

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

**BİYOPOLİMER VE BİYOSERAMİK KOMPOZİTLERİN HAZIRLANIŞI,
KARAKTERİZASYONU VE IN VİVO DEĞERLENDİRİLMESİ**

(DOKTORA TEZİ)

DERYA ALGÜL KURÇEREN

**DANIŞMAN
PROF. DR. FATMA GÜLGÜN YENER**

**FARMASÖTİK TEKNOLOJİ ANABİLİM DALI
FARMASÖTİK TEKNOLOJİ PROGRAMI**

İSTANBUL-2015

TEZ ONAYI

İstanbul Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü Farmasötik Teknoloji Anabilim Dalı Farmasötik Teknoloji Programında Derya Algül Kurçeren tarafından hazırlanan Biyopolimer ve Biyoseramikler Kompozitlerin Hazırlanışı, Karakterizasyonu ve In vivo Değerlendirilmesi başlıklı Doktora tezi, yapılan tez sınavında Jürimiz tarafından başarılı bulunarak kabul edilmiştir.

26 / 02 / 2015

Tez Sınav Jürisi

Ünvanı Adı Soyadı (Üniversitesi, Fakültesi, Anabilim Dalı)

İmzası

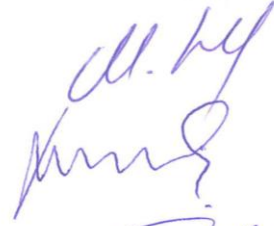
1.Prof. Dr. Fatma Gülgün Yener (İstanbul Üniversitesi, Eczacılık Fakültesi, Farmasötik Teknoloji)



2.Prof. Dr. Nazan Bergişadi (Yeni Yüzyıl Üniversitesi, Eczacılık Fakültesi, Farmasötik Teknoloji)



3.Doç. Dr. Melike Üner (İstanbul Üniversitesi, Eczacılık Fakültesi, Farmasötik Teknoloji)



4.Doç. Dr. Ümit Gönüllü (İstanbul Üniversitesi, Eczacılık Fakültesi, Farmasötik Teknoloji)



5.Yrd. Doç. Dr. Hande Sipahi (Yeditepe Üniversitesi, Eczacılık Fakültesi, Farmasötik Toksikoloji)



BEYAN

Bu tez çalışmasının kendi çalışmam olduğunu, tezin planlanmasından yazımına kadar bütün safhalarda etik dışı davranışımın olmadığını, bu tezdeki bütün bilgileri akademik ve etik kurallar içinde elde ettiğimi, bu tez çalışmasıyla elde edilmeyen bütün bilgi ve yorumlara kaynak gösterdiğimi ve bu kaynakları da kaynaklar listesine aldığımı, yine bu tezin çalışılması ve yazımı sırasında patent ve telif haklarını ihlal edici bir davranışımın olmadığını beyan ederim.

DERYA ALGÜL KURÇEREN

İTHAF

Canım aileme ithaf ediyorum...

TEŞEKKÜR

Engin bilgi ve deneyimleri ile bana yön veren, doktora çalışmalarımın yürütülmesi için gerekli olanakları sağlayan çok değerli sayın hocam **Prof. Dr. Fatma Gülgün Yener**'e, tüm katkılarından dolayı sonsuz saygı ve teşekkürlerimi sunarım.

Tez çalışması boyunca bilgi ve desteklerini benden hiç esirgemeyen sayın hocalarım **Prof. Dr. Alper Gökçe, Yrd. Doç. Dr. Hande Sipahi, Opr.Dr. Erkan Servet, Opr. Dr. Ayberk Önal** ve **Yrd. Doç. Dr. Enise Ece Gürdal Hakgör**'e en içten teşekkürlerimi sunarım.

Doktora tez çalışmalarına değerli katkılarından dolayı, doktora tez izleme komitesi üyeleri **Prof. Dr. Nazan Bergişadi**'ye ve **Doç. Dr. Melike Üner**'e saygı ve teşekkürlerimi sunarım.

Manevi desteklerinden dolayı Yeditepe Üniversitesi dekanı sayın hocam **Prof. Dr. Hülya Akgün**'e, dekan yardımcısı sayın hocam **Prof. Dr. Mine Yarım Yüksel**'e ve sayın hocam **Prof. Dr. Meriç Köksal Akkoç**'a sonsuz teşekkürlerimi sunarım.

Doktora eğitimim boyunca hep yanımda olan çok sevgili arkadaşlarım **Sebla Öztan, Yiğit Sarioğlu, Ebru Özkan** ve **İbrahim Özekici**'ye çok teşekkür ederim.

Tüm hayatım boyunca her zaman yanımda olduklarını hissettiren özverili canım **annem ve babama**, attığım her adımda bana güvenen ve beni destekleyen canım eşim **Ecz. İbrahim Serhat Kurçeren**'e, beni her konuda koşulsuz destekleyen canım ablam **İnş. Müh. Canan Algül Doğrucuoğlu**'na ve her zaman varlığıyla bana güç veren ve hayatıma neşe katan canım kardeşim **Dt. Pınar Algül**'e sonsuz sevgi ve teşekkürlerimi iletirim.

İÇİNDEKİLER

İÇ KAPAK.....	i
TEZ ONAYI	ii
BEYAN.....	iii
İTHAF.....	iv
TEŞEKKÜR.....	v
İÇİNDEKİLER	vi
TABLolar LİSTESİ.....	xi
ŞEKİLLER LİSTESİ	xii
SEMBOLLER / KISALTMALAR LİSTESİ	xv
ÖZET	xvii
ABSTRACT.....	xviii
GİRİŞ VE AMAÇ.....	1
GENEL BİLGİLER	3
2.1 Osteokondral Dokunun Yapısı.....	3
2.2 Osteokondral Lezyonlar.....	4
2.3 Osteokondral Lezyonların Tedavi Yaklaşımları.....	5
2.4 Biyomimetik Osteokondral Biyokompozitlerin Dizaynı	6
2.5 Osteokondral Biyokompozitlerin Sahip Olması Gereken Özellikler	7
2.6 Biyokompozit Üretiminde Kullanılan Biyomalzemeler	8
2.6.1 Doğal ve Sentetik Polimerler	8
2.6.1.1 Kitozan.....	8
2.6.1.2 Aljinat	10
2.6.2 Biyoseramikler.....	12
2.6.2.1 Biyo Camlar ve Cam Seramikler	13
2.6.2.2 Kalsiyum Fosfatlar.....	13

2.7 Osteokondral Doku İskelesi Fabrikasyon Yöntemleri.....	15
2.7.1 Geleneksel Yöntemler.....	16
2.7.1.1 Çözücü Dökümü/Parçacık Uzaklaştırma	16
2.7.1.2 Gaz Köpüklendirme	17
2.7.1.3 Eriyik Kalıplama.....	17
2.7.1.4 Oda Sıcaklığında Sıkıştırarak (Pres) Kalıplama	17
2.7.1.5 Faz Ayrımı/Emülsifikasyon	18
2.7.1.6 Tekstil teknolojileri (Elektrospinning).....	19
2.7.1.7 Dondurarak Kurutma	20
2.7.2 Serbest Katı Hal Yöntemleri.....	22
2.8 Biyokompozitlerin Sterilizasyonu	23
2.9 Kemik/Kıkırdak Doku İskelelerinde Yapılan Kontroller	24
2.9.1 Biyobozunma	25
2.9.2 Gözenek Yapısı.....	25
2.9.3 Mekanik Dayanıklılık Testleri	26
2.9.4 Biyouyumluluk	26
2.9.4.1 Hücre Toksisite Deneyleri	27
2.9.5 Etkin Madde Salım Testleri	28
2.10 Etkin Madde Salım Profillerinin Matematiksel Olarak Değerlendirilmesi	28
2.10.2 Birinci Derece Kinetik	29
2.10.3 Higuchi Modeli	29
2.10.4 Hixson Crowell Modeli (Küp Kök Yasası)	30
2.10.5 Korsmeyer Peppas Modeli.....	30
2.11 Implante Polimerik Kontrollü Salım Sistemlerinin Sınıflandırılması	31
2.12 Model İlaç Olarak Kullanılan Dekametazonun Özellikleri.....	34
GEREÇ VE YÖNTEMLER	36

3.1 Kullanılan Kimyasal Madde, Araç ve Gereçler	36
3.1.1 Kullanılan Maddeler	36
3.1.2 Kullanılan Araç ve Gereçler.....	37
Ultra saf su sistemi.....	38
Millipore, Almanya.....	38
3.2 Formülasyon Çalışmaları	38
3.2.1 Bileşenlerin Seçimi	38
3.2.2 Ön Denemeler	38
3.2.3 Doku İskeleleri Üretim Tekniği	39
3.2.3.1 Kıkırdak Tabakasının Üretimi	40
3.2.3.2 Ara yüz ve Osteokondral Tabakalarının Üretim Tekniği	40
3.2.3.3 Üç tabakalı Doku İskelesi Üretim Tekniği	40
3.3 Doku İskelelerinin Karakterizasyonu	41
3.3.1 Fourier Dönüşümlü Kızılötesi (FTIR) Spektroskopisi	41
3.3.2 Taramalı Elektron Mikroskopu (SEM) Analizleri.....	41
3.3.3 Şişme Testi.....	41
3.3.4 <i>In Vitro</i> Biyobozunma Testi	42
3.3.5 Mekanik Dayanıklılık Testi	42
3.4 Seçilen Üç Tabakalı Doku İskelesinden <i>In Vitro</i> Salım Çalışmaları.....	43
3.4.1 Model İlaç Dekametazonun Ultraviyole (UV) Spektroskopisi	43
3.4.2 Analitik Yöntem Validasyonu	43
3.4.2.1 Standart Doğrunun Hazırlanması (Doğrusallık)	44
3.4.2.2 Yöntemin Geri Kazanım Oranının İncelenmesi	44
3.4.2.3 Yöntemin Tekrar Edilebilirliği	44
3.4.2.4 Tekrar Elde Edilebilirlik Çalışması	44
3.4.3 Doku İskelesine Dekametazon Yüklenmesi.....	44
3.4.4 Dekametazon Salım Çalışması.....	45

3.4.5 Deksa metazon Salım Kinetiklerinin Hesaplanması.....	45
3.5 Doku İskelelerinin <i>In Vitro</i> Sitotoksitesitesi.....	45
3.6 <i>In Vitro</i> Epiderm TM Deri İritasyon Testi (SIT).....	47
3.7 <i>In Vivo</i> Osteokondral Defekt Modeli.....	47
3.7.1 Deney Grupları	48
3.7.2 Plateletce Zengin Plazmanın Elde Edilişı ve Doku iskelelerine Yüklenmesi Yöntemleri.....	48
3.7.3 Histopatoloji Çalışmaları	48
3.8 İstatistiksel Analizler	49
BULGULAR.....	50
4.1 Formülasyon Çalışmaları	50
4.2 Doku İskelelerinin Karakterizasyonu	50
4.2.1 Fourier Dönüşümlü Kızılötesi (FTIR) Spektroskopisi Analiz Bulguları	50
4.2.2 SEM Analizi Bulguları	52
4.2.3 Şişme Testi Bulguları.....	58
4.2.4 <i>In Vitro</i> Biyobozunma Testi Bulguları	59
4.2.5 Mekanik özellikler	60
4.3 Üç tabakalı Doku İskelesinin Tabakalarının Belirlenmesi	61
4.4 <i>In vitro</i> Salım Çalışması Bulguları	61
4.4.1 Model İlaç Deksa metazonun UV Analiz Bulguları.....	61
4.4.2 Analitik Yöntem Validasyonuna Ait Bulgular	62
4.4.2.1 Standart Doğrunun Hazırlanması (Doğrusallık).....	62
4.4.2.2 Yöntemin Geri Kazanımının Tespitine Ait Bulgular.....	63
4.4.2.3 Yöntemin Tekrar Edilebilirlik Bulguları	64
4.4.2.4 Tekrar Elde Edilebilirlik Çalışması Bulguları	64
4.4.3 Doku İskelesine Deksa metazon Yüklenmesi.....	65

4.4.4 Deksa­metazon Salım Çalışması Bulguları.....	65
4.4.5 Deksa­metazon Salım Kinetiklerinin Hesaplanması.....	66
4.5 Doku İskelelerinin <i>In Vitro</i> Sitotoksitesitesi Bulguları	67
4.6 <i>In Vitro</i> Epiderm TM Deri İritasyon Testi (SIT) Sonuçları	72
4.7 <i>In Vivo</i> Osteokondral Defekt Modeli Bulguları.....	73
TARTIŞMA	85
5.1 Bileşenlerin Seçilmesi ve Konsantrasyonların Belirlenmesi İşleminin Değerlendirilmesi.....	85
5.2 Doku İskelelerinin Karakterizasyonu	85
5.2.1 Fourier Dönüşümlü Kızılötesi (FTIR) Spektroskopisi Analiz Bulguları	85
5.2.2 SEM Analizi Bulgularının Değerlendirilmesi	86
5.2.3 Şişme Testi.....	86
5.2.4 Biyobozunma testi	87
5.2.5 Mekanik Dayanıklılık Testi	87
5.3 Model İlaç Deksa­metazonun Salım Sonuçlarının Değerlendirilmesi.....	89
5.4 Doku İskelelerinin <i>In Vitro</i> Sitotoksitesitesi ve Epiderm TM SIT Bulgularının Değerlendirilmesi.....	90
5.5 <i>In Vivo</i> Osteokondral Defekt Modeli Bulgularının Değerlendirilmesi.....	92
5.6 Sonuç Ve Öneriler	94
KAYNAKLAR	97
ETİK KURUL KARARI	113
ÖZGEÇMİŞ	114

TABLOLAR LİSTESİ

Tablo 2-1: Ca/P oranları, kimyasal formülleri ve farklı kalsiyum fosfat türevlerinin kimyasal adları.....	14
Tablo 2-2: Difüzyonel sabitler ve salım mekanizmaları.....	31
Tablo 3-1: Kullanılan maddelerin listesi.....	36
Tablo 3-2: Kullanılan araç ve gereçlerin listesi.....	37
Tablo 3-3: Formülasyon Değerleri.....	39
Tablo 4-1: Doku iskelelerinin ortalama gözenek çapları.....	53
Tablo 4-2: % Şişme analiz sonuçları.....	59
Tablo 4-3: % Biyobozunma analiz sonuçları.....	60
Tablo 4-4: Mekanik dayanıklılığı testi sonuçları.....	60
Tablo 4-5: % Geri kazanım bulguları.....	63
Tablo 4-6: Tekrar edilebilirlik bulguları.....	64
Tablo 4-7: Tekrar elde edilebilirlik bulguları.....	64
Tablo 4-8: Doku iskelesine deksametazon en kapsülasyon etkinliği bulguları.....	65
Tablo 4-9: Üç tabakalı iskeleye ait salım kinetikleri.....	66
Tablo 4-10: ICRS'in histolojik değerlendirme sistemi ve grupların ICRS'in histolojik değerlendirme sistemini kullanarak skorlanması.....	83

ŞEKİLLER LİSTESİ

Şekil 2-1: Subkondral kemik, kalsifiye kıkırdak, tidemarkın ve artiküler kıkırdağın şematik görünümü.....	3
Şekil 2-2: Kitin ve kitozanın elde edildiği canlılar ve kimyasal yapıları şematik gösterilmektedir.....	9
Şekil 2-3: Aljinik asitin polimerik bloklarının yapısı.....	11
Şekil 2-4: Çapraz bağlanmış aljinatın şematik gösterimi.....	12
Şekil 2-5: Çözücü dökümü/parçacık uzaklaştırma tekniğinin şematik gösterimi.....	16
Şekil 2-6: (a) Oda sıcaklığında sıkıştırarak kalıplama yöntemi şematik gösterilmektedir. (b) Bu yöntemle oluşan gözenekli doku iskelelerinin fotoğrafı gösterilmektedir.....	18
Şekil 2-7: Faz ayrımı emülsifikasyon/dondurarak kurutma işleminin şematik gösterimi.....	19
Şekil 2-8: a) Elektrospinning düzeneğinin şeması. b) Elektrospinning teknolojsi ile üretilmiş farklı konsantrasyonlarda polimer içeren fiberlerin görüntüleri.....	20
Şekil 2-9: Dondurarak kurutma işlemi uygulanmış bir çalışmanın şematik gösterimi...	22
Şekil 2-10: Han ve arkadaşlarının yaptığı bir çalışmadan alınmış doku iskelelerinin SEM görüntüleri.....	22
Şekil 2-11: Serbest katı hal yönteminin şematik gösterimi.....	23
Şekil 2-12: Biyobozunmayan rezervuar ve matriks sistemlerin şematik görünümü.....	32
Şekil 2-13: Biyobozunan matriks sistemin şematik görünümü.....	33
Şekil 2-14: Deksametazonun moleküler yapısı.....	34
Şekil 4-1: FTIR spektrumları kitozan, aljinat polielektrolit kompleksi (CA/PEK) ve çapraz bağlı CA/PEK.....	51
Şekil 4-2: FTIR spektrumları CA/PEK/TCP (a) TCP tozu (b) CA/PEK (c).....	52
Şekil 4-3: Aljinat, kitozan ve trikalsiyum fosfat kullanılarak hazırlanan doku iskelesinin kimyasal etkileşiminin şematik gösterimi.....	52
Şekil 4-4: P2 kodlu formüle ait doku iskelesinin SEM görüntüsü.....	53

