, D., Kumar, N., BSA-PLGA-based core-shell nanoparticles as carrier system for water-soluble drugs, *Pharmaceutical Research*, 30, 2396-2409, **2013**.

- [165] Tigli, R.S., Karakecili, A., Gumusderelioglu, M., In vitro characterization of chitosan scaffolds: influence of composition and deacetylation degree, *Journal of Materials Science: Materials in Medicine*, 18, 1665-1674, **2007**.
- [166] He, Q., Ao, Q., Gong, Y., Zhang, X., Preparation of chitosan films using different neutralizing solutions to improve endothelial cell compatibility, *Journal of Materials Science: Materials in Medicine*, 22, 2791-2802, **2011**.
- [167] Choi, J.S., Kim, Y., Kang, J., Jeong, S.Y., Yoo, H.S., Electrospun chitosan microspheres for complete encapsulation of anionic proteins: controlling particle size and encapsulation efficiency, *AAPS PharmSciTech*, 14, 794-801, **2013**.
- [168] Bhat, A.H., Bhat, I., Abdul Khalil, H.P.S., Development and material properties of chitosan and phosphomolybdic acid-based composites, *Journal of Composite Materials*, 45, 39-49, **2011**.
- [169] Pawlak, A., Mucha, M., Thermogravimetric and FTIR studies of chitosan blends, *Thermochimica Acta*, 396, 153-166, **2003**.
- [170] Zakaria, Z., Izzah, Z., Jawaid, M., Hassan, A., Effect of degree of deacetylation of chitosan on thermal stability and compatibility of chitosan-polyamide blend, *BioResources*, 7, 5568-5580, **2012**.
- [171] Noriega, S.E., Subramanian, A., Consequences of neutralization on the proliferation and cytoskeletal organization of chondrocytes on chitosan-based matrices, *International Journal of Carbohydrate Chemistry*, 2011, 1-13, **2011**.
- [172] Wang, F., Li, M.-S., Lu, Y.-P., Qi, Y.-X., Liu, Y.-X., Synthesis and microstructure of hydroxyapatite nanofibers synthesized at 37 °C, *Materials Chemistry and Physics*, 95, 145-149, **2006**.
- [173] O'Brien, F.J., Biomaterials & scaffolds for tissue engineering, *Materials Today*, 14, 88-95, **2011**.
- [174] Peniche, C., Argüelles-Monal, W., Davidenko, N., Sastre, R., Gallardo, A., San Román, J., Self-curing membranes of chitosan/PAA IPNs obtained by radical polymerization: preparation, characterization and interpolymer complexation, *Biomaterials*, 20, 1869-1878, **1999**.
- [175] Sun, H., Mou, J., Tang, Y., Zhang, F., Wu, G., Hydroxyapatite coating on a polyamide implant, *Journal of Materials Science Letters*, 21, 901-902, **2002**.
- [176] Loh, Q.L., Choong, C., Three-dimensional scaffolds for tissue engineering applications: Role of porosity and pore size, *Tissue Engineering Part B, Reviews*, 19, 485-502, **2013**.
- [177] Calvo-Guirado, J.L., Perez-Albacete, C., Perez-Sanchez, C., Boquete-Castro, A., Mate-Sanchez De Val, J.E., Delgado Pena, J.E., Ramirez Fernandez, M.P., Garces, M., Meseguer-Olmo, L., Gomez-Moreno, G., Effects of melatonin on adult human mesenchymal stem cells in osteoblastic differentiation. An experimental in vitro study, *Journal of Osseointegration*, 7, 23-32, **2015**.
- [178] Zwirska-Korczala, K., Jochem, J., Adamczyk-Sowa, M., Sowa, P., Polaniak, R., Birkner, E., Latocha, M., Pilc, K., Suchanek, R., Influence of melatonin on cell proliferation, antioxidative enzyme activities and lipid peroxidation in 3T3-L1 preadipocytes--an in vitro study, *Journal of physiology and pharmacology : an official journal of the Polish Physiological Society*, 56 Suppl 6, 91-99, **2005**.