Şekil 4-5: TM2 kodlu formüle ait doku iskelesinin SEM görüntüsü.....	54
Şekil 4-6: SC2 kodlu formüle ait doku iskelesinin SEM görüntüsü.....	54
Şekil 4-7: P4 kodlu formüle ait doku iskelesinin SEM görüntüsü.....	55
Şekil 4-8: P4 kodlu formüle ait doku iskelesinin SEM görüntüsü.....	55
Şekil 4-9: TM4 kodlu formüle ait doku iskelesinin SEM görüntüsü.....	56
Şekil 4-10: SC4 kodlu formüle ait doku iskelesinin SEM görüntüsü.....	56
Şekil 4-11: SC6 kodlu formüle ait doku iskelesinin SEM görüntüsü.....	57
Şekil 4-12: TM6 kodlu formüle ait doku iskelesinin SEM görüntüsü.....	57
Şekil 4-13: P6 kodlu formüle ait doku iskelesinin SEM görüntüsü.....	58
Şekil 4-14: Çapraz bağlanmamış P6 kodlu formüle ait doku iskelesinin SEM görüntüsü.....	58
Şekil 4-15: Seçili monolitik yapıda üç tabakalı doku iskelesinin fotoğrafları.....	61
Şekil 4-16: Doku iskelesi içerisindeki deksametazonun UV spektrumu.....	62
Şekil 4-17: Deksametazonun UV’de 242 nm dalga boyunda çizilen kalibrasyon eğrisi.....	62
Şekil 4-18: Üç tabakalı iskeleden deksametazon salım grafiği.....	66
Şekil 4-19: % 100 kıkırdak tabakası doku iskelesine maruz kalan L929 hücrelerinin morfolojisi	67
Şekil 4-20: % 100 ara yüz tabakası doku iskelesine maruz kalan L929 hücrelerinin morfolojisi	68
Şekil 4-21: % 100 subkondral tabakası doku iskelesine maruz kalan L929 hücrelerinin morfolojisi.....	68
Şekil 4-22: % 100 Üç tabakalı doku iskelesine maruz kalan L929 hücrelerinin morfolojisi.....	69
Şekil 4-23: Medyum L929 hücrelerinin morfolojisi.....	69
Şekil 4-24: % 20 DMSO’ya maruz kalan L929 hücrelerinin morfolojisi.....	70

Şekil 4-25: Hücre canlılığının MTT analizi ile takibi sonuçları.....	70
Şekil 4-26: Epiderm TM deri irritasyon testi plağı.....	72
Şekil 4-27: Epiderm SIT sonuçları.....	72
Şekil 4-28: Osteokondral defektin oluşturulma aşamalarının fotoğrafları.....	73
Şekil 4-29: Osteokondral defekte üç tabakalı doku iskelesinin yerleştirme aşamalarının fotoğrafları.....	74
Şekil 4-30: Sakrifikasyon sonrası alınan kontrol grubuna ait doku örneği.....	74
Şekil 4-31: Kontrol grubuna ait hematoksilen-eozin ile boyanmış doku örneği.....	75
Şekil 4-32: Kontrol grubuna ait toluidin mavisi ile boyanmış doku örneği.....	75
Şekil 4-33: Polimer grubuna ait hematoksilen-eozin ile boyanmış doku örneği.....	76
Şekil 4-34: Polimer grubuna ait toluidin mavisi ile boyanmış doku örneği.....	76
Şekil 4-35: Referans grubuna ait hematoksilen-eozin ile boyanmış doku örneği.....	77
Şekil 4-36: Referans grubuna ait toluidin mavisi ile boyanmış doku örneği.....	77
Şekil 4-37: Sakrifikasyon sonrası alınan üç tabakalı doku iskelesine ait doku örneği...	78
Şekil 4-38: TCP grubuna ait hematoksilen-eozin ile boyanmış doku örneği.....	79
Şekil 4-39: TCP grubuna ait toluidin mavisiyle boyanmış doku örneği.....	79
Şekil 4-40: PRP grubuna ait hematoksilen-eozin ile boyanmış doku örneği.....	80
Şekil 4-41: PRP grubuna ait toluidin mavisine boyanmış doku örneği.....	80
Şekil 4-42: Histopatolojik değerlendirme sonucu implant kalıntısı skorlarının oranları.....	81
Şekil 4-43: Histopatolojik değerlendirme sonucu yabancı cisim dev hücre reaksiyonu skorlarının oranları.....	81

SEMBOLLER / KISALTMALAR LİSTESİ

A: Aljinat

CAD: Bilgisayar Destekli Tasarım

DMEM: Dulbecco's Modified Eagle's Minimal Essential Medium

DMSO: Dimetilsülfoksit

DPBS: Dulbecco'nun Fosfat Tampon Solüsyonu

DSD: Deksametazon Sodyum Difosfat

ECVAM: Avrupa Alternatif Yöntemlerin Tasdiki Merkezi

FTIR: Fourier Dönüşümlü Kızılötesi

HA: Hidroksiapatit

ICH: Uluslararası Harmonizasyon Konferansı

ICRS: Uluslararası Kıkırdak Araştırma Derneği

ISO: Uluslararası Standart Organizasyonu

C: Kitozan

MTT: 3-(4,5-Dimetiltiyazol-2-il)-2,5-difeniletrazolyum bromür

OA: Osteoartrit

OD: Osteokondritis Dissekans

P: Kıkırdak Tabakası

PBS: Fosfat Tampon Çözeltisi

PEK: Polielektrolit Kompleksi

PRP: Platelet Yönünden Zenginleştirilmiş Plazma

SC: Subkondral Kemik Tabakası

SDS: Sodyum Dodesil Sülfat

SEM: Taramalı Elektron Mikroskobu

TCP: Trikalsiyum Fosfat

TLS: Üç Tabakalı Doku İskelesi

TM: Ara Yüzey Tabakası

TSE: Türk Standardları Enstitüsü

UV: Ultraviyole

ÖZET

Algül Kurçeren D., Biyopolimer ve Biyoseramik Kompozitlerin Hazırlanışı, Karakterizasyonu ve In vivo Değerlendirilmesi, Doktora Tezi, T.C. İstanbul Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü, Farmasötik Teknoloji Anabilim Dalı, Farmasötik Teknoloji Programı, İstanbul, 2015.

Bu çalışmanın amacı, osteokondral hasarları tedavi etmek için kullanılan monolitik yapıda üç tabakalı doku iskelesi (TLS) geliştirmektir. Bu TLS; (i) üst tabakasında kitozan (C) ve aljinat (A) polielektrolit kompleksinden (CA/PEK) oluşmaktadır ve bu tabakada kıkırdak doku taklit edilmiştir, (ii) orta tabakasında CA/PEK ve β -trikalsiyum fosfatdan (β -TCP) (%40) oluşmaktadır ve bu tabaka ara yüz tabakasının yerine koymak için geliştirilmiştir, (iii) alt tabakasında CA/PEK ve β -TCP'dan (%70) oluşmaktadır ve bu tabakada ise subkondral kemik taklit edilmiştir. Doku iskelesi formülasyon çalışmalarında üretim tekniği olarak dondurarak kurutma yöntemi kullanılmıştır. Karakterizasyon çalışmaları FT-IR, şişme, mekanik dayanıklılık, biyobozunma ve SEM testleri kullanılarak gerçekleştirilmiştir. Bu çalışmalar sonunda optimum üç formülasyon kullanılarak TLS üretilmiştir. Dekametazon TLS'ye yüklenmiştir ve in vitro salım çalışmaları yapılmıştır. In vitro sitotoksosite çalışmalarında, L929 hücre hattı kullanılarak ve Epiderm deri iritasyon testinde EpiDerm insan Epidermal (RHE) Model yeniden inşa kullanılarak biyoyumluluk araştırılmıştır. Son olarak, bu doku iskelesinin iyileştirici potansiyelini referans Maioregen®'e karşı değerlendirmek için, bu iskeleler Sprague-Dawley sıçanlarının dizlerinde oluşturulan osteokondral hasara uygulanmıştır. Karakterizasyon sonuçlarına göre, C, A ve β -TCP'nin aralarında güçlü iyonik bağların olduğu, üretilen iskelelerin içsel bağlantılı gözenekli yapıya sahip olduğu ve birbirinden farklı şişme oranlarına, biyobozunma hızına ve mekanik özelliklere sahip olduğu ortaya çıkmıştır. Salım çalışmaları, ilaç salımının başlangıçta yüksek (3. saat), sonrasında yavaş etkin madde salımı şeklinde 48 saat sürdüğünü göstermiştir. Sitotoksosite ve iritasyon sonuçlarına göre, doku iskelesi biyoyumlu bulunmuştur. In vivo çalışmalarda ise bu iskelenin iyi doku biyoyumluluğuna ve biyobozunma hızına sahip olduğu bulunmuştur. Bütün sonuçlar TLS'nin osteokondral doku uygulamalarında kullanılabileceğini göstermiştir.

Anahtar kelimeler: Doku iskelesi, Osteokondral hasar, Kitozan, Aljinat.

Bu çalışma İstanbul Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Komisyonunca desteklenmiştir. Proje Numarası: 50792.

ABSTRACT

Algul Kurceren D., Preparation, Characterization and In vivo Evaluation of Biopolymer and Bioceramic Composites, Ph.D. Thesis, Republic of Turkey Istanbul University Institute of Health Sciences, Department of Pharmaceutical Technology, Pharmaceutical Technology Programme, Istanbul, 2015.

The aim of the present study is to develop biomimetic three layered monolithic scaffold (TLS) intended for treatment of osteochondral defects. The TLS consists of; (i) the upper layer of chitosan (C) and alginate (A) polyelectrolyte complex (CA/PEC), reproducing the cartilaginous region, (ii) the intermediate layer of a combination of CA/PEC and β -tricalcium phosphate (β -TCP) (40%) and (iii) the lower layer of CA/PEC and β -TCP (70%), mimicking the subchondral bone. The scaffolds were produced by using freeze drying method. Characterization studies were performed by FT-IR, swelling, mechanical strenght, biodegradation and SEM tests. TLS was produced by using optimum three formulations after all these studies. Dexamethasone was incorporated into the TLS and in vitro release studies were done. In vitro cytotoxicity assay with L929 cells and EpiDerm skin irritation test (SIT) using the EpiDerm Reconstructed Human Epidermal Model were done to analyze biocompatibility of the scaffolds. Finally, the scaffolds were implanted into the osteochondral defects formed in the patella of Sprague-Dawley rats to comparatively assess the healing potential of the TLS on the defect against reference Maioregen®. The characterization results showed that there are strong ionic interactions among C, A and β -TCP and the layers have interconnected porous structure with different swelling, biodegradation and mechanical properties. The release studies indicated that after an initial burst of 3h, dexamethasone is released slowly during a 48h period. The cytotoxicity and irritation studies showed that the TLS is biocompatible. In vivo studies indicated that the TLS has good tissue biocompatibility and biodegradation rate.

Keywords: Scaffold, Osteochondral defect, Chitosan, Alginate.

This work was supported by Scientific Research Projects Coordination Unit of Istanbul University. Project number: 50792.

GİRİŞ VE AMAÇ

Osteokondral doku (kemik-kıkırdak ara yüzeyi) zedelenmeleri üzerine yapılan araştırma sayısı gün geçtikçe artmaktadır. Bu zedelenmeler travma nedeniyle ya da osteoartrit veya osteokondrit gibi geniş bir popülasyonu etkileyen dejeneratif hastalıklar sonucunda oluşabilmektedir. Dünyada 630 milyon insan osteoartrit nedeniyle osteokondral doku dejenerasyonuna sahiptir (Srinivas ve ark. 2014). Bu rakam gün geçtikçe artmaktadır. Ortopedistler ve araştırmacılar kemik stimülasyon tekniği (mikrokırık), osteokondral otograft implantasyonu ve otolog kondrosit transplantasyonu gibi farklı tedavi edici ve rejenerasyon yöntemleri üzerinde çalışmaktadırlar (Cristensen ve ark. 2012; Xing ve ark. 2013). Bu tedavi yöntemleri yararlı olsa bile verici saha ağrısı, enfeksiyon, morbidite ve limitli stok yüzünden elde edilebilmede sınırlamalar gibi sakıncaları bulunmaktadır (Siclar ve ark. 2012; Maruyama ve ark. 2003). Bu nedenlerden dolayı son yıllarda çeşitli biyomalzemeler kullanılarak alternatif doku transplantı geliştirme çalışmaları önem kazanmıştır. Bu çalışmalarda doğal kemik dokusunu taklit etmek için biyoseramikler, biyopolimerler, metaller ve polimer-seramik karışımı biyokompozitler kullanılmaktadır. Biyoseramiklerin kimyasal yapısı doğal kemik yapısına benzemektedir ve hastanın kendi kemik dokusu ile bağlanmayı sağlarlar. Bununla birlikte yüksek biyouyumluluğa sahiptirler. Biyoseramiklerin en çok kullanılanları trikalsiyum fosfat, hidroksiapatit (HA), oktakalsiyum fosfat ve kalsiyum sülfattır (Szpalski ve ark. 2012). Biyopolimerler kemik dokusunun oluşmasına ve tekrar yapılmasına yardımcı oldukları için son yıllarda kemik dokusu çalışmalarında sıkça yer almaktadırlar. Doğal polimerlerin en çok kullanılanları ise kollajen, kitozan, hiyaluronik asit ve aljinattır. Bunlar düşük immünojenik potansiyele ve yüksek biyoadezyon yapısına sahiptirler. Günümüzde biyopolimer ve biyoseramiğin sinerjik etkilerinden yararlanmak için birlikte kullanıldığı biyokompozit yapılar üzerine yapılan çalışmalar umut vericidir (Liu ve ark. 2012; Salgado ve ark. 2004).

Biyoparçalanabilen biyokompozit materyaller ihtiyaç duyulan defektif (kemik noksanlı) bölgelerde hacim doldurmak, onarıma (bütünlüğün yeniden sağlanmasına) yardımcı olmak ve mekanik desteği sağlamak için tercih edilebilmektedirler. Başlangıçta mekanik dayanıklılık önem kazanırken ilerleyen zamanda biyobozunma sonrası yerine geçecek kemik dokusuna yapıtaşı olarak katılarak da yeni doku

oluşumuna yardımcı olmaktadır. Kemik dokusu ile zaman içerisinde uyum ve ahenkle gerçekleşen ideal yer değiştirme zamanlaması hasta uzvunun sağaltımında son derece önemlidir (Li ve ark. 2005, Kaynak: Persidis p.508-510, Petite p. 959–963).

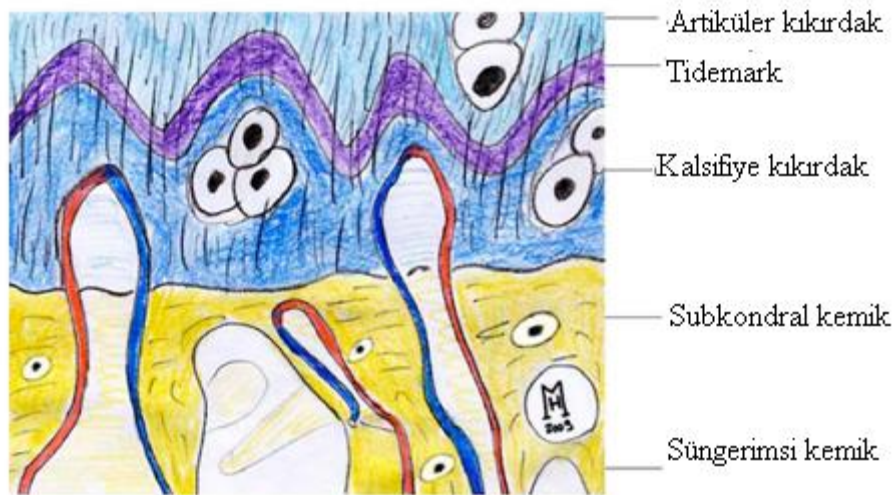
Osteokondral lezyonlar kemik ve kıkırdak olmak üzere iki farklı dokuyu içermektedir ve bu dokuların iyileşme yolları tamamen birbirinden farklıdır. Son yıllarda artiküler eklem hasarlarını tedavi etmek için çok tabakalı osteokondral doku iskeleleri üzerinde çalışmalar yoğunlaşmıştır. Araştırmacılar osteokondral dokunun yapısını taklit etmek için kemik ve kıkırdak dokularını ayrıca, bu tabakaların ara yüzey kısmını içeren çok tabakalı biyokompozitler üzerine çalışmaktadırlar.

Bu tez çalışmasının amacı, osteokondral doku rejenerasyonunu destekleyecek özelliklere sahip β -trikalsiyum fosfat (β -TCP), kitozan ve aljinat polimerleri kullanılarak dondurarak kurutma yöntemi ile üç tabakalı doku iskelesi hazırlamaktır. Bu amaca yönelik olarak, bu biyokompozitlerin üretimi ve karakterizasyon çalışmaları yapılarak, etkinlikleri piyasada mevcut bulunan MaioRegen (Fin-Ceramica Faenza S.p.A., İtalya) doku iskelesine karşı *in vivo* hayvan deneyleri yapılarak karşılaştırmalı çalışmalarla incelenmiştir. Hayvan deneyleri sırasında plateletce zengin plazma (PRP) yüklenmiş doku iskelelerinin etkinliği diğer deney gruplarıyla karşılaştırılmıştır. Ayrıca bu biyokompozitin *in vitro* sitotoksitesite ve deri iritasyon çalışmalarıyla biyoyumluğu incelenmiştir.

GENEL BİLGİLER

2.1 Osteokondral Dokunun Yapısı

Osteokondral doku birbirinden farklı yapıdaki subkondral kemik ve artiküler kıkırdak dokularını, ve bunların ara yüzeyinde bulunan yumuşak ve kararlı geçiş yapısını içermektedir. Artiküler kıkırdak doku yumuşak ve stres absorpsiyonu sağlayan yaklaşık 3-4 mm kalınlığa sahip artiküler eklem yüzeyinde bulunan yapılardır (Harley ve ark. 2010). Artiküler kıkırdak doku ekstraselüler matriksi doku sıvıları ve iskelet yapısını ve kararlılığını sağlayan büyük bir çoğunluğu tip II kollojen ve glikozaminoglikanlardan oluşan makromolekülleri içermektedir. Kollajenler artiküler kıkırdağın kuru ağırlığının yaklaşık % 60'ını oluşturmaktadırlar, proteoglikanlar ise % 25-30'unu oluştururken geri kalan yapısal makromoleküller ise kollajen olmayan proteinler ve glikoproteinlerdir (Buckwalter ve ark. 2005). Kollajenler ağ şeklinde proteoglikanları sararak dokunun bütünlüğünü ve gerilmeye karşı direnç gücünü sağlamaktadırlar. Kondrositlerle ağ arasındaki karşılıklı dayanışma, dokunun yaşam boyu bütünlüğünün korunmasını sağlamaktadır (Şenköylü ve Korkusuz 2004). Deri ve kemikten farklı olarak artiküler kıkırdak doku (Şekil 2.1) damarsız, hücre dansitesi düşük ve kendi kendine onarıcı özelliği zayıf yapıya sahiptir. Beslenmesi sinovyal sıvıdan difüzyonla gerçekleşmektedir (Harley ve ark. 2010).



Şekil 2-1: Subkondral kemik, kalsifiye kıkırdak, tidemarkın ve artiküler kıkırdağın şematik görünümü (Madry ve ark. 2010).

Kemik dokusu ise organik ve inorganik bileşenlerden oluşmaktadır. Organik bileşenler kollajenler, kollajen olmayan diğer proteinler ve hücrelerdir. Başlıca inorganik bileşen ise hidroksiapatit olup, başlıca elementleri kalsiyum ve fosfattır (Korkusuz ve ark. 2011). Kemik dokusunun ağırlığının %70'ini inorganik maddeler oluşturmaktadır (Tampieri ve ark. 2003). Kemik organik matriksinin %90-95'i kemiğe kuvvetli bir gerilme direncini sağlayan kollajen lifleri, geri kalanı ise ana madde olarak nitelendirilen homojen bir ortamdan ibarettir. Kollajen lifler, kemiğe kuvvetli bir gerilme direnci sağlamaktadır. Ekstraselüler sıvının ana maddeleri proteoglikanlardır ayrıca kondroitin sülfat ve hiyalüronik asit içermektedir (Sayın ve Çalış 2006). Kemik sert olmasına rağmen çok esnek, damardan yoğun, metabolik olarak aktif ve yüksek hücre dansitesine sahiptir. Osteoklast, osteoblast ve osteositler kemik iliğindeki kan ve kök hücreler dışında kemiğin hücrelerini oluşturmaktadır (Korkusuz ve ark. 2011).

Eklem kıkırdağı yüzeyel zon, geçiş (orta) zon, derin zon ve kalsifiye kıkırdak zon olarak dört tabakaya ayrılmaktadır. En derin tabaka olan kalsifiye kıkırdak tabakası, hiyalin kıkırdağı kortikal yapıdaki subkondral kemikten ayırmaktadır. Artiküler eklemlerin yapısında subkondral kemik plağı ile artiküler kıkırdak arasında 2-5 µm kalınlığındaki dokuya ise 'Tidemark' denir (Şekil 2.1) (Kuran, 2011). Kalsifiye kıkırdak mineralize olmayan ve damar içermeyen kıkırdak dokusu ve mineralize, damar yoğunluğu fazla kemik dokusu arasında güçlü ve kararlı bir arafaz oluşturmaktadır. Yapısındaki CaP içeriği kıkırdak dokusuna yakın kısımlara doğru azalırken, kollajen miktarıda kemik dokusuna yakın kısımlarda azalmaktadır (Harley ve ark. 2010).

2.2 Osteokondral Lezyonlar

Osteokondral lezyonlarda subkondral kemik ve üzerindeki kıkırdak zedelenmiştir. Bu lezyonları odaksal ve dejeneratif olmak üzere iki grupta inceleyebiliriz. Odaksal lezyonlar travma, osteokondritis dissekans (OD) ya da osteonekroz nedeniyle oluşan sınırları belli olan hasarlardır. Dejeneratif lezyonlar ise bağların instabilitesinde, menisküse bağlı yaralanmalarda ve osteoartritte (OA) görüldüğü gibi sınırları belli olmayan hasarlardır (Falah ve ark. 2010). Osteokondral lezyonlar en çok travmalara bağlı oluşmaktadır. Kaza ya da spor kazaları nedeniyle oluşan aşındırıcı kuvvetler kıkırdak dokusunda bazen subkondral dokuyu da içerisine alarak strese bağlı kırıklar oluşturmaktadır. Diz kapağı çıkıkları bu mekanizmayla osteokondral kırıklara neden olmaktadır. 20-40 yaş arası genç hastalarda yaygın görülen

uyluk kemiği kondilleri etrafında oluşan osteokondral lezyonların % 40-50'sinin nedeni bu mekanizmadır (Boden ve ark. 1997). Osteokondritis dissekans osteokondral bir fragmanın çevre kemik ve kıkırdak dokudan bağlantısının kesilmesi durumudur (Yılmaz 2012). OD'a en çok tekrarlayan mikrotravmalar neden olmaktadır. (Pate ve ark. 1998; Falah ve ark. 2010). Damarlanmadaki bozukluklar, steroid tedavisi, alkol bağımlılığı gibi sebepler osteonekroza neden olabilmektedir. 40 yaşından sonra en çok görülen kondral lezyon ise osteoartrit nedeniyle oluşmaktadır. OA risk faktörleri arasında anormal biyomekanik ve travma, obezite, yaş, genetik yanlış yerleşim, yüksek kemik mineralizasyonu ve konjenital kemik ve kıkırdak gelişim bozuklukları gibi nedenler sayılabilmektedir (Kuettner ve ark. 2005). Dejeneratif lezyonlar farklı derinlik ve büyüklükte olabilmektedir. Subkondral kemiğin katılaşması düşük mekanik dayanıklılık ve kıkırdak matriksinin bozulmasına neden olmaktadır. Menisküs yırtılması ve bağların kopması ile dizin instabil olması biyomedikal fonksiyonun yitirilmesine yol açmaktadır bu durum da kıkırdak yaralarının boyutunu arttırmaktadır.

2.3 Osteokondral Lezyonların Tedavi Yaklaşımları

Hasarlı dokunun yapısı ve büyüklüğüne göre osteokondral hasarın tedavisi için artroskopik inceleme ve debriman, abrazyon artroskopi ve mikrokirik gibi cerrahi yöntemler günümüzde sıklıkla kullanılmaktadır. Bu uygulamalar hasarı tedavi etmesi için vücudu uyarır ve hasarlı bölgede fibrokıkırdak oluşmasına yol açmaktadır. Fibrokıkırdak doku yara izi kalmış ve hyalin kıkırdakla karşılaştırınca elastikiyetini kaybetmiş, sertliği ve kaplama özelliği azalmış bir dokudur. Oluşan bu doku uzun süre fizyolojik yükü taşımayı garantilememektedir (Lattermann ve ark. 2009; Rodrigues ve ark. 2011). Bu nedenlerden dolayı ortopedistler osteokondral lezyonları tedavi etmek için hastanın kendisinden alınan (otograft) veya kadavradan (allograft) temin edilen kemik doku parçalarının ve otolog kondrositlerin hasarlı bölgeye implantasyonunu/transplantasyonunu tercih etmektedirler. Kendi kemiği kullanılan hastalarda verici saha ağrısı, enfeksiyon, morbidite ve limitli stok yüzünden elde edilebilmede sınırlamalar gibi sakıncalar bulunmaktadır. Kadavra menşeyli dokularda ise enfeksiyon ve enflamasyon gibi sorunlar ortaya çıkmaktadır (Rodrigues ve ark. 2011). Bu nedenlerden dolayı son yıllarda biyopolimerler ve biyoseramikler kullanılarak hazırlanan alternatif doku transplantı geliştirme çalışmaları önem kazanmıştır.

Osteokondral doku yenilenmesi süreci hücre çoğalması, hücre farklılaşması ve ekstraselüler matriks sentezi gibi iç içe geçmiş kompleks aşamalardan oluşmaktadır. Bu aşamalar ise büyüme hormonları tarafından yönetilmektedir. Klinik uygulamalarda doğal ya da rekombinant büyüme hormonları kullanılmaktadır. Ancak bu tedavi yöntemlerinin pahalı olması ve immünolojik problem yaratabilmesi nedeniyle kullanımları limitlidir. Büyüme hormonlarının konsantre bir şekilde verilmesinin diğer bir yolu ise platelet yönünden zenginleştirilmiş plazmanın (PRP) hasarlı kemik ve kırık dokusuna uygulanmasıdır. Bu uygulama bir kişiden alınan küçük miktardaki kanın özel bir tüpe konularak santrifüj işlemine tabi tutulmasından sonra bileşenlerine ayrıştırılması ve elde edilen az miktardaki PRP'nin yine aynı kişiye geri verilmesini temel almaktadır (Marx ve ark. 1998; Kutlu ve ark. 2013).

2.4 Biyomimetik Osteokondral Biyokompozitlerin Dizayını

Son yıllarda artiküler eklem hasarlarında kırık ve subkondral kemiği tedavi etmek için yapılan çalışma sayısı artmıştır (Lynn ve ark. 2004). Osteokondral yapıyı taklit etmek için poliglikolit, polilaktik asit ve polilaktit ve bunların kopolimerlerinden oluşan sentetik polimerler ve/veya kitozan, aljinik asit, kollajen gibi doğal polimerler kullanılmaktadır. Bazı çalışmalarda polimerlere ek olarak kemik yapısını taklit etmek için kemik yapısında bulunan kalsiyum fosfat türevi biyoseramikler de kullanılmaktadır. Doğal kemik ve kırık dokusunu taklit etmek, mekanik ve biyolojik performansı arttırmak için polimer ve biyoseramiğin birlikte kullanıldığı biyokompozit yapıları doku iskeleleri üretilmektedir. Polimer fazına seramik fazının eklenmesindeki avantaj sadece seramiklerin iskelenin biyomekanik özelliklerini artırması değil ayrıca seramikler ortamda tampon özellik gösterip polimerlerin asidik ortamda bozunmalarını önlemektedirler. Geliştirilen polimer/kalsiyum fosfat kompozitlerin iyi biyoyumluluk gösterdikleri birçok çalışmayla kanıtlanmıştır. Bu çalışmalarda hidroksiapatit veya trikalsiyum fosfat ve biyobozunabilen polimerlerle oluşturulmuş biyokompozitlerin biyoyumluluğu ve etkinliği *in vitro* ve/veya *in vivo* çalışmalarla incelenmiştir. Liao ve ark. (2010) yaptığı hücre kültürü çalışmalarında trikalsiyum fosfat ve kitozandan oluşturulmuş biyokompozitlerin hücre proliferasyonunu tek başına kitozandan daha fazla arttırdığı gözlenmiştir. Yapılan bir diğer çalışmada ise trikalsiyum fosfat ve poli (L-laktik asit) kullanarak üretilen biyokompozitin *in vivo* hayvan deneyleriyle etkisi incelenmiştir. Koyunlar üzerinde yapılan bu çalışmada biyokompozit içine hücre göçü

gerçekleştiği ayrıca bu kompozitin içerisinde orta bölümü dahil olmak üzere yeni kemik büyümesinin olduğu rapor edilmiştir (van der Pol ve ark. 2010).

Yapılan çalışmalarda osteokondral hasarı tedavi etmek için tek tabakalı biyokompozitlerin yetersiz olduğu gözlenmiştir. Osteokondral bölge birbirinden farklı yapıdaki kemik ve kıkırdak dokusunu içermektedir. Yapının taklit edilebilmesi için yapı, hem kemik hem de kıkırdak dokularının rejenerasyonunu ve tekrar yapılanmasını desteklemelidir (Nooeaid ve ark. 2012). Bu amaca yönelik mineralize kemik tabakası ve mineralize olmayan kıkırdak tabakasını içeren çok tabakalı biyokompozitler üzerine çalışmalar yapılmaktadır. Kondral faz ve kemik fazı ayrı ayrı üretilip fibrin yapıştırıcı veya kondriositlerle yapay bir şekilde birleştirilmiş bu çift fazlı yapıların implantasyon sürecinde başarısız olduğu gözlenmiştir (Da ve ark. 2013, Liu ve ark. 2013). Bu nedenle ayrı ayrı tabakaları oluşturup yapay bir şekilde yapıştırmak yerine çift tabakalı monolitik yapılar geliştirilmiştir. Bu çalışmaların birinde kalsiyum aljinat jel kondral fazı, kalsiyum aljinat jel/hidroksiapatit ise kemik fazını taklit etmek için kullanılmıştır. Yapılan taramalı elektron mikroskobu sonuçlarına göre bu çift tabakalı monolitik yapının kıkırdak ve subkondral kemik dokularının oluşması için yeterli bir ortam oluşturduğu gözlenmiştir (Gelinsky ve ark. 2007). Çift tabakalı yapılara ek olarak tam taklit edilme sağlanması için kıkırdak, kemik ve iki doku arasındaki fazı (ara yüzey) içeren üç tabakalı sistemler geliştirilmiştir. Günümüzde piyasada bulunan Mairogen® ticari isimli preparat ameliyatlarda osteokondral hasarları tedavi etmek için kullanılmaktadır. Bu preparatta bilim adamları kıkırdak tabakası için % 100 tip I kollajen, ara yüz tabakası için % 60 tip I kollajen ve % 40 hidroksiapatit kombinasyonu ve kemik tabakası için % 30 tip II kollajen ve % 70 hidroksiapatit birleşimini kullanarak geliştirdikleri çoklu tabakalı yapıyla insan osteokondral dokusunu taklit etmeye çalışmışlardır (Kon ve ark. 2010).

2.5 Osteokondral Biyokompozitlerin Sahip Olması Gereken Özellikler

Biyokompozitlerin bazı temel özelliklere sahip olmaları gerekmektedir. Hasarlı dokuya mutlaka geçici mekanik destek sağlamalıdır; kemik dokusunun büyümesini ve damarlanmasını sağlamak için gözenekli bir yapıya sahip olmalıdır; biyokompozit materyalinin içerisine hücre göçüne izin vermelidir; osteojenezi ve yeni kıkırdak oluşumunu geliştirmeli ve desteklemelidir; biyokompozit ve doku arasındaki hücrel aktiviteyi geliştirmelidir; biyobozunur olmalı ve yeni oluşan doku oluşumunu

kolaylaştırmalıdır; yıkım son ürünleri toksik olmamalıdır; aktif ya da kronik enflamasyona neden olmamalıdır; sterilizasyonu kolay olmalı ve sterilizasyon aşamasında aktivitesini yitirmemelidir; biyoaktif madde ya da ilacın kontrollü salımını sağlamalı ve doku iyileşmesini hızlandırmalıdır (Porter ve ark. 2009).

2.6 Biyokompozit Üretiminde Kullanılan Biyomalzemeler

Biyomalzemelerin biyokompozit yapısında kullanılabilmesi için temel olarak biyogeçimli, hücrelerin bağlanmasına, çoğalmasına ve farklılaşmasına izin veren bir yapısının olması gerekmektedir. Biyouyumlu ve kolay biyobozunur olmaları ve ekstraselüler matriks yapısına benzemelerinden dolayı sentetik ve/veya doğal polimerler ve kemiğin inorganik bileşenlerine katılmaları, osteokondüktiviteyi nedeniyle biyoseramikler osteokondral doku iskelesi yapısında kullanılmaktadırlar.

2.6.1 Doğal ve Sentetik Polimerler

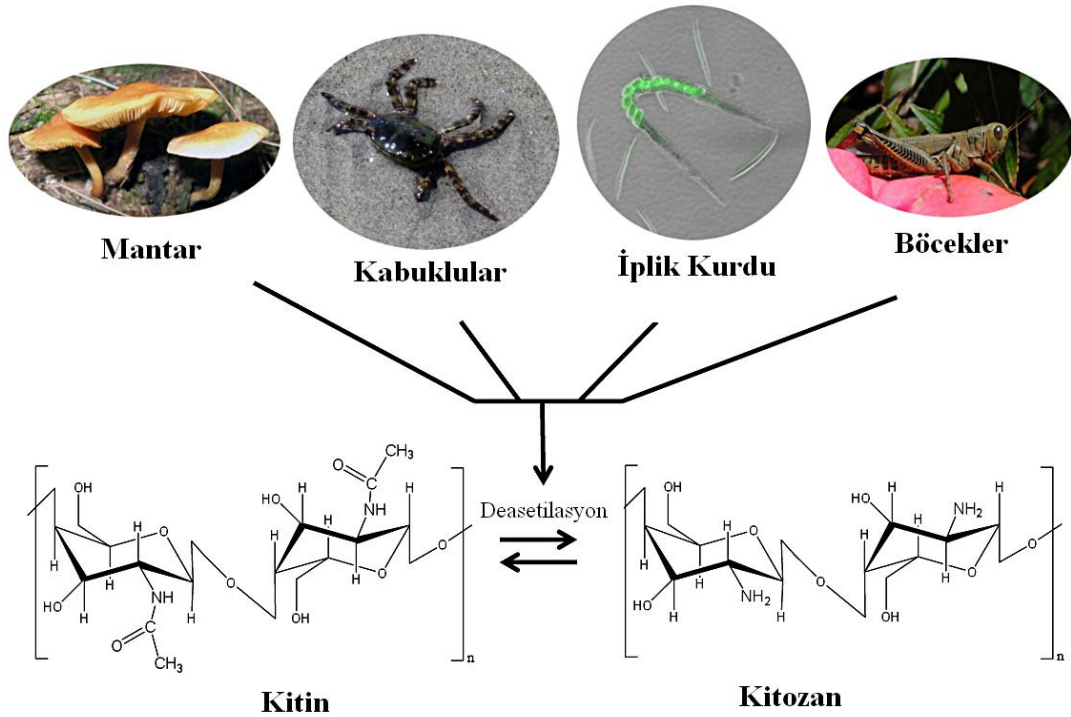
Osteokondral doku iskelesi üretiminde doğal, yarı doğal veya sentetik polimerler sıklıkla kullanılmaktadır. Sentetik polimerlerin yapılarının kontrol edilebilir olması nedeniyle istenen mekanik ve biyobozunma özelliklerine sahip polimerler üretilmektedir. Bu tip polimerlerin doğal polimerlere göre daha az toksisite ve immün reaksiyon oluşturma riski vardır. Fakat sentetik materyaller biyolojik olarak daha az geçimlidirler ve hücre doku iskelesi arasındaki iletişim daha azdır bu nedenle istenen hücre cevabı alınamamaktadır. Bozunma ürünlerinin birikmesi ve lokal bölgenin pH'sının düşmesi nedeniyle toksik ya da inflamatuvar yanıtı neden olabilmektedirler (Quaglia 2008; Kim ve ark. 2011).