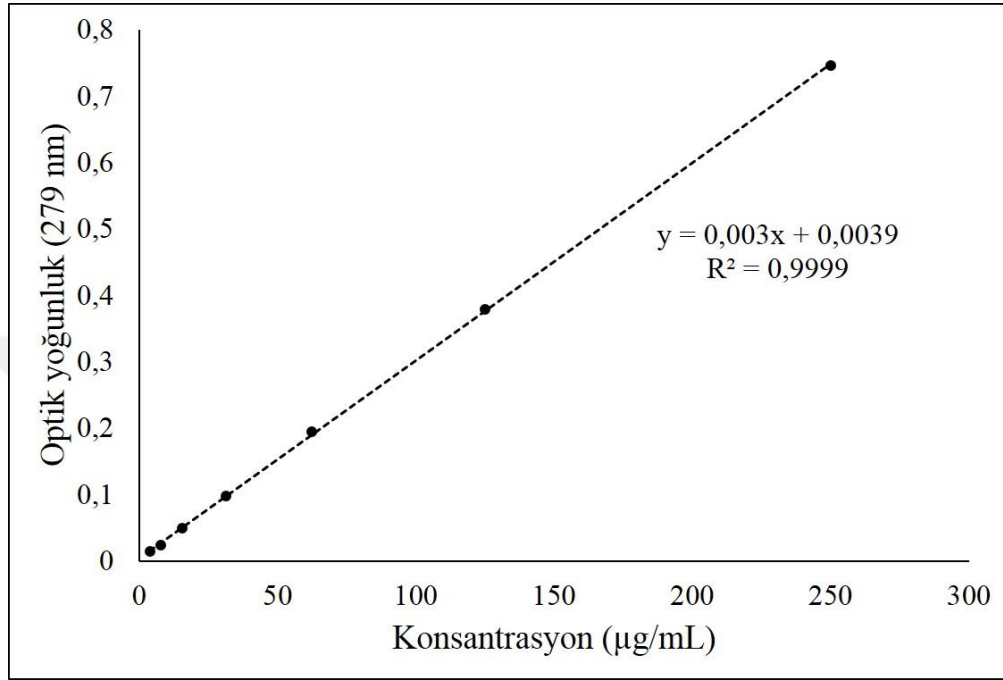
- [179] Dhandayuthapani, B., Yoshida, Y., Maekawa, T., Kumar, S., Polymeric Scaffolds in Tissue Engineering Application: A Review, *International Journal of Polymer Science*, 1-19, **2011**.
- [180] Wu, J., Hong, Y., Enhancing cell infiltration of electrospun fibrous scaffolds in tissue regeneration, *Bioactive Materials*, 1, 56-64, **2016**.
- [181] Manjubala, I., Woesz, A., Pilz, C., Rumpler, M., Fratzl-Zelman, N., Roschger, P., Stampfl, J., Fratzl, P., Biomimetic mineral-organic composite scaffolds with controlled internal architecture, *Journal of Materials Science: Materials in Medicine*, 16, 1111-1119, **2005**.
- [182] zur Nieden, N.I., Kempka, G., Ahr, H.J., In vitro differentiation of embryonic stem cells into mineralized osteoblasts, *Differentiation; Research in Biological Diversity*, 71, 18-27, **2003**.
- [183] Sila-Asna, M., Bunyaratvej, A., Maeda, S., Kitaguchi, H., Bunyaratavej, N., Osteoblast differentiation and bone formation gene expression in strontium-inducing bone marrow mesenchymal stem cell, *The Kobe Journal of Medical Sciences*, 53, 25-35, **2007**.
- [184] Stein, G.S., Lian, J.B., Molecular mechanisms mediating proliferation/differentiation interrelationships during progressive development of the osteoblast phenotype, *Endocrine Reviews*, 14, 424-442, **1993**.
- [185] Komori, T., Regulation of osteoblast differentiation by Runx2, *Advances in Experimental Medicine and Biology*, 658, 43-49, **2010**.
- [186] Komori, T., Yagi, H., Nomura, S., Yamaguchi, A., Sasaki, K., Deguchi, K., Shimizu, Y., Bronson, R.T., Gao, Y.H., Inada, M., Sato, M., Okamoto, R., Kitamura, Y., Yoshiki, S., Kishimoto, T., Targeted disruption of *Cbfa1* results in a complete lack of bone formation owing to maturational arrest of osteoblasts, *Cell*, 89, 755-764, **1997**.
- [187] Nakashima, K., Zhou, X., Kunkel, G., Zhang, Z., Deng, J.M., Behringer, R.R., de Crombrughe, B., The novel zinc finger-containing transcription factor osterix is required for osteoblast differentiation and bone formation, *Cell*, 108, 17-29, **2002**.
- [188] Hass, R., Kasper, C., Bohm, S., Jacobs, R., Different populations and sources of human mesenchymal stem cells (MSC): A comparison of adult and neonatal tissue-derived MSC, *Cell Communication and Signaling*, 9, 9-12, **2011**.
- [189] Hermann, A., Gastl, R., Liebau, S., Popa, M.O., Fiedler, J., Boehm, B.O., Maisel, M., Lerche, H., Schwarz, J., Brenner, R., Storch, A., Efficient generation of neural stem cell-like cells from adult human bone marrow stromal cells, *Journal of Cell Science*, 117, 4411-4422, **2004**.
- [190] Cheng, N.C., Wang, S., Young, T.H., The influence of spheroid formation of human adipose-derived stem cells on chitosan films on stemness and differentiation capabilities, *Biomaterials*, 33, 1748-1758, **2012**.
- [191] Yeh, H.Y., Liu, B.H., Sieber, M., Hsu, S.H., Substrate-dependent gene regulation of self-assembled human MSC spheroids on chitosan membranes, *BMC Genomics*, 15, 1-14, **2014**.
- [192] Corciova, A., Cioroiu, B., Mircea, C., Tuchilus, C., Ciobanu, C., Dimitriu, C., Ivanescu, B., Influence of hydroxypropyl-beta-cyclodextrin on the

- physicochemical and biological characteristics of a flavone with important pharmacological properties, *Environmental Engineering and Management Journal*, 14, 311-319, **2015**.
- [193] George, S.J., Vasudevan, D.T., Studies on the preparation, characterization, and solubility of 2-HP- β -cyclodextrin-mecizine HCl inclusion complexes, *Journal of Young Pharmacists*, 4, 220-227, **2012**.
 - [194] Altman, G.H., Diaz, F., Jakuba, C., Calabro, T., Horan, R.L., Chen, J., Lu, H., Richmond, J., Kaplan, D.L., Silk-based biomaterials, *Biomaterials*, 24, 401-416, **2003**.
 - [195] Kim, U.-J., Park, J., Joo Kim, H., Wada, M., Kaplan, D.L., Three-dimensional aqueous-derived biomaterial scaffolds from silk fibroin, *Biomaterials*, 26, 2775-2785, **2005**.
 - [196] Rockwood, D.N., Preda, R.C., Yucel, T., Wang, X., Lovett, M.L., Kaplan, D.L., Materials fabrication from Bombyx mori silk fibroin, *Nature Protocols*, 6, 1612-1631, **2011**.
 - [197] Arai, T., Freddi, G., Innocenti, R., Tsukada, M., Biodegradation of Bombyx mori silk fibroin fibers and films, *Journal of Applied Polymer Science*, 91, 2383-2390, **2004**.
 - [198] Lawrence, B.D., Cronin-Golomb, M., Georgakoudi, I., Kaplan, D.L., Omenetto, F.G., Bioactive silk protein biomaterial systems for optical devices, *Biomacromolecules*, 9, 1214-1220, **2008**.
 - [199] Panilaitis, B., Altman, G.H., Chen, J., Jin, H.J., Karageorgiou, V., Kaplan, D.L., Macrophage responses to silk, *Biomaterials*, 24, 3079-3085, **2003**.
 - [200] Vepari, C., Kaplan, D.L., Silk as a Biomaterial, *Progress in Polymer Science*, 32, 991-1007, **2007**.
 - [201] Hofmann, S., Wong Po Foo, C.T., Rossetti, F., Textor, M., Vunjak-Novakovic, G., Kaplan, D.L., Merkle, H.P., Meinel, L., Silk fibroin as an organic polymer for controlled drug delivery, *Journal of Controlled Release*, 111, 219-227, **2006**.
 - [202] Lawrence, B.D., Marchant, J.K., Pindrus, M.A., Omenetto, F.G., Kaplan, D.L., Silk film biomaterials for cornea tissue engineering, *Biomaterials*, 30, 1299-1308, **2009**.
 - [203] Sofia, S., McCarthy, M.B., Gronowicz, G., Kaplan, D.L., Functionalized silk-based biomaterials for bone formation, *Journal of Biomedical Materials Research*, 54, 139-148, **2001**.
 - [204] Karageorgiou, V., Meinel, L., Hofmann, S., Malhotra, A., Volloch, V., Kaplan, D., Bone morphogenetic protein-2 decorated silk fibroin films induce osteogenic differentiation of human bone marrow stromal cells, *Journal of Biomedical Materials Research Part A*, 71, 528-537, **2004**.
 - [205] Zhang, L., Su, P., Xu, C., Chen, C., Liang, A., Du, K., Peng, Y., Huang, D., Melatonin inhibits adipogenesis and enhances osteogenesis of human mesenchymal stem cells by suppressing PPAR γ expression and enhancing Runx2 expression, *Journal of Pineal Research*, 49, 364-372, **2010**.
 - [206] Alhadlaq, A., Mao, J.J., Mesenchymal stem cells: isolation and therapeutics, *Stem Cells and Development*, 13, 436-448, **2004**.