Doğal polimerler ise ekonomik ve doğaya sadık olmalarının dışında biyobozunur olmaları, düşük toksisite riski taşımaları, düşük üretim ve imha maliyetleri nedeniyle tercih edilmektedirler (Mano ve ark. 2007; Quaglia 2008; Kim ve ark. 2011). Doğal polimerlerin ayrıca biyolojik makromoleküllere benzedikleri için biyolojik sinyal akışına, hücre adezyonuna ve tekrar yapılanmaya yardımcı olma gibi özellikleri de vardır (Zhang ve ark. 2010; Kim ve ark. 2011).

2.6.1.1 Kitozan

Deniz canlılarının ve kara böceklerinin kabuklarında, mantarların hücre duvarında ve iplik kurdu yumurtasında bulunan kitini doğal yollarla elde edilen polimerlere örnek verebiliriz. Kitozan kitinin deasetilasyonu (Şekil 2.2) sonucu üretilen

bir polisakkarittir ve yarı sentetik bir polimerdir (Francis Suh ve Matthew 2000; Khor ve Lim 2003, Bueter ve ark. 2013). Bilimadamları çalışmalarında kitozanı doku iskelesi geliştirmek için tek başına ya da diğer polimerlerle ve/veya biyoseramiklerle kombine bir şekilde kullanmaktadırlar. Kitozanın biyokompozit üretimi için kullanılmasının nedenleri kendine has karakteristik özelliklerinin bulunmasıdır. Bunların başlıcaları yüksek biyoadesyon kabiliyeti, yüksek delikli yapı oluşturması, biyobozunur olması, toksik olmaması, proteinlere karşı afinitelerinin olması, antitümör, antifungal ve hemostatik özelliklerinin bulunmasıdır (Alvesve Mano 2008; Kim ve ark. 2008). Bunlara ek olarak kitozanın güçlü bir yara iyileşmesini arttırıcı özelliği vardır, makrofajları aktive ederek sitokinlerin salınmasını sağlayıp enfeksiyonu engellemektedir (Costa-Pinto ve ark. 2011).



Şekil 2-2: Kitin ve kitozanın elde edildiği canlılar ve kimyasal yapıları şematik gösterilmektedir (Bueter ve ark. 2013).

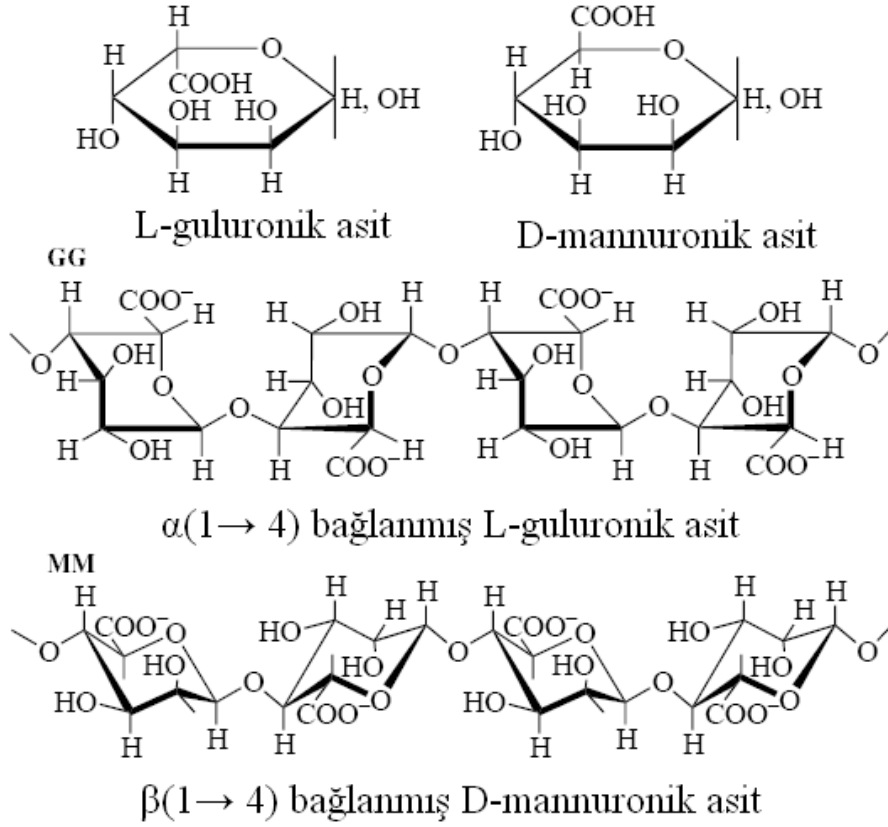
Kitozanın elde ediliş kaynağı ya da yöntemine göre molekül ağırlığı 300 kDa-1000 kDa aralığında değişir. Kitozan katı haldeyken yüksek elastik ve semi-kristalize yapıya, ve yüksek camsı geçiş sıcaklığına sahiptir (Nystrom ve ark. 1999; Martino ve

ark. 2005). Kitozan glikozamin ve N-asetilglikozamin birimlerine β (1 $\rightarrow$ 4) glikozit bağlarıyla bağlanmasıyla oluşan lineer bir polimerdir. pH 7'nin üzerinde çözünür değil iken pH 6'nın altında yapısında bulunan serbest amin grupları protonlanır ve polimer çözünür hale gelir. Kitozan yapısında üç farklı fonksiyonel grup barındırır amino grup, primer ve sekonder hidroksil grupları. Bu gruplar polimere diğer polimerlerle kopolimer oluşturma özelliği kazandırır. Yapısındaki amin grupları nedeniyle pozitif yüklüdür. Negatif yüklü polimerlerle polielektrolit kompleksi oluşturdıkları için dayanıklı kemik iskeleleri ortaya çıkarırlar. (Francis Suh ve Matthew 2000; Alvesve Mano 2008; Kim ve ark. 2008; Jayakumar ve ark. 2010).

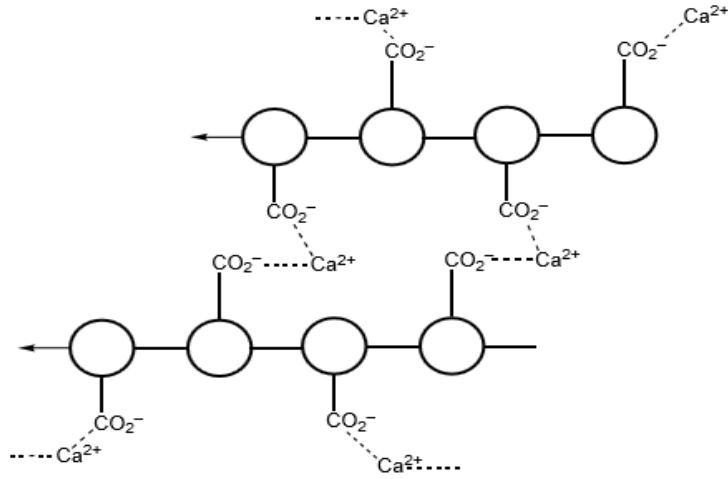
2.6.1.2 Aljinat

En çok kullanılan polisakkarit polimerlerinden bir diğeri ise aljinattır. Kahverengi deniz yosunları türlerinden elde edilen bu polimer D-mannuronik asit ve L-guluronik asitin 1 $\rightarrow$ 4 bağlanmasıyla oluşan lineer kopolimer bir yapıya sahiptir. Biyoçeyimli olması, immunojenik olması, anyonik karakterde olması ve kıvam arttırıcı özelliğinin olması aljinatın biyometaryal olarak bilim adamları tarafından kullanılmasının başlıca nedenleri arasında sayılabilmektedir. Aljinatın miktarı ve kalitesi elde edildiği türe göre değişmektedir (Rinaudo 2008). Yapısındaki D-mannuronik asit ve L-guluronik asit oranına ve blok yapılarının (Şekil 2.3) değişikliklerine göre aljinatların sulu ortam içerisindeki fiziksel özellikleri farklılık göstermektedir. Guluronik asit blokları mannuronik asit bloklarına göre daha sert bir polimer oluşmasını sağlar ayrıca guluronik asit kalsiyum iyonları ile daha etkin bağlar oluşturmaktadır (Kakita ve Kamishima 2008). Guluronik asit içeriği yüksek olan deniz yosunları türlerinden elde edilen polimerlerin daha iyi jel oluşturduğu gözlenmiştir. Jel oluşturma kapasitesi zincir uzunluğu arttıkça ve molekül ağırlığı 400–500 kDa'un üzerine çıktıkça artmaktadır. Aljinik asit ve kalsiyum tuzları suda çözünmezler fakat su içerisinde şişerler. Aljinik asitin sodyum tuzları ise suda iyi çözünürler ve yüksek molekül ağırlığına sahip olanlar viskoz ve yapışkan bir çözelti oluştururlar (Khotimchenko ve ark. 2001). Pozitif yüklü polimerlerle polielektrolit kompleksi oluşturdıkları için dayanıklı kemik iskeleleri ortaya çıkarmaktadırlar (Francis Suh ve Matthew 2000). Ayrıca kalsiyum iyonlarıyla (CaCl_2 , CaSO_4 , CaCO_3 , kalsiyum asetat ve kalsiyum askorbat) çapraz bağlanarak dayanıklı polimerik matrisler oluştururlar (Nokhodchi ve Tailor 2004). Birbirine komşu aljinat zincirleri yapısında bulunan

glukuronik asit bloklarına ait karboksi gruplarıyla kalsiyum iyonları iyonik etkileşime girer ve dayanıklı üç boyutlu ağlar oluştururlar (Şekil 2.4) (Kuo ve Ma 2007; Saari ve ark 2011).



Şekil 2-3: Aljinik asitin polimerik bloklarının yapısı (Khotimchenko ve ark. 2001).



Şekil 2-4: Çapraz bağlanmış aljinatın şematik gösterimi.

2.6.2 Biyoseramikler

Biyoseramikler zarar görmüş veya işlevini yitirmiş kemik dokusunun tedavi edilmesi, yeniden oluşturulması ya da yerine geçmesi için geliştirilen özel tasarımlı biyomateriyallerdir (Thamaraiselvi ve Rajeswari 2004). Biyoseramiklerin kimyasal yapısı doğal kemik yapısına benzemektedir ve hastanın kendi kemik dokusu ile bağlanmayı sağlamaktadırlar ve yüksek biyouyumluluğa sahiptirler. Biyoseramik maddeler ayrıca tedavi etmek, sürdürülebilirliği sağlamak, tekrar yapılanmayı sağlamak ve mevcut durumu iyileştirmek için dokulara biyolojik olarak aktif maddelerin salınması için de dizayn edilebilmektedirler (Vallet-Regí ve Ruiz-Hernández 2011). Bu materyaller ilaçların, nükleik asitlerin, hormonların ve büyüme faktörlerinin kontrollü salım çalışmalarında yer almaktadır. Biyoseramikler gözenekli ve yoğun formda, toz, granül ve kaplama materyali şeklinde üretilmektedirler. Bu yapılar seramik çeşidine ve doku etkileşimi sonucu verdiği cevaba göre biyoinert, biyoaktif ve biyobozunur olarak kategorize edilirler (Colilla ve ark. 2008). Biyoinert seramikler, inert yapıda olan ve oksijen iyonlarının oluşturduğu düzlemde metal iyonlarının dağılmasıyla oluşan polikristalin seramiklerdir. İki önemli türü mevcuttur; alümina (Al_2O_3) ve zirkonya (ZrO_2). Bu tip biyoseramiklerin vücuda yerleştirildiklerinde reaksiyon geliştirdikleri ortaya çıkmıştır. Bu nedenle, araştırmacılar daha çok biyobozunan ve biyoaktif biyoseramikler üzerine yoğunlaşmışlardır (Castner ve Ratner 2002; Thamaraiselvi ve Rajeswari 2004). Biyobozunan seramikler zamanla bozunarak doku ile yer

değiştirmektedir. Trikalsiyum fosfat biyobozunan ve biyoaktif bir seramiktir. Biyoaktif biyoseramikler ise fizyolojik sıvılarla reaksiyona girip ara yüzey fazda biyomateryal ile kemik arasında güçlü bağlar oluştururlar. Bu bağlanma sonucu kemik mineral fazına eş değer biyolojik olarak aktif karbonat apatit oluşmaktadır. Biyoaktif seramikler biyoaktif camlar ve cam seramikler ile kalsiyum fosfatlar olmak üzere iki genel gruba ayrılırlar (Rezwan ve ark. 2006).

2.6.2.1 Biyo Camlar ve Cam Seramikler

İlk olarak biyoaktif camların biyoyumluluk ve kemik bağlama kapasiteleri 1969 yılında keşfedilmiş ve 45S5 Bioglass® isimli ticari ürün piyasaya sürülmüştür. Bu camların implantasyonu sonrasında yüzeyinde özel bir reaksiyon gerçekleşmekte ve kristalize hidroksiapatit oluşmaktadır. Bu durum implantı çevreleyen dokular ile implant arasında güçlü bir bağ oluşturmaktadır. Yapılarında SiO_2 , Na_2O , CaO ve P_2O_5 gibi bileşikler taşıyan bu biyomalzemeler osteojenik genin aktive olmasını ve damar yapısının tekrar oluşmasını sağlayan Si, Ca, P ve Na gibi iyonları o bölgeye salmaktadırlar. Kimyasal yapılarının kontrol edilebilir olmaları nedeniyle biyobozunurluk hızlarının önceden ayarlanabilmesi en önemli avantajlarından. Mekanik dayanıklılıklarının düşük olması ve kırılgan bir yapıya sahip olmaları ise dezavantajları arasında sayılabilir (Kenny ve ark. 2003; Rahaman ve ark. 2006; Rezwan ve ark. 2006; Fu ve ark. 2011). Biyoaktif cam seramikler ise iki farklı kristal yapıya sahip mika ve apatitden oluşmaktadırlar. Mekanik özelliklerinin ve biyoyumluluklarının iyi, biyoaktivitelerinin yüksek olması ve tokisite göstermemeleri gibi üstünlükleri bulunmaktadır (James 1995; Rahaman ve ark. 2006; Abou Neel ve ark. 2009).

2.6.2.2 Kalsiyum Fosfatlar

Biyoaktif biyoseramiklerin en çok kullanılan diğer bir grubu ise kalsiyum fosfatlardır. Doğal kemik dokusunun yapısının % 60'ını hidroksiapatit $[\text{Ca}_{10}(\text{PO}_4)_6(\text{OH})_2]$ oluşturmaktadır. Bu nedenle günümüzde araştırmacılar kemik doku iskelesi geliştirme çalışmalarında kalsiyum fosfat bileşikleri üzerine yoğunlaşmışlardır (Rezwan ve ark. 2006). Kalsiyum fosfatların kimyasal ve kristal yapıları kemiğe benzer yapıdadır ve kemikle biyoyumluluk gösterirler. Çok çeşitli kalsiyum fosfat türleri vardır, Tablo 2.1'de Ca/P oranlarıyla birlikte en çok kullanılanları gösterilmektedir.

Tablo 2-1: Ca/P oranları, kimyasal formülleri ve farklı kalsiyum fosfat türevlerinin kimyasal adları (Felício ve Laranjeira 2000).

Ca/P	Formül	Kimyasal Adı
0,5	$\text{Ca}(\text{H}_2\text{PO}_4)_2 \cdot \text{H}_2\text{O}$	Monokalsiyum fosfat monohidrat
1	$\text{Ca}(\text{HPO}_4) \cdot \text{H}_2\text{O}$	Kalsiyum fosfat dihidrat
1	CaHPO_4	Kalsiyum fosfat (susuz)
1,33	$\text{Ca}_4\text{H}_2(\text{PO}_4)_3 \cdot 2,5\text{H}_2\text{O}$	Oktakalsiyum fosfat
1,5	$\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$	Trikalsiyum fosfat (TCP)
1,67	$\text{Ca}_{10}(\text{PO}_4)_6(\text{OH})_2$	Hidroksiapatit
2	$\text{CaO} \cdot \text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$	Tetrakalsiyum fosfat monoksit

Hidroksiapatit kristalleri doğal kemik ekstraselüler matrisinde bulunduğu için en çok kullanılan kalsiyum fosfat seramiklerinden biridir. Hidroksiapatit (HA) ile üretilmiş farklı dansitede, poröz yapıda, büyüklükte ve mekanik özelliklerde üretilmiş birçok biyomateryal bulunmaktadır (Szpalski ve ark. 2011). Bu materyaller güçlü osteokondaktif özellikte olmasına rağmen düşük osteojenik aktivite göstermektedir. Literatürde geliştirilen yapay doku iskelelerinin üzerine hücre ekilebilmesi ya da hastanın kendi hücrelerinin yapıya göç edebilmesi için gözenek büyüklüğünün yaklaşık 100 µm olması gerektiği rapor edilmiştir (Wang ve Ni 2003). Tek başına hidroksiapatit kullanıldığında kırılğan, yavaş biyobozunur ve yüksek erime derecesine sahip kemik doku iskeleleri oluşmaktadır. Bu nedenle daha çok polimerle kombine biyokompozit yapılar üzerine çalışılmaktadır. Diğer çok bilinen dezavantajları ise besin iletimini sağlayamadıkları için HA ile oluşturulan yapılar içerisinde hücrelerin yaşam sürelerinin kısa olduğudur.