- [207] Yourek, G., Hussain, M.A., Mao, J.J., Cytoskeletal changes of mesenchymal stem cells during differentiation, *ASAIIO journal (American Society for Artificial Internal Organs)*, 53, 219-228, **2007**.
- [208] Sethi, S., Radio, N.M., Kotlarczyk, M.P., Chen, C.T., Wei, Y.H., Jockers, R., Witt-Enderby, P.A., Determination of the minimal melatonin exposure required to induce osteoblast differentiation from human mesenchymal stem cells and these effects on downstream signaling pathways, *Journal of Pineal Research*, 49, 222-238, **2010**.
- [209] Jonason, J.H., Xiao, G., Zhang, M., Xing, L., Chen, D., Post-translational regulation of runx2 in bone and cartilage, *Journal of Dental Research*, 88, 693-703, **2009**.
- [210] Cao, T., Heng, B.C., Ye, C.P., Liu, H., Toh, W.S., Robson, P., Li, P., Hong, Y.H., Stanton, L.W., Osteogenic differentiation within intact human embryoid bodies result in a marked increase in osteocalcin secretion after 12 days of in vitro culture, and formation of morphologically distinct nodule-like structures, *Tissue & Cell*, 37, 325-334, **2005**.

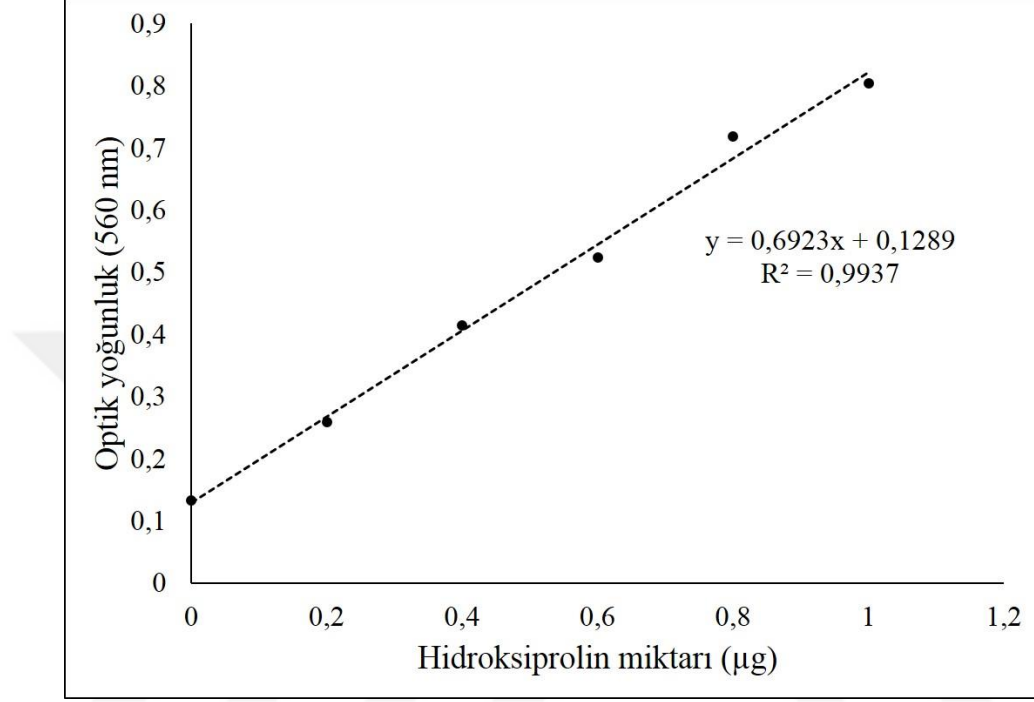
EK 1

MELATONİNİN *İN VİTRO* SALIMINDA KULLANILAN KALİBRASYON GRAFİĞİ



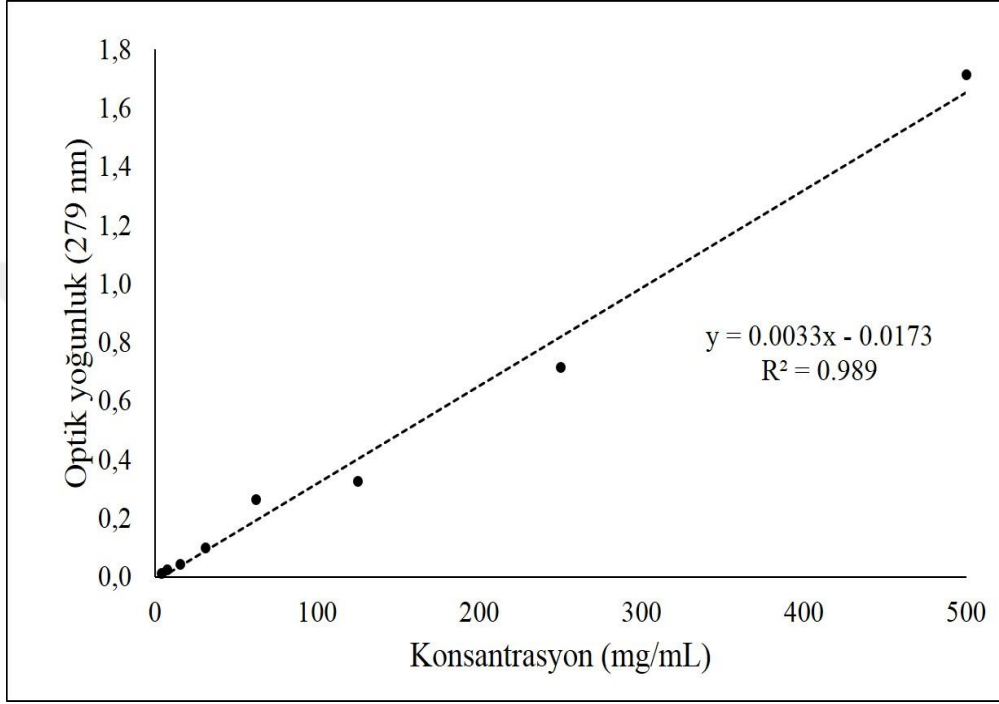
EK 2

KOLLAJEN ANALİZİNDE KULLANILAN HİDROKSİPİROLİN KALİBRASYON GRAFİĞİ



EK 3

MELATONİN/HPβCD İNKLÜZYON KOMPLEKSİNİN VERİM HESABINDA KULLANILAN KALİBRASYON GRAFİĞİ



ÖZGEÇMİŞ

Kimlik Bilgileri

Adı Soyadı : Damla Çetin Altındal
Doğum Yeri : Ankara
Medeni Hali : Evli
E-posta : damlacetin@hacettepe.edu.tr
Adresi : Hacettepe Üniversitesi, Kimya Mühendisliği Bölümü, Ankara

Eğitim

Lise : Ankara Atatürk Anadolu Lisesi (2004)
Lisans : Hacettepe Üniversitesi, Kimya Mühendisliği Bölümü (2008)
(Mühendislik Fakültesi Birinciliği)
Yüksek Lisans : Hacettepe Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Kimya
Mühendisliği Anabilim Dalı (2010)
Doktora : Hacettepe Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Kimya
Mühendisliği Anabilim Dalı (2017)

Yabancı Dil ve Düzeyi

İngilizce (ileri), Almanca (başlangıç)

İş Deneyimi

Davetli Araştırmacı – Tufts Üniversitesi, Biyomedikal Mühendisliği Bölümü, Medford, MA, ABD (Haziran 2016 – Aralık 2016)

Araştırma Görevlisi - Hacettepe Üniversitesi, Kimyasal Teknolojiler Ana Bilim Dalı, Ankara, Türkiye (Şubat 2009 – halen)

Deneyim Alanları

- Doku mühendisliği uygulamaları için süpergözenekli hidrojel sentezi
- Karıştırmalı biyoreaktörlerde osteoblastik farklılaşmanın incelenmesi
- Kontrollü salım sistemlerinin tasarımı ve kemik doku mühendisliğinde kullanımı
- Melatoninin kemik farklılaşması ve kanseri üzerindeki etkilerinin incelenmesi

Tezden Üretilmiş Projeler ve Bütçesi

- Hacettepe Üniversitesi Kapsamlı Araştırma Projesi, Proje Kodu: FBA-2015-5315, Melatoninin Osteoindüktif ve Antikanserojenik Etkilerinin Kemik Doku Mühendisliği Açısından Değerlendirilmesi: *İn Vitro* Çalışmalar – 168,640 TL.
- Hacettepe Üniversitesi Bilimsel Başarı Projesi, Proje Kodu: FBB-2015-5436, Melatoninin PLGA Mikro/nanopartiküllerden Salım Kinetiği ve Osteosarkoma Hücreleri Üzerindeki Etkisi-3,180 TL.

Tezden Üretilmiş Yayınlar

- **Çetin Altındal, D.**, Gümüşderelioğlu, M., 2016, Melatonin releasing PLGA micro/nanoparticles and their effect on osteosarcoma cells, *Journal of Microencapsulation*, 33, 1, 53-63.
- Topal, B., **Çetin Altındal, D.**, Gümüşderelioğlu, M., 2015, Melatonin/HP β CD complex: Microwave synthesis, integration with chitosan scaffolds and inhibitory effects on MG-63 cells, *International Journal of Pharmaceutics*, 496, 2, 801-811.
- Gümüşderelioğlu, M., **Çetin Altındal, D.**, Melatonin: Drakula Hormonu, *TÜBİTAK Bilim ve Teknik Dergisi*, 24-27, Eylül 2014.

Diğer Yayınlar

- **Çetin, D.**, Kahraman, A.S., Gümüşderelioğlu, M., 2011, Novel scaffolds based on poly(2-hydroxyethyl methacrylate) superporous hydrogels for bone tissue engineering, *Journal of Biomaterials Science: Polymer Edition*, 22, 1157-1178.
- **Çetin, D.**, Kahraman, A.S., Gümüşderelioğlu, M., 2012, Novel pHEMA-gelatin SPHs as bone scaffolds in dynamic cultures, *Journal of Materials Science: Materials in Medicine*, 23, 2803-2812.
- Irmak, G., Demirtaş, T.T., **Çetin Altındal, D.**, Çalış, M., Gümüşderelioğlu, M., 2014, Sustained release of 17 β -estradiol stimulates osteogenic differentiation of AdMSCs on chitosan-hydroxyapatite scaffolds, *Cells Tissues Organs*, 199(1), 37-50.
- Gümüşderelioğlu, M., Karakuş, E., Çapkın Yurtsever, M., **Çetin Altındal, D.**, 2015, Inosculation potential of angiopoietin-4-immobilized pHEMA-based bone scaffolds, *Journal of Bioactive and Compatible Polymers*, 30(6), 649-666.

Tezden Üretilmiş Tebliğ ve/veya Poster Sunumu ile Katıldığı Toplantılar

- **Cetin Altındal, D.**, Gümüşderelioğlu, M., Release kinetics of melatonin from PLGA micro/nanoparticles and the effect of melatonin on osteosarcoma cells, 3rd Belgian Symposium on Tissue Engineering, 19-20 Mart 2015, Leuven, BELÇİKA (Poster sunumu).