Yapılarının kemik mineral fazına benzerliklerinden dolayı *in vivo* ilk olarak β -trikalsiyum fosfat (β -TCP) ile üretilmiş kemik doku iskeleleri kullanılmıştır (Barrere ve ark. 2006). β -TCP ile hazırlanmış doku iskelelerinin güçlü osteokondaktif etkileri ve osteojenik aktiviteleri olduğu, sıkıştırma ve gerilme direnci kuvvetlerinin doğal kansallöz kemikle benzer olduğu ispatlanmıştır (Lu ve Zreiqat 2010). β -TCP ile oluşturulmuş iskelelerin kafatasındaki, mandibular bölgedeki, tibiadaki, femurdaki ve radyal hasarların tedavi edilmesine yardımcı olduğu birçok hayvan deneyi ile gösterilmiştir (Hing ve ark. 2007; Walsh ve ark. 2008; Jacobson ve ark. 2010; Nienhuijs ve 2010; Zhao ve ark 2010; Venkata ve ark. 2014). Bunlara ek olarak insanlardan çıkarılmış kemik tümörlerinin yerini doldurması için β -TCP'li doku iskeleleri kullanılmaktadır (Szpalski ve ark. 2011). Son yapılan çalışmalarda β -TCP'nin adipoz doku kök hücrelerinin osteoblastik hücrelere farklılaşmasını indüklediği gözlenmiştir (Liu ve ark 2008). Ayrıca kemik iyileşmesi ve tekrar yapılanması için kilit olaylardan biri olan anjiogenezi arttırdığı ortaya çıkmıştır (Okuda ve ark. 2010). Kemik iyileşme sürecinde doğal mineral presipitasyonu ve kemik oluşması ekstraselüler fosfat ve kalsiyum konsantrasyonuna bağlıdır bu nedenler β -TCP gibi kalsiyum fosfat türevlerinin kemik doku geliştirme çalışmalarında neden bu kadar fazla yer aldığını açıklamaktadır (Szpalski ve ark. 2011).

2.7 Osteokondral Doku İskelesi Fabrikasyon Yöntemleri

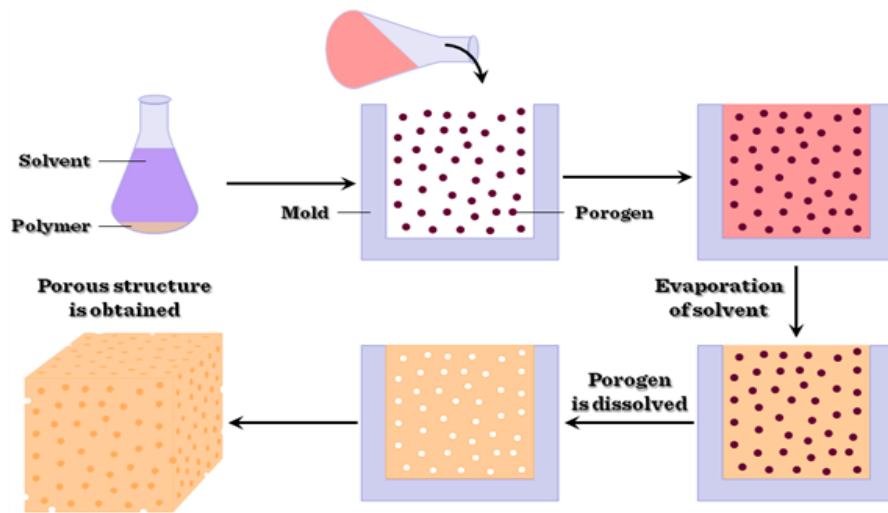
Hücreler ve ekstraselüler matris üç boyutlu (3D) yapıda organize olup organları oluşturmaktadır. Bu nedenle hücrelerin büyümeleri ve dokunun tekrar yapılanması için yapay doku iskelesinin üç boyutlu olması gerekmektedir. Kemik dokularının yapısı vücudun bulundukları bölgesine göre farklılık göstermektedir. Bu yüzden oluşacak doku iskelesinin yapısı, uygun biyomateryalin seçimine, üretim tekniğine uygulanacak bölgenin anatomik yapısına ve mekanik yüküne bağlı olarak değişmektedir. Bunlara ek olarak hastada oluşmuş hasarın geometrik yapısına görede fabrikasyon teknolojileri farklılık gösterebilmektedir. Ayrıca doku iskelelerinin biyobozunma hızı yeni oluşan dokunun gelişme ve iyileşme hızıyla aynı olmalıdır. Doku iskelesi fabrikasyon yöntemleri geleneksel yöntemler ve serbest katı hal yöntemleri şeklinde 2 grup altında incelenmektedir (Thavornyutikarn ve ark 2014).

2.7.1 Geleneksel Yöntemler

Biyoemilir ve biyoçözünür materyallerin 3D fabrikasyon yöntemleri çeşitlilik göstermektedir, bunların en çok kullanılanları ise geleneksel yöntemlerdir. Geleneksel yöntemlerle elde edilen doku iskelesi fiber veya sünger yapıda olabilir. Sünger yapısındaki içsel bağlantılı gözeneklere sahip 3 boyutlu doku iskeleleri çözücü dökümü ve çözücü dökümü/parçacık uzaklaştırma, gaz köpüklendirme, eriyik kalıplama, faz ayrımı ve dondurarak kurutma gibi yöntemler ile üretilmektedir. Fiber yapıda olan doku iskeleleri ise tekstil teknolojileri, fiber bağlama ve elektro-eğirme gibi yöntemler ile elde edilmektedir (Gerçek Beşkardeş 2008).

2.7.1.1 Çözücü Dökümü/Parçacık Uzaklaştırma

Bu yöntemde polimer çözeltisi spesifik çaptaki porojen adı verilen katı parçacıklar (tuz, jelatin, parafin gibi) ile karıştırılmaktadır. Daha sonra çözücü uzaklaştırılır geriye katı polimere gömülmüş porojen parçacıkları kalmaktadır. Bu kompozit porojenin içerisinde çözünbileceği çözücünün içerisine daldırılır ve porojen parçacıkları yapıdan uzaklaştırılır böylece gözenekli katı polimerik yapıda doku iskelesi elde edilir (Şekil 2.5) (Gerçek Beşkardeş 2008; Zhu ve Chen 2013). Bu yöntemle % 93'den yüksek gözenekliliğe sahip ortalama delik çapı 500 μm den fazla olan doku iskeleleri oluşmaktadır. Dezavantajları ise polimer/porojen kalın dökülürse çözücünün uzaklaşması zorlaşmaktadır bu nedenle bu teknikle sadece 3 mm kalınlıkta ince membranlar üretilmektedir (Mikos ve ark. 1996).



Şekil 2-5: Çözücü dökümü/parçacık uzaklaştırma tekniğinin şematik gösterimi (Bartis ve Pongrácz 2011).

2.7.1.2 Gaz Köpüklendirme

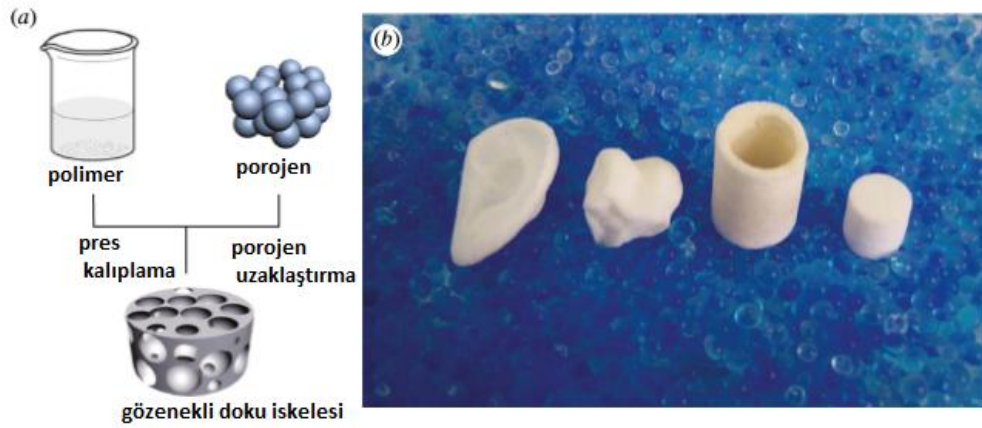
Gaz köpüklendirme tekniğinde kalıba dökülmüş biobozunabilen polimer üzerine CO₂, nitrojen, su ya da floroform gibi gaz köpüklendirme ajanları ile bu polimer doygun hale gelene kadar yüksek basınç uygulanır (Parks ve Beckman 1996; Quirk ve ark. 2004; Di Maio ve ark. 2005). Bu işlem sonucunda polimer içerisinde 100 ile 500 µm aralıkta çaplarda gaz kabarcıkları oluşur. Bu tekniğin avantajı organik çözücünün kullanılmamasıdır. Büyük içsel bağlantılı olmayan gözeneklerin ve gözeneksiz dış fazın oluşması bu yöntemin tercih edilmeme nedenlerindendir (Di Maio ve ark. 2005; Chatterjee ve ark. 2012).

2.7.1.3 Eriyik Kalıplama

Eriyik kalıplama tekniğinde istenilen geometriye sahip kalıbın içerisine porojen parçacıkları ve polimer doldurulduktan sonra kalıbın sıcaklığı polimerin camsı geçiş sıcaklığının üstüne çıkıncaya kadar ısıtılmaktadır. Bu yöntemle polimerler eriyerek birbirine bağlanmaktadır. Kalıp çıkartılınca porojen parçacıkları uzaklaştırılıp gözenekli iskele kurutulmaktadır. Uygulanan bu üretim şekliyle iskelenin morfolojisi ve şekli kontrol edilebilmektedir. Yüksek sıcaklıklar gerektirdiği için biyoaktif maddelerin doku iskelelerinin içerisine dahil etmek için uygun bir yöntem olmamaktadır. Ayrıca porojen kalıntı riski de bulunmaktadır.

2.7.1.4 Oda Sıcaklığında Sıkıştırarak (Pres) Kalıplama

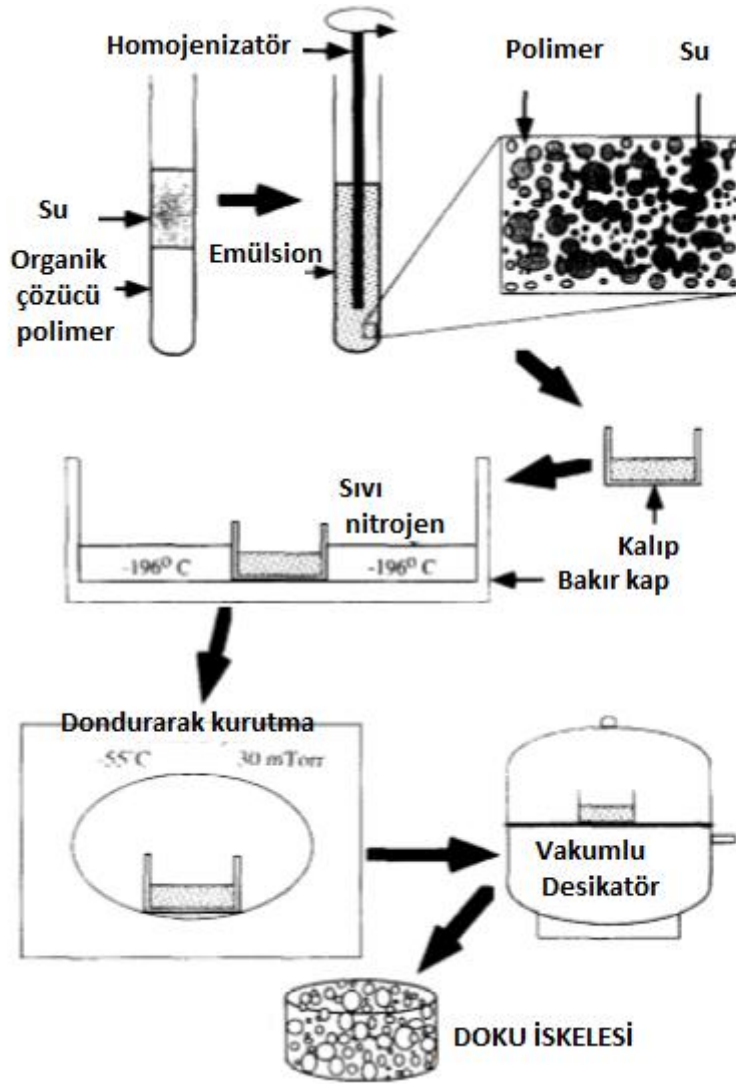
Oda sıcaklığında sıkıştırarak kalıplama, eriyik kalıplama yöntemindeki, biyoaktif madde hapsedilmiş doku iskelelerinin üretilmemesi probleminin aşılması için geliştirilmiştir. Bu yöntem için düşük sıcaklık ve basınç ayrıca, polimeri çözecek organik çözücü ve porojen partiküllerini çözecek inorganik çözücü (su) gerekmektedir. Oluşan gözenekler çözücüler uçurulduktan sonra küçülebilir bu da tolere edilebilir bir küçülmedir (Pan ve Din 2012). Şekil 2.6'da oda sıcaklığında sıkıştırarak kalıplama yöntemiyle üretilmiş doku iskeleleri gösterilmektedir.



Şekil 2-6: (a) Oda sıcaklığında sıkıştırarak kalıplama yöntemi şematik gösterilmektedir. (b) Bu yöntemle oluşan gözenekli doku iskelelerinin fotoğrafı gösterilmektedir (Pan ve Din 2012).

2.7.1.5 Faz Ayrımı/Emülsifikasyon

Faz ayrımı emülsifikasyon/dondurarak kurutma ve sıvı-sıvı faz ayrımı şeklinde 2 farklı yöntem izlenerek gerçekleştirilebilmektedir. İlk metotda emülsiyonu oluşturmak için polimer organik çözücü içerisinde çözüldükten sonra ortama su eklenmektedir. Oluşan su/polimer karışımı kalıba dökülür ve sıvı azot yardımıyla soğutulduktan sonra çözücülerini uzaklaştırmak için dondurularak kurutma uygulanmaktadır (Şekil 2.7). Bu işlem sonucunda yüksek gözenekliliğe sahip süngerimsi yapılar oluşmaktadır. Sıvı-sıvı faz ayrımında ise polimer çözeltisini soğutma işleminden sonra polimerce zengin ve polimerce yoksul faz şeklinde iki ayrı faz oluşmaktadır. Çözücü ortamdan uzaklaştırılınca yüksek gözenekli polimerik doku iskelesi oluşmaktadır. Bu yöntemle polimer konsantrasyonu, soğutma sıcaklığı ve oranı kontrol edilerek makro ya da mikro boyutta gözeneklere sahip süngerimsi yapılar hazırlanabilmektedir. Düşük sıcaklıklarda hazırlandıkları için biyoaktif maddeler için uygun bir yöntemdir (Whang ve ark. 1995; Nam ve Park 1999; Mikos ve Temenoff 2000; Zhu ve Chen 2013).

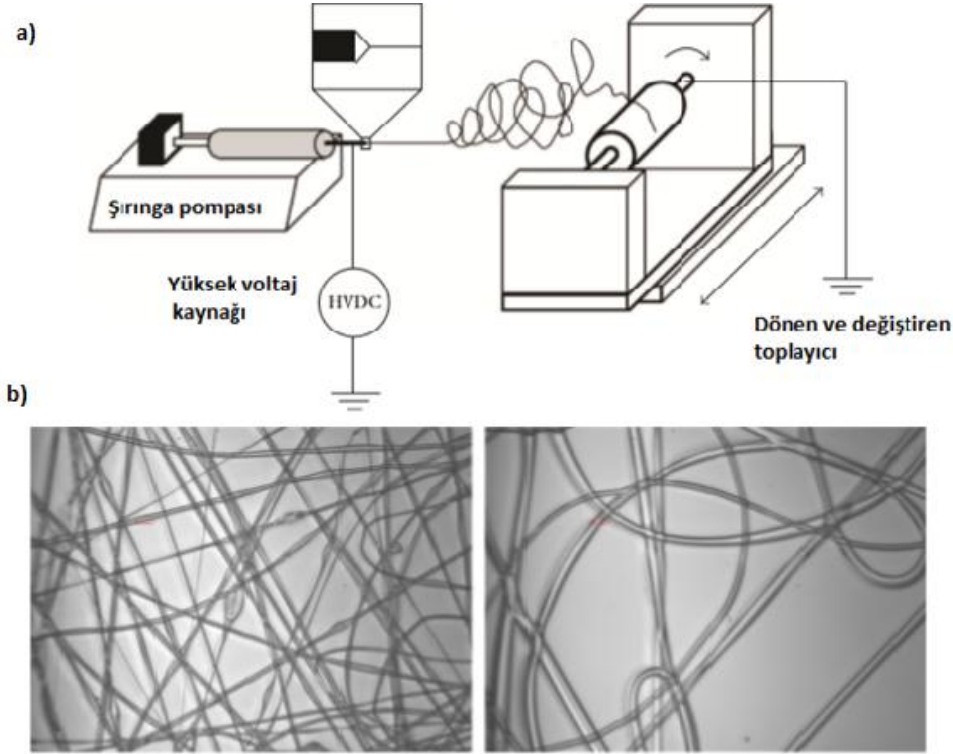


Şekil 2-7: Faz ayrımı emülsifikasyon/dondurarak kurutma işleminin şematik gösterimi (Whang ve ark. 1995).

2.7.1.6 Tekstil teknolojileri (Elektrospinning)

Tekstil teknolojileri çok çeşitli süreçleri içeren elektrik yükünden yararlanılarak polimerlerden örülmüş doku iskelelerinin üretimi için kullanılmaktadır. Bu yöntemi gerçekleştirmek için kullanılan düzende polimerik materyalleri içeren şırınga pompası, yüksek elektriksel alan yaratan ve dönme hareketini sağlayan yüksek voltaj kaynağı ve oluşan fiberleri toplayan bir toplayıcı bulunmaktadır (Sill ve von Recum 2008; Kim ve ark. 2010). Bu düzende Şekil 2.8’de gösterilmiştir. Uygulanan elektriksel kuvvetler çözücünün uçmasına ve polimerin yapıdan ayrılmasına neden olmaktadır. Oluşan fiber formu polimerik yapılara istenilen şekil verilebilmektedir. Polimerin

yapısı, süreç parametreleri ve çevresel faktörler oluşan fiberlerin morfolojisini değiştiren önemli etkenlerdir (Jain 2006; Zhu ve Chen 2013). Bu yöntem ile doğal ya da sentetik polimerler kullanılarak 2 nm'den çeşitli mikrometrelere kadar farklı boyutlarda fiber yapıda yüksek yüzey alanına sahip doku iskeleleri üretilebilmektedir (Zhu ve Chen 2013).

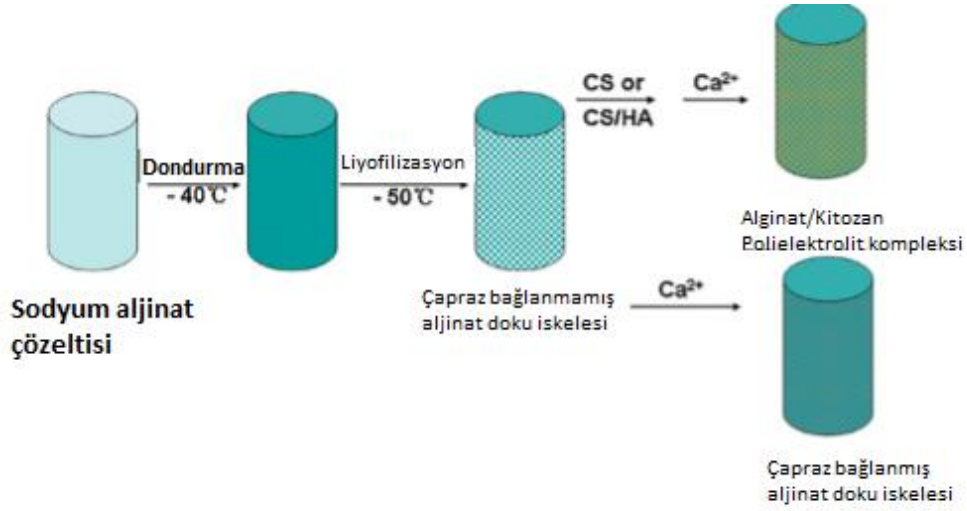


Şekil 2-8: a) Elektrosprining düzeniğinin şeması. b) Elektrosprining teknolojisi ile üretilmiş farklı konsantrasyonlarda polimer içeren fiberlerin görüntüleri (Sill ve von Recum 2008).

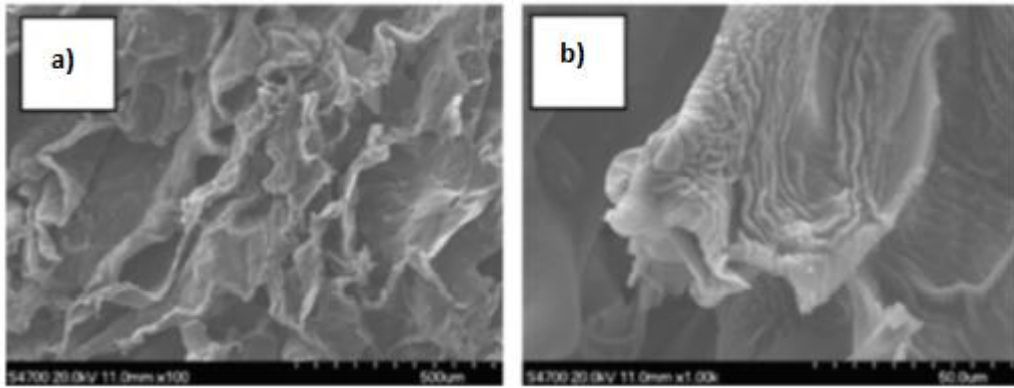
2.7.1.7 Dondurarak Kurutma

Dondurarak kurutma, çözeltileri kararlı katı materyallere çevirmesi nedeniyle gıda bilminde, ilaç teknolojisinde ve enzim stabilitesi için kullanılan yaygın bir yöntemdir. Dondurarak kurutma işlemi temel olarak üç adımdan oluşur; çözelti düşük sıcaklıklarda (ötektik sıcaklığın veya camsı geçiş sıcaklığının altına düşecek şekilde) dondurulur; donmuş örnek vakum yardımıyla basıncın düşürüldüğü (düşük milibarlara) kabinin içerisine yerleştirilir ve düşük sıcaklıklarda (-80 °C), vakum altında çalıştırılan cihaz donmuş olan çözücünün içerisindeki buz kristallinin süblimleşmesini sağlar buna birincil kurutma işlemi denmektedir; materyal içerisindeki donmamış suyun

uzaklaştırılma işlemine de ikincil kurutma işlemi denmektedir. Son 20 yıldır bu yöntem üç boyutlu doku iskeleleri geliştirme çalışmalarında yer almaktadır. Polimer su içerisinde çözülür çözelti dondurularak polimerlerin arasında buz kristalleri oluşur oluşan kristaller süblimleşir ve polimer gözenekli delikli katı hal alır (Huang ve ark. 2005). Faz ayrımı/emülsifikasyon tekniğinde ise organik çözücünde hidrofobik polimer çözülür ve sıvı kristallerinin oluşması ve gözenekli bir doku iskelesi oluşturması için ortama su eklenmektedir. Dondurarak kurutma yönteminde, uygulanan ilk basamaktaki donma sıcaklığı ve süresi, uygulanan işlem süresi, kabin sıcaklığı, basıncı ve doluluğu, örneğin hacmi, polimerin yapısı gibi parametreler oluşan doku iskelesinin gözenek büyüklüğünü ve dağılımını etkilemektedir. Bu yöntemle sünger yapısındaki içsel bağlantılı gözeneklere sahip 3 boyutlu doku iskeleleri üretilmektedir. Han ve arkadaşlarının yapmış olduğu bir çalışmada dondurarak kurutma yöntemini kullanarak kitozan, aljinat ve HA doku iskeleleri hazırlamışlardır (Şekil 2.9-10). Bu çalışma sonucunda çapraz bağlanmamış olanların % 90, çapraz bağlanmış olanların ise % 70 gözenekliliğe sahip doku iskeleleri geliştirilmiştir (Han ve ark. 2010). Tampieri ve ark. yaptığı çalışmada ise biyomimetik üç tabakalı osteokondral dokuyu taklit eden doku iskelesi geliştirilmiştir. Doğal kemik ve kıkırdak dokusunda bulunan kollajen ve kemik yapısında bulunan hidroksiapatit biyomateryal olarak kullanılmış ve dondurarak kurutma işlemi ise üretim tekniği olarak seçilmiştir (Tampieri ve ark. 2008; Kon ve ark. 2010). Oluşan bu ürün Maiorogen® isimli ticari preparat olarak piyasaya sürülmüştür ve günümüzde ülkemiz dahil bir çok ülkede cerrahlar tarafında osteokondral hasarlı hastalara implante edilmektedir.



Şekil 2-9: Dondurarak kurutma işlemi uygulanmış bir çalışmanın şematik gösterimi. CS; kitozan, HA; hidroksiapatit (Han ve ark. 2010).

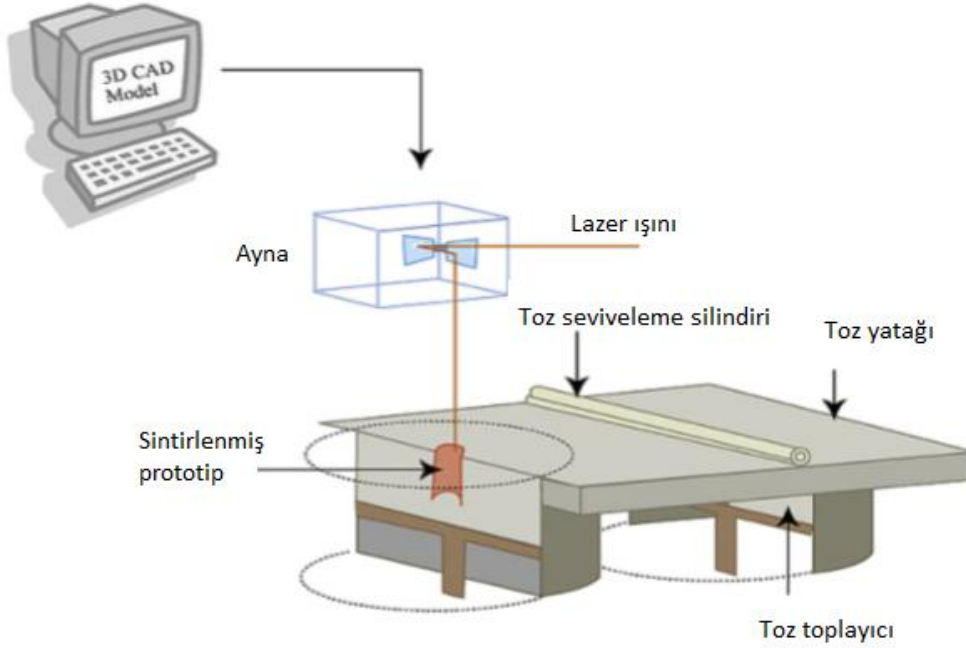


Şekil 2-10: Han ve arkadaşlarının yaptığı bir çalışmadan alınmış doku iskelelerinin SEM görüntüleri (Han ve ark. 2010).

2.7.2 Serbest Katı Hal Yöntemleri

Bilgisayar destekli tasarım (Computer aided design, CAD) (Şekil 2.11), bilgisayarlı tomografi ve manyetik rezonans görüntüleme verileri gibi bir çok bilgisayar destekli teknik serbest katı hal yöntemleri altında toplanmaktadır. Bu tekniklerle doku iskelesinin dizaynı yapıp katman katman üretimi yapılabilmektedir. Oluşan doku iskelesinin yapısı kontrol edilebilmektedir, istenilen boyutta gözenekliliğe sahip ve istenilen geometrik şekilde ve yapıda iskeleler bu yöntemlerle üretilebilmektedir. Isı, ışık, yapıştırıcı ve kalıp kullanarak üretime dayanan birçok serbest katı hal yöntemi bulunmaktadır. Tabakalı nesne imalat metodu, seçici lazer sinterleme (Lee ve ark.

2007), ergiterek malzeme yığma (Yen ve ark. 2009), üç boyutlu baskı (Bose ve ark. 2013) ve hızlı prototipleme (Park ve ark. 2012) yöntemleri gibi birbirinden farklı tekniği serbest katı hal yöntemleri içerisinde sayabilmekteyiz (Bourell ve ark. 1990; Hutmacher ve ark. 2004). Bu yöntemler daha çok mühendislerin uyguladığı ileri teknoloji gerektiren ve pahalı uygulamalardır.



Şekil 2-11: Serbest katı hal yönteminin şematik gösterimi (Thavornyutikarn ve ark. 2014).

2.8 Biyokompozitlerin Sterilizasyonu

Sterilizasyon bir ürünü kontamine eden tüm mikroorganizmaların (vejetatif, spor şekilleri dahil) ve virüslerin öldürülme veya uzaklaştırılma işlemidir (Dortunç, 2004). Sterilizasyon tekniği bazen oluşturulan biyomateriyalin yapısını değiştirmekte ve toksik yan ürünler açığa çıkarabilmektedir. Uygun teknik ve yeterli sürede sterilizasyon yapılmadığında ise hastaya uygulanan materyal enfeksiyona yol açılabilmektedir (Nag ve Banerjee 2012). Günümüzde uygulanan birçok sterilizasyon tekniği bulunmaktadır. Bu teknikler kullanılacak olan polimerin ya da biyoseramiğin yapısına göre tercih edilmektedirler. Aseptik ortamda üretim, buhar, kuru ısı, gama ışınları, ultraviyole (UV) ışınları ve etilen oksit sterilizasyon teknikleri biyometaryallerin sterilizasyonu için en çok kullanılan yöntem olmaktadır. Fiziksel teknik olan otoklavla sterilizasyonda

biyomateryal 121°C, 18 psi, 18 dk buhar basıncına maruz bırakılmaktadır. Kuru ısı sterilizasyonundan daha iyi ısı transferi yaptığı için tercih edilmektedirler. Isı ile sterilizasyon yöntemleri tamamen biyoseramikten oluşan implantlar için kullanılmaktadır. Örneğin Habibovic ve ark. (2008) yaptıkları çalışmada biyoseramikle hazırladıkları implant materyalini buharla sterilizasyon tekniğini kullanarak otoklavda sterilizasyon yapmışlardır. Polimerik materyallerin sterilizasyonunda ısı ile sterilizasyon yöntemleri polimerin yapısında değişiklik yapması nedeniyle tavsiye edilmemektedir (Premnath ve ark. 1996).

UV sterilizasyonu da aynı şekilde yüzey sterilizasyonu için en çok kullanılan yöntemler arasında yer almaktadır. Bu yöntem kısa dalga boylarında yüksek enerji yoğunluğuyla, 280-100 nm, timin dimerleri oluşturup DNA replikasyonunu önleyerek bakterilerin eliminasyonunu sağlamaktadır. Riley ve ark. (2005) düşük enerji yoğunluğuyla bile titanyumdan oluşan dental implantın sterilizasyonunun gerçekleştirilebileceğini rapor etmişlerdir. En çok kullanılan bir diğer yöntem ise etilen oksit gazı ile yapılan sterilizasyon tekniğidir. Etilen oksit sterilizasyonu polimerik materyallerde ve ısıya duyarlı materyallerde kullanılmaktadır. Griffon ve ark. (2006) kitozanla oluşturdukları doku iskelesinin sterilizasyonunu etilen oksitle yapmışlardır. Toksik artık bırakma riskleri bulunmaktadır. Gamma ışınlarıyla sterilizasyon biyomateryal ve medikal ürünlerin sterilizasyonu için en güvenilir tekniklerden biri sayılmaktadır. Bu sterilizasyon tekniğinde iyonize yüksek enerji mikroorganizma DNA'sına zarar vererek sterilizasyonu gerçekleştirmektedir ve toksik artık bırakmamaktadır. Yüksek penetrasyon özelliği nedeniyle sıkıca paketlenmiş materyaller için uygun görülmektedir. Kullanılacak polimerin cinsine göre sterilizasyon tekniğinin güvenilirliği değişmektedir. Örneğin Draget ve ark (1997) aljinatın gama ışınlarıyla yapılan sterilizasyonu sonucu serbest radikallerin meydana geleceğini ve felakete yol açabileceğini rapor etmişlerdir.

2.9 Kemik/Kıkırdak Doku İskelelerinde Yapılan Kontroller

Osteokondral doku iskelesinin biyoyumluluğunun tayin edilebilmesi için bir takım fizikokimyasal ve biyolojik testlerin yapılması gerekmektedir.

2.9.1 Biyobozunma

Doku iskelesinin zamanla bozunup vücudun kendi hücrelerinin ve yapılarının iskelenin yerine geçmesi beklenmektedir. Hasarlı dokunun yeni dokuyla yer değiştirme hızı ile iskelenin bozunma hızının benzer olması istenmektedir. Ayrıca iskelenin yapısı bozunurken ekstraselüler matriksin tekrar yapılanmasına da izin vermeleri beklenmektedir. İskelenin yan ürünleri toksik ve immünolojik reaksiyonlara neden olmamalıdır. Bu nedenlerden dolayı doku iskelelerinin geliştirme çalışmalarında biyobozunma testleri yapılmaktadır. Yapılan bir çalışmada *in vivo* biyobozunmadan sorumlu birincil enzim olan lizozim kullanılmıştır. Vücutta dolaşan lizozim konsantrasyonuyla aynı 10000 U/L lizozim bulunan fosfat tampon çözeltisi içerisine vücut sıcaklığında doku iskeleleri koyulmuş ve çeşitli saatlerde bozunma hızları incelenmiştir (Sowjanya ve ark. 2013).

2.9.2 Gözenek Yapısı

Fizikokimyasal testlerden gözenek yapısının incelenmesi çok önemlidir çünkü doğal kemik ve kıkırdak dokusu içsel bağlantılı gözeneklere sahiptir. Hücrelerin iskelenin yüzeyine tutunması içerisine doğru ilerleyebilmesi ve çoğalıp farklılaşabilmesi için geliştirilen doku iskelesinin gözenekli bir yapıya sahip olması gerekmektedir. Örneğin kemik gelişmesi için optimum gözenek boyutu 75 µm ile 250 µm arasında değişmektedir, fibro-kıkırdak için ise 200µm ile 300µm arasında değişmektedir (Cheung ve ark. 2007). Gözenekliliğin karakterizasyonu için en çok taramalı elektron mikroskobu, ışık mikroskobu gibi görüntüleme teknikleri kullanılmaktadır. Sherwooda ve ark. (2002) PLGA/PLA ve TCP ile oluşturdukları doku iskelelerinin gözeneklerinin karakterizasyonu SEM ile gerçekleştirilmiştir. Görüntüleme tekniklerinin dışında sıvı yer değiştirme metoduyla doku iskelelerin gözenekliliği incelenebilmektedir. Yapılan bir çalışmada kitozan, aljinat ve hidroksiapatit ile geliştirilen doku iskelelerinin yüzde gözenekliliklerini sıvı yer değiştirme metodunu kullanarak araştırmışlardır. Etanol içerisine konulan doku iskeleleri doymuş hale gelene kadar bekletildikten sonra tartılmıştır. Doku iskelesinin ilk kuru ağırlığı ve etanole doymuş ağırlığından hareketle iskelenin gözenekliliğini hesaplamışlardır (Han ve ark. 2010).

2.9.3 Mekanik Dayanıklılık Testleri

Gözenekliliğin dışında doku iskelesinin geçici fiziksel destek sağlayabilmesi için iyi bir mekanik özelliğe sahip olması gerekmektedir ve bu özelliklerini tekrar yapılanma sürecinin sonuna kadar koruyabilmelidir. Bazı çalışmalarda mekanik özelliği sağlayabilmek için istenen gözenekli yapı elde edilememektedir. İstenen gözeneklilik özelliklerin sağlanmaması damarlanmaya engel olmaktadır. Bu nedenle gerekli olan mekanik özellikler ve gözeneklilik yapısının dengede olması gerekmektedir. Mekanik özelliklerin karakterizasyonu için ise gerilim dayanıklılığı ve sıkıştırma testleri yapılmaktadır. Sowjanya ve ark. (2013) doku iskelelerinin karakterizasyonunu sıkıştırma testi ile sıkıştırma gerilimi ve young modül değerlerini hesaplayarak yapmışlardır. Diğer bir çalışmada ise çekme deneyi ile doku iskelelerinin mekanik özellikleri incelenmiştir (Lee ve ark. 2011).

2.9.4 Biyouyumluluk

Doku iskelesinin hasarlı bölgeye implantasyonu sonrasında lokal inflamasyon başlamaktadır. Kızarıklık, şişlik, ağrı ve ateş inflamasyonun erken tanısıdır ve enfeksiyona karşı savaş açıldığının göstergeleridir. Nötrofillerin, eozinofillerin, makrofajların ve yabancı cisim dev hücrelerinin hasarlı bölgeye gelmesiyle savunma mekanizması harekete geçmektedir. Bu hücrelerin en önemli görevi ölü hücreleri ve doku iskelesi parçalarının fagozite edilmesini sağlamaktır. Makrofajlar hasarlı dokunun iyileşme sürecini başlatarak granülasyon dokusu oluşmasını sağlamaktadırlar. Granülasyon dokusu implantın etrafını sararken yabancı cisim dev hücreleri implantın yüzeyine yapışırlar. Eğer bu hücreler doku iskelesini fagosite edemezlerse yabancı cisim implantı tamamen izole etmek için fibröz doku kapsül şeklinde implantın etrafını sarar. Biyomateryalin büyüklüğüne, şekline ve kimyasal-fiziksel özelliklerine bağlı olarak inflamasyonun şiddeti, süresi ve defektin iyileşme süresi değişebilmektedir. İmplantın başarılı olabilmesi için uygulanan biyomateryalin biyouyumlu olması gerekmektedir. Biyouyumluluk bir materyalin uygulandığı bölgede uygun biyolojik cevabı oluşturabilmesi durumudur (Liuyun ve ark. 2009; Uzun ve Bayındır 2011). Uygulanacak materyalin karsinojeniteye ve sistemik veya lokal toksisiteye neden olmaması, kimyasal açıdan inert olması, yeterli mekanik kuvvete sahip olması gerekmektedir (Özalp ve Özdemir 1996).

Doku iskelelerinin biyolojik performansının önceden tayin edilebilmesi için bir takım *in vitro* ve *in vivo* testler yapılmaktadır. İmplant edilen iskelenin araştırma ve geliştirmelerinde bunların etkinlik ve güvenilirliklerinin belirlenmesinde bu testler önemli rol oynamaktadırlar. Biyolojik testler genel olarak üç grupta sınıflandırılmıştır (Uzun ve Bayındır 2011):

1. Başlangıç testleri
2. İkincil testleri
3. Kullanım testleri.

Başlangıç testleri daha çok doku iskelesinin toksik profilini ortaya koymak için yapılmaktadır. Kemik doku iskelelerinde hücre toksisite, karsinojeniklik uzun süreli implant, sistemik enjeksiyon akut toksisite, hassasiyet, öldürücülük ve pirojen testleri yapılmaktadır (Özalp ve Özdemir 1996). İkincil testlerde ise test edilecek doku iskelesi fare, sıçan, koyun, köpek ve maymun gibi deney hayvanlarına implante edilmektedir. Kullanım testlerinde ise hayvan veya insan deneyleri yapılmaktadır. Bu testin yapılabilmesi için biyomateriyalin klinik uygulamaya geçebilecek düzeyde olması gerekmektedir.

2.9.4.1 Hücre Toksisite Deneyleri

Biomateriyallerin biyolojik sisteme uyumluluğunun saptanması için genellikle hücre kültürlerinin kullanıldığı basit *in vitro* testler yapılmaktadır. Hücre büyümesi ve hücre morfolojik özellikleri üzerindeki etkilerinin incelendiği kontrol grubuna göre karşılaştırıldığı test yöntemleridir. Bu test yöntemlerinde materyal direk, indirek veya ekstrakt yoluyla biyolojik sistemle temas ettirilmektedir. Testlerin belirli standartlarda uygulanması için Uluslararası Standardizasyon (ISO) bazı kriterler belirlemiştir. ISO 10993, medikal ürünlerin biyolojik olarak değerlendirilmesi için farklı metotların önerildiği bir test protokolüdür. ISO 10993-5 ise *in vitro* sitotoksik testleri için önerilen genel bir test protokolüdür. Standardize test metotlarının kullanımıyla birçok örneği aynı anda ve kısa sürede ekonomik olarak değerlendirme olanağı sağlanmaktadır. Hassasiyetlerinden dolayı hayvan deneylerine geçmeden toksik materyallerin elimine edilmesine olanak sağlamaktadırlar. Malafaya ve Reis yapmış olduğu çalışmada oluşturdukları çift tabakalı osteokondral doku iskelelerinin sitotoksik testlerinin belirlenmesi için ISO standartlarını uygun şekilde L929 fare fibroblast hücrelerini kullanarak hücre canlılık testi yapmışlardır (Malafaya ve Reis

2009). Bir başka çalışmada osteokondral hasarı tedavi etmek için furfurilamin konjuge edilmiş jelatin ile doku iskelesi geliştirilmiş ve tavşanlardan elde edilen kemik iliği stroma hücreleri ile sitotoksisite çalışmaları yürütülmüş % hücre canlılık oranları belirlenmiştir (Mazaki ve ark. 2014).

2.9.5 Etkin Madde Salım Testleri

İlaç salımı, ilacın ilaç taşıyıcı sisteminden ayrılarak absorpsiyonu, dağılması, metabolize olması ve atılma süreçlerine maruz kalarak farmakolojik etkinin oluşmasını sağlayan süreçtir. Disolüsyon ise standardize koşullarda katı yüzeyden disolüsyon ortamına ya da çözücüye kütle transferi hızıdır (Singhvi ve Singh 2011).

Düşük moleküler ağırlıkta, antiinflamatuvar ya da hücrelerin farklılaşmasını ve dokunun tekrar yapılanmasına yardımcı olan ilaçlar doku iskelelerine yüklenebilmektedir. Örneğin sterodial antiinflamatuvar ilaç olan deksametazon PLGA'dan oluşan doku iskelesine yüklenmiştir. Deksametazonun kemik iliği kök hücrelerinin osteoblastlara farklılaşmasına yol açtığı bulunmuştur (Chen ve ark. 2005). Ayrıca hasarlı dokunun tekrar yapılanmasına ve oluşmasına yardımcı olan büyüme faktörlerinin taşınması için de doku iskeleleri geliştirilmektedir. Lokal ve kontrollü salımı sağlanan büyüme faktörleri, iskeleye direk enkapsülasyon yoluyla, yüzeyine absorbe olarak, ya da mikroküre formunda taşınabilmektedir (Chung ve Park 2007).

Doku iskelesinden ilaç salım çalışmalarında genellikle 3-50 ml pH 7,4 tampon çözelti kullanılarak 37°C'de su banyosunda 15-100 rpm karıştırma hızında cam/polipropilen tüp içerisinde direk ortama doku iskelesini yerleştirilerek yapılmaktadır. Kümülatif ilaç miktarı zaman grafikleri çizilerek çözünme hızı profilleri elde edilmektedir ve kinetik hesaplamalar yapılmaktadır (Prabaharan ve ark. 2006; Tıgılı ve ark. 2009; Zhu ve Kaskel 2009; Dubnika ve ark. 2012).

2.10 Etkin Madde Salım Profillerinin Matematiksel Olarak Değerlendirilmesi

2.10.1 Sıfırıncı Derece Kinetik

Farmasötik ilaç taşıyıcı sistemlerde özellikle kontrollü ve uzatılmış salım yapan sistemlerde bu salım kinetiği hedeflenmektedir. Transdermal sistemlerde, oral ozmotik tabletlerde ve matriks sistemlerde bu salım kinetiğine uygun ilaç salım profilleri gözlenmektedir. Antibiyotik, kalp ilaçları, ağrı kesiciler ve antidepresanlar için ideal ilaç salım kinetiği sıfırıncı derece kinetikle elde edilmektedir. Bu kinetik modelde

taşıyıcı sistemden ilacın salım hızı sabittir. Sıfırıncı derece kinetik % kümülatif salım/zaman grafikleri çizilerek Denklem 2.1 kullanılarak hesaplanmaktadır (Singhvi ve Singh 2011).

$$Q = Q_0 - K_0t \quad (2-1)$$

Q: t anında çözünmeden kalan etkin madde miktarı
 Q₀: Başlangıç etkin madde miktarı
 K₀: Sıfırıncı derece çözünme hız sabiti

2.10.2 Birinci Derece Kinetik

Birinci derece kinetiğe göre, birim zamanda salınan ilaç miktarı, doğrudan sistemdeki ilaç konsantrasyonu ile orantılıdır ve zamanla üssel olarak azalmaktadır. Örneğin, suda çözünmeyen ilacın gözenekli matriksden salımı birinci derece kinetikle gerçekleşmektedir (Dash ve 2010). Birinci derece kinetik log % kümülatif salım/zaman grafikleri çizilerek Denklem 2.2'ye göre hesaplanmaktadır.

$$\ln Q = \ln Q_0 - K_1t \quad (2-2)$$

Q: t anında çözünmeden kalan etkin madde miktarı
 Q₀: Başlangıç etkin madde miktarı
 K₁: Birinci derece çözünme hız sabiti

2.10.3 Higuchi Modeli

Matriks sistemlerden ilaç salımının ilk matematiksel modeli Higuchi tarafından 1961 yılında yapılmıştır. İlk başlarda düz sistemler üzerinde durulurken daha sonra değişik geometrik şekillere ve gözenekli yapılara sahip olan sistemler de bu modele dahil edilmişlerdir. Bu kinetik modelin türetilmesindeki varsayımlar şunlardır:

- Matriks içerisindeki ilaç miktarı çözünebilecek ilaç miktarından büyüktür.
- Sadece tek yönlü ilaç salımı gerçekleşmektedir.
- Matriksin şişme kapasitesi ve çözünürlüğü ihmal edilmektedir.
- İlaç partikülleri matriksin kalınlığından çok küçüktür.
- Çözünme ortamında sink koşul sağlanmıştır.
- Ekin madde difüzyonu sabittir (Dash ve ark. 2010).

Higuchi model kinetiği % kümülatif salım/kare kök zaman grafikleri çizilerek Denklem 2.3'e göre hesaplanmaktadır.

$$Q = K_H t^{1/2} \quad (2-3)$$

Q: t anında salınan etken madde miktarı
K_H: Higuchi model çözünme hız sabiti

2.10.4 Hixson Crowell Modeli (Küp Kök Yasası)

Bu modelle daha önce çözünen katının yüzeyinin değişmeyeceği varsayımı değiştirilerek çözünen katının yüzeyinin değişeceğini ve küçüleceğini ortaya çıkarılmıştır. Küp kök yasası olarak da bilinmektedir. Bu modelde çözünme olayı kristalin veya partikülün yüzeyine dik olarak oluşur karıştırma işlemi bütün yüzeylerde aynı etkiyi göstermektedir. Küp kök yasası, tek bir partikül, kristal ya da çok partiküllü sistemlerde uygulanabilmektedir (Ağabey 2006). Hixson Crowell model kinetiği küp kök % kalan etkin madde/zaman grafikleri çizilerek Denklem 2.4'e göre hesaplanmaktadır.

$$Q_0^{1/3} - Q_t^{1/3} = K_{HC} t \quad (2-4)$$

Q: t anında salınan etkin madde miktarı
Q₀: Başlangıç etkin madde miktarı
K₀: Hixsonn Crowell çözünme hız sabiti

2.10.5 Korsmeyer Peppas Modeli

Fick yasasından sapma gösteren sistemler için geliştirilmiştir. Çözücü polimerin içerisine girince polimer şişer, camsı geçiş sıcaklığı deney sıcaklığının altına düşer ve polimer şişer daha sonra polimerik matriks içerisinde dağıtılmış ilaç, şişen polimerden çözücü ortamına difüze olmaya başlamaktadır. Camsı bir polimer tabakasından çözücü difüzyonuyla aynı anda fakat ters yönde oluşan ilaç salımı Denklem 2.5 ile ifade edilir (Çapan 2004).

$$Q/Q_0 = Kt^n \quad (2-5)$$

Q: t anında salınan etkin madde miktarı

Q₀: sonsuz zamanda salınacak etkin madde miktarı

Q/Q₀: t zamanında salınan etkin madde fraksiyonu

k : Salım yapan sistemin yapısal ve geometrik özelliklerini birleştiren sabit

n : Salım mekanizmasını gösteren difüzyonal sabit.

Korsmeyer Peppas eşitliği şişen veya şişmeyen sistemlerde etkin madde salımının % 60'lık ($Q/Q_0 \leq 60$) ilk fraksiyonu için ve sink koşullar altında geçerlidir. Eşitlikteki 'n' değeri birbirinden farklı salım mekanizmalarının karakterizasyonu için kullanılmaktadır (Singhvi ve Singh 2011). Tablo 2.2'de difüzyonel sabit ve difüzyon parametreleri verilmiştir. Difüzyon katsayısı ise Denklem 2.6 (Tıgılı ve ark. 2009) kullanılarak hesaplanmaktadır.

$$\frac{M_t}{M_\infty} = 4 \left(\frac{D_m t}{\pi L^2} \right)^{0.5}, \quad (2-6)$$

M_t/M_∞: t anında salınan etkin madde miktarı

D_m: Difüzyon katsayısı

L: Doku iskelesinin kalınlığı

Tablo 2-2: Difüzyonel sabitler ve salım mekanizmaları (Singhvi ve Singh 2011).

Difüzyonel Sabit(n)	Salım Mekanizması
$\leq 0,45$	Fick'e uyan difüzyon (Fickian diffusion)
$0,45 < n < 0,89$	Fick'e uymayan salım (Anomalous transport)
0,89	Sıfırıncı derece salım (Case-II transport)
$> 0,89$	Super Case-II transport

2.11 Implante Polimerik Kontrollü Salım Sistemlerinin Sınıflandırılması

Salım hızı önceden programlanan ilaç taşıyıcı sistemler ana hatlarına iki grup altında incelenmektedir.

A. Difüzyon Kontrollü Sistemler

1. Membrandan difüzyonla kontrol

2. Matriksten difüzyonla kontrol

3. Çözünme kontrollü sistemler

B. Aktivasyon Sonucu Kontrollü Salım Sağlayan Sistemler

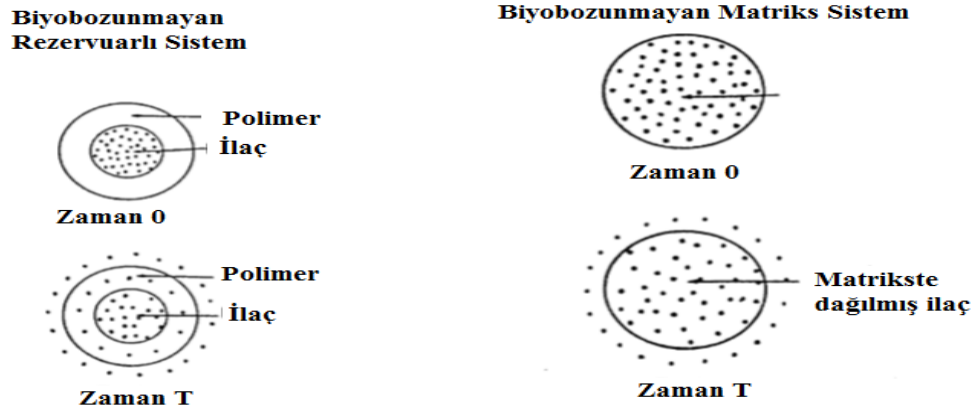
1. Ozmotik kontrollü sistemler

2. Hidrodinamik basınçla aktive edilen sistemler

3. Hidrasyonla aktive edilen sistemler

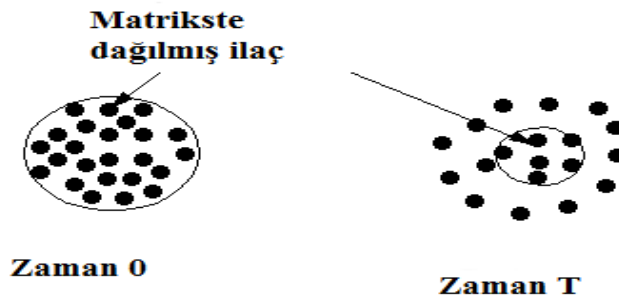
4. Biyobozunan polimerik sistemler (Çapan 2004).

İlaç salımı difüzyonun polimerden salımına, ilacın çözünürlüğüne polimerin biyobozunur ya da biyobozunur olmamasına bağlıdır. İmplant edilen ilaç taşıyıcı sistemler genelde üç temel salım mekanizmasına sahiptir; şişme, ozmotik ve difüzyon kontrollü. Biyobozunmayan polimerik matrikslerde ilaç matriks içerisine homojen dağıtılmıştır ve matriks ilaca kontrollü salım sağlamaktadır. Bu salım sisteminde matriks içerisine dağılmış ilacın hacim fraksiyonuna göre salım hızı değişmektedir. Rezervuar tipi sistemlerde ise dış kısmı biyobozunmayan geçirgen bir polimerik zarla kaplıdır. Bu tip sistemlerde sıfıncı dereceden kinetik görülmektedir ve salım konsantrasyondan bağımsız ve sabittir. Bu tarz sistemlerin dezavantajı zarın yırtılıp ilacın tamamının salınıp toksik doza çıkma riski bulunmasıdır. Ayrıca ilaç salımı bittiğinde biyobozunmayan zarın ameliyatla tekrar alınması gerekebilmektedir (Şekil 2.12).



Şekil 2-12: Biyobozunmayan rezervuar ve matriks sistemlerin şematik görünümü (Dash ve Cudworth 1998).

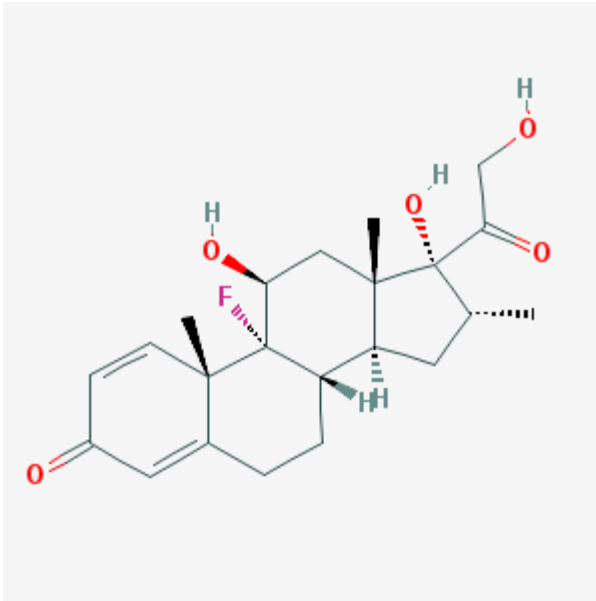
Biyobozunan polimerik implantlar biyobozunmayanlara göre daha komplike yapıya sahiptirler. Bu sistemler geliştirilirken birçok değişkenin göz önünde bulundurulması gerekmektedir. Örneğin ilacın salım hızıyla polimerin bozunma hızlarının ayarlanması gerekmektedir. Biyobozunurken yüzey alanlarıda değişeceği için salım hızıda değişecektir bu nedenle değişen yüzey alanı da dikkate alınmalıdır. Bir diğer problem ise birçok ilaç salım hızının polimerin biyobozunma hızından yavaş olmasıdır. İki farklı tipte biyobozunan ilaç taşıyıcı sistem vardır. Bunlardan ilki rezervuar tipi sistemlerdir ve yapıları biyobozunmayan rezervuar tipi sistemlere benzemektedir. Dış kısımdaki zar ilaç salımı sona erdikten sonra yavaşça bozunmaktadır. Diğer biyobozunan sistemde ise ilaç polimerik matriks içerisine dağıtılmıştır (Şekil 2.13). Biyobozunan sistemlerde iki mekanizma, difüzyon ve biyobozunma ilaç salım davranışını kontrol etmektedir. Bu sistemi geliştirmek için en çok kullanılan polimerler ise poliglikolik asit, polilaktik asit ya da kopolimerleri, kitozan, aljinat ve jelatindir (Rajgor ve ark. 2011; Zaki ve ark. 2012). Son yıllarda kemik ve kıkırdak yerine geçebilecek polimerik sistemler üzerine birçok çalışma yapılmaktadır. Polimerin mekanik özelliklerini iyileştirmek için biyoseramikler de bu yapıların içerisine dahil edilmektedir. Birçok çalışmada biyoseramikler ve biyobozunan polimerler birlikte kullanılarak biyokompozitler hazırlanmıştır bu yapılarla hem doku iskelesi görevi görmesi hem de uygulanan bölgeye ilacın kontrollü salımının sağlanması amaçlanmıştır.



Şekil 2-13: Biyobozunan matriks sistemin şematik görünümü (Drug Delivery).

2.12 Model İlaç Olarak Kullanılan Deksametazonun Özellikleri

Deksametazon glukokortikoid türevi antiinflamatuvar ve antiproliferatif bir ilaçtır. Kapalı formülü $C_{22}H_{29}FO_5$ olan ilacın molekül ağırlığı 392,45 g/mol'dür ve noniyonik yapıdadır (Liao ve ark. 2005) (Şekil 2.14). Klinikte yaygın kullanıma sahip olan bu ilacın uzun süreli kullanımlarında osteoporoza ve diyabete yol açtığı rapor edilmiştir (Hong ve ark. 2014). Yapılan *in vivo* çalışmalarda deksametazonun eklem kıkırdağında meydana gelen inflamasyonu tedavi ettiği kanıtlanmıştır. Ayrıca mezenkimal kök hücrelerin farklılaşp kemik oluşturmasını sağlamaktadır. *In vitro* çalışmalarda deksametazonun osteopregnitör hücreleri seçici uyararak çoğalıp farklılaşarak osteoblastlara dönüşmelerini sağladığı kanıtlanmıştır (Yamanouchi ve ark. 1997; Wang ve ark. 2005; Shintani ve Hunziker 2011). Deksametazon ayrıca kemik/kıkırdak doku mühendisliğinde *in vitro* çalışmalarda oluşturulan doku iskelesinin içerisine kök hücreler yerleştirildiğinde hem hücrelerin farklılaşmasını sağlamak, hem de oluşturulan iskelenin içerisinde canlılıklarını korumak ve proliferasyonunu sağlamak için sıklıkla kullanılmaktadır. Yapılan bir çalışmada ipekten üretilen üç boyutlu doku iskelelerinin içerisine deksametazon ile mezenkimal hücreler yerleştirilmiştir. Bu çalışmayı yapan bilimadamları üç hafta sonunda doğal kıkırdaktaki gibi Tip II kollajenlerin iskelede dağıldığını gözlemlemişlerdir (Wang ve ark. 2005).



Şekil 2-14: Deksametazonun moleküler yapısı (Pubchem).

Noniyonik formda ve küçük moleküler ağırlıkta olması ve yapısının büyüme hormonlarına benzemesi nedeniyle deksametazon birçok salım çalışmasında noniyonik ilaçların salımını açıklayan model ilaç olarak kullanılmaktadır. Liao ve ark. (2005) noniyonik ilaçların salımını aydınlatmak için oluşturdukları kitozan ve aljinat liflerine 100 µg/ml deksametazon yükleyip salımını incelemişlerdir. Yapılan bir diğer çalışmada ise kitozandan oluşan gözenekli doku iskelesine gömme tekniği kullanarak deksametazon yüklenip salımı çalışılmıştır ve difüzyon kontrollü salımın gerçekleştiğini rapor etmişlerdir (Tıǧlı ve ark. 2006).

GEREÇ VE YÖNTEMLER

3.1 Kullanılan Kimyasal Madde, Araç ve Gereçler

3.1.1 Kullanılan Maddeler

Tablo 3-1: Kullanılan maddelerin listesi.

Materyal İsmi	Tedarikçi İsmi
Aljinik asit sodyum tuzu	Aldrich, Amerika
Kitozan	Aldrich, İzlanda
β -trikalsiyum fosfat (β -TCP)	Fluka, Almanya
Sodyum hidroksit	Fluka, Almanya
Glasiyel asetik asit	Sigma-Aldrich, Amerika
Kalsiyum Klorür (CaCl_2) Dihidrat	Riedel- de Haen, Almanya
Lisozim enzimi (Tavuk yumurtası akından elde edilen)	Sigma-Aldrich, Amerika
Maiorogen® (Referans doku iskelesi)	Fin-Ceramica Faenza S.p.A., İtalya
RegenKit® (PRP elde etme kiti)	Regenlab, İsviçre
Deksametazon Sodyum Difosfat	Deva İlaç, İstanbul
Etanol (Chromasolv®)	Sigma Aldrich, Amerika
Monosodyum dihidrojen fosfat	Sigma Aldrich, Amerika
Disodyum monohidrojen fosfat	Fluka, Almanya
Ketamin HCL	Ketalar®, Pfizer, İngiltere
Kisilazin	Rompun®, Bayer, Almanya
Toluidin mavisi	Tekno Kim., Türkiye

Hematoksilen ve eozin	Tekno Kim., Türkiye
L929 Hücre (ATCC CCL 1)	ATCC® CCL-1™ (American Type Cultural Collection, CCL 1 Fibroblast, NCTC clone 929)
DMEM (Dulbecco's modified Eagle's minimal essential medium)	Gibco, Amerika
Fetal sığır serumu (FBS)	Gibco, Amerika
Epiderm™	EPI-200, MatTek, Ashland, Amerika

3.1.2 Kullanılan Araç ve Gereçler

Tablo 3-2: Kullanılan araç ve gereçlerin listesi.

Araç ve Gereç	Firma İsmi
Ultraviyole (UV) Spektrofotometresi	Agilent 8453, Amerika
İnfrared Spektrofotometresi	Perkim Elmer, Amerika
pH-metre	Mettler Toledo, MP 220, Amerika
Hassas Terazı	Ohaus, İsviçre
Manyetik Karıştırıcı	Heidolph MR, Almanya
Etüv	Binder, Almanya
Karıştırıcılı Su Banyosu	Wise Bath, Witech, Almanya
Santrifüj Aleti	Heraeus Labofuge 200 Centrifuge, Kanada
Homojenizatör	WiseTis®, HT1018, PMI-Labortechnik

	GmbH, İsviçre
Ultra Düşük Sıcaklık Dondurucu	New Brunswick, Eppendorf Company, Amerika
Liyofilizatör	Martin Christ Gefriertrocknungsanlagen GmbH, Almanya
Taramalı Elektron Mikroskobu	EVO 40 Carl Zeiss AG, Dresden, Almanya
Tekstür Analiz Cihazı	TA-XT2, Stable Micro Systems, Leatherhead, İngiltere
Sonikatör	Sonorex Bandelin electronic · GmbH & Co. KG, Berlin
Ultra saf su sistemi	Millipore, Almanya
Mikroplak Okuyucu	Microplate photometer, Multiskan Ascent, Finlandiya
Işık Mikroskobu	Olumpus BX53, Amerika

3.2 Formülasyon Çalışmaları

3.2.1 Bileşenlerin Seçimi

Doku iskelesi formülasyonlarında kitozan ve aljinik asit sodyum tuzu (aljinat) polimer olarak, β -TCP ise biyoseramik olarak seçilmiştir.

3.2.2 Ön Denemeler

Formülasyon çalışmalarında 21 farklı konsantrasyonda; kıkırdak tabakası (P) için % 100 kitozan/aljinat (Tablo 3.3’de P1’den P7’ye kadar), arayüzey tabakası (TM) için % 60 kitozan/aljinat ve % 40 β -TCP (Tablo 3.3’de TM1’den TM7’ye kadar) kombinasyonu ve subkondral kemik tabakası (SC) için % 30 kitozan/aljinat ve % 70 β -TCP (Tablo 3.3’de SC1’den SC7’ye kadar) birleşimini kullanarak farklı polimer/ β -TCP konsantrasyonlarında çoklu tabakalı doku iskelesi geliştirilmiştir. Formülasyon

çalışmaları Yeditepe Üniversitesi Eczacılık Fakültesi laboratuvarlarında gerçekleştirilmiştir.

Tablo 3-3: Formülasyon Değerleri.

Formül Kodu	Kitozan (%)	Aljinat (%)	β -TCP(%)
P1	2,50	1,00	0,00
P2	2,50	1,50	0,00
P3	2,50	2,00	0,00
P4	2,50	2,50	0,00
P5	1,00	2,50	0,00
P6	1,50	2,50	0,00
P7	2,00	2,50	0,00
TM1	2,50	1,00	2,33
TM2	2,50	1,50	2,66
TM3	2,50	2,00	3,00
TM4	2,50	2,50	3,33
TM5	1,00	2,50	2,33
TM6	1,50	2,50	2,66
TM7	2,00	2,50	3,00
SC1	2,50	1,00	8,16
SC2	2,50	1,50	9,33
SC3	2,50	2,00	10,50
SC4	2,50	2,50	11,66
SC5	1,00	2,50	8,16
SC6	1,50	2,50	9,33
SC7	2,00	2,50	10,50

3.2.3 Doku İskeleleri Üretim Tekniği

Üç tabakalı doku iskelesinin üretimi için her tabaka ayrı ayrı üretilip daha sonra birleştirilmiştir.

3.2.3.1 Kıkırdak Tabakasının Üretimi

1. Kitozan ve sodyum aljinat tuzu tartılmıştır.
2. Kitozan 1N asetik asit içerisinde, sodyum aljinat tuzu ise 1N NaOH içerisinde çözülmüştür.
3. Aljinatın çözülmesi için 300 rpm'de manyetik karıştırıcı yardımıyla karıştırılarak bir gece bekletilmiştir.
4. Bu iki çözelti birbiriyle karıştırıldıktan sonra 7500 rpm de homojenizatör yardımıyla 2 dakika boyunca karıştırılmıştır.
5. Daha sonra 2 N asetik asit yardımıyla pH 7,4'e ayarlanıp, karışım petri kaplarına dökülmüştür.
6. -80 °C'de dondurulduktan sonra liyofilizatörde 24 saat dondurarak kurutulmuştur.
7. Kurutulmuş doku iskeleleri % 1'lik CaCl_2 çözeltisiyle 20 dakika çapraz bağlandıktan sonra materyal etanol [%70 (h/h)] içerisinde 15 dakika yıkanıp bir gece deiyonize su içerisinde bekletilmiştir. -80 °C'de dondurulduktan sonra tekrar 24 saat dondurarak kurutulmuştur.

3.2.3.2 Ara yüz ve Osteokondral Tabakalarının Üretim Tekniği

Ara yüz ve subkondral tabakayı üretmek için yukarıdaki kıkırdak tabakasının üretim tekniğinde bahsedilen 2. aşamada kitozan çözeltisi içerisine β -TCP koyularak aljinat çözeltisiyle karıştırılmıştır ve diğer işlemlere devam edilmiştir. Bu üretim tekniği literatürde kitozan ve aljinatın kullanıldığı doku iskelelerinin hazırlama yönteminden uyarlanmıştır (Li ve ark. 2005).

3.2.3.3 Üç tabakalı Doku İskelesi Üretim Tekniği

Osteokondral dokuyu taklit eden doku iskelesi üretmek amacıyla kıkırdak tabakası için aljinat ve kitozan çözeltileri karıştırılır ve petri kabına aktarıldı 15 dakika -80 °C'de bekletildikten sonra ara yüz tabakası hazırlanarak kıkırdak tabakasının üzerine dökülmüştür. Bu iki tabaka 15 dakika -80 °C'de tekrar tutulup üzerine subkondral tabaka hazırlanıp dökülmüştür ve son olarak bu üç faz dondurulduktan sonra liyofilize edilmiştir. Kurutulmuş doku iskeleleri % 1'lik CaCl_2 çözeltisiyle 20 dakika çapraz bağlandıktan sonra materyal etanol [%70 (h/h)] içerisinde 15 dakika yıkanıp bir gece

deiyonize su içerisinde bekletilmiştir. -80 °C’de dondurulduktan sonra tekrar 24 saat dondurularak kurutulmuştur. *In vivo* deneyler için etilen oksit kullanılarak sterilizasyonu gerçekleştirilmiştir. Bu yöntem Harley ve ark. (2010) yaptığı çalışmadan uyarlanmıştır.

3.3 Doku İskelelerinin Karakterizasyonu

Yapılan karakterizasyon çalışmalarında Tablo 3.3’de verilen formülasyonlar tek tek üretilip incelenmiştir. Daha sonra karakterizasyon sonucuna göre üç tabaka için P, TM ve SC gruplarının her birinden birer tane tabaka seçilmiştir. Bu seçili tabakalar üç tabakalı monolitik yapıda üretilmiştir. Karakterizasyon çalışmaları Yeditepe Üniversitesi Eczacılık ve Mühendislik Fakültelerinin laboratuvarlarında gerçekleştirilmiştir.

3.3.1 Fourier Dönüşümlü Kızılötesi (FTIR) Spektroskopisi

Fourier Transform Kızılötesi Spektroskopisi kullanılarak aljinat ve kitozan polielektrolit kompleksinin, çapraz bağlanmış polielektrolit kompleksin ve β -TCP’nin yapısı incelenmiştir. Kurutulmuş 2 mg örnek ve 300 mg KBr ile pellet şeklinde başılmıştır ve 400-4000 cm^{-1} aralığında analiz yapılmıştır (Li ve ark. 2005).

3.3.2 Taramalı Elektron Mikroskobu (SEM) Analizleri

Doku iskelelerinin yüzey ve kesit morfolojileri Taramalı Elektron Mikroskobu (EVO 40 Carl Zeiss AG, Dresden, Almanya) ile belirlenmiştir. Örnek yüzeyleri 15 μm kalınlıkta altın-paladyum tabakası ile kaplandıktan sonra SEM görüntüleri elde edilmiştir (Yen ve ark. 2009). Elde edilen görüntüler üzerinden Image J yazılımı kullanılarak gözenek çapları ölçülmüş ve ortalamaları alınmıştır ($n>20$).

3.3.3 Şişme Testi

Her bir katman için ayrı konsantrasyonlarda hazırlanmış doku iskelelerinin ve seçili üç tabakalı iskelenin şişme özelliklerinin belirlenmesi için 9 mm çapında 4 mm kalınlığında örnekler hazırlanıp analitik terazide tartılmıştır. Deneyler 3 ml fosfat tampon çözeltisi (PBS) ile (pH 7.4) 37 °C’de yürütülmüştür. Örnekler PBS’ten çıkarılıp, filtre kağıdı ile fazla PBS uzaklaştırıldıktan sonra analitik terazide tartılmıştır. Her örnek için en az 3 tekrar yapılmıştır (Nandagiri ve ark. 2011).

Su absorpsiyon % sini hesaplamak için aşağıdaki Denklem 3.1 kullanılmıştır.

$$\text{Sabs} = [(S1 - S0) / S0] \times 100 \quad (3-1)$$

Sabs= Absorplanan su yüzdesi

S0: İskelenin ilk ağırlığı

S1: İskelenin son ağırlığı

3.3.4 *In Vitro* Biyobozunma Testi

Biyobozunma testi için 9 mm çapa ve 4 mm kalınlığa sahip doku iskeleleri hazırlanmıştır. İlk ağırlığı analitik teraziyle belirlenmiş örnekler (W1) içerisinde dolaşım sistemiyle aynı miktarda lizozim (10000 U/L) içeren