Diğer Sunumlar

- **Cetin D.**, Tıgılı, R.S., Gümüşderelioğlu, M., "Superporous Poly(2-hydroxyethyl methacrylate)-Based Scaffolds For Bone Regeneration", 15th International Biomedical Science and Technology Symposium, Güzelyurt, Kıbrıs, 16-19 Ağustos 2009 (Poster sunumu).
- **Cetin, D.**, Kahraman, A.S., Gümüşderelioğlu, M., "Bone Tissue Engineering With Superporous pHEMA-Based Scaffolds In Stationary Cultures and Spinner Flasks" 24th European Conference on Biomaterials, Dublin, İrlanda, 4-8 Eylül 2011 (Poster sunumu).
- **Karakuş, E.**, Çapkin, M., **Çetin, D.**, Gümüşderelioğlu, M., "Vascularization Potential of VEGF and/or Angiopoietin Immobilized PHEMA-Gelatin Scaffold", 17th International Symposium on Biomedical Science and Technology, Ankara, Türkiye, 23-25 Kasım 2011 (Poster sunumu).
- **İrmak, G.**, **Çetin, D.**, Demirtaş, T.T., Gümüşderelioğlu, M., "β-Estradiol Yüklü PLGA Nanoküreler: Sentez, Karakterizasyon ve İn Vitro Salım Kinetiği", 10. Ulusal Kimya Mühendisliği Kongresi, İstanbul, Türkiye, 3-6 Eylül 2012 (Poster sunumu).
- Türkylmaz, P., **Cetin Altındal, D.**, Gümüşderelioğlu, M., "Poly(HEMA)-Based SPHs For Protein Delivery", 25th European Conference on Biomaterials, Madrid, İspanya, 8-12 Eylül 2013 (Poster sunumu).
- **İrmak, G.**, Demirtaş, T.T., **Çetin Altındal, D.**, Çalış, M., Gümüşderelioğlu, M., "Osteogenic Differentiation of AdMSCs on 17β-Estradiol Releasing Chitosan-Hydroxiapatite Scaffolds, 26th European Conference on Biomaterials, Liverpool, İngiltere, 31 Ağustos-3 Eylül 2014 (Poster sunumu).
- **Topal, B.**, **Çetin Altındal, D.**, Gümüşderelioğlu, M., Investigation of Melatonin- β Cyclodextrin Inclusion Complexes in Bone Tissue Engineering, 4th International Conference on Tissue Science & Regenerative Medicine, Roma, İtalya, 27-29 Temmuz 2015 (Poster sunumu).



HACETTEPE ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ
YÜKSEK LİSANS/DOKTORA TEZ ÇALIŞMASI ORJİNALLİK RAPORU

HACETTEPE ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLER ENSTİTÜSÜ
KİMYA MÜHENDİSLİĞİ ANABİLİM DALI BAŞKANLIĞI'NA

Tarih: 10/03/2017

Tez Başlığı / Konusu: KEMİK DOKU MÜHENDİSLİĞİ YAKLAŞIMINDA MELATONİNİN ROLÜ: *İN VİTRO* ÇALIŞMALAR

Yukarıda başlığı/konusu gösterilen tez çalışmamın a) Kapak sayfası, b) Giriş, c) Ana bölümler d) Sonuç kısımlarından oluşan toplam 178 sayfalık kısmına ilişkin, 10/03/2017 tarihinde şahsım/tez danışmanım tarafından *Turnitin* adlı intihal tespit programından aşağıda belirtilen filtrelemeler uygulanarak alınmış olan orijinallik raporuna göre, tezimin benzerlik oranı %9'dur.

Uygulanan filtrelemeler:

- 1- Kaynakça hariç
- 2- Alıntılar hariç/dâhil
- 3- 5 kelimedenden daha az örtüşme içeren metin kısımları hariç

Hacettepe Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Tez Çalışması Orijinallik Raporu Alınması ve Kullanılması Uygulama Esasları'nı inceledim ve bu Uygulama Esasları'nda belirtilen azami benzerlik oranlarına göre tez çalışmamın herhangi bir intihal içermediğini; aksinin tespit edileceği muhtemel durumda doğabilecek her türlü hukuki sorumluluğu kabul ettiğimi ve yukarıda vermiş olduğum bilgilerin doğru olduğunu beyan ederim.

Gereğini saygılarımla arz ederim.

Tarih ve İmza

Adı Soyadı: Damla ÇETİN ALTINDAL
Öğrenci No: N10142605
Anabilim Dalı: Kimya Mühendisliği
Programı: Doktora
Statüsü: ☐ Y.Lisans ☒ Doktora ☐ Bütünleşik Dr.

10/03/2017

DANIŞMAN ONAYI

UYGUNDUR.

Prof. Dr. Menemşe Gümüçderelioglu

(Unvan, Ad Soyad, İmza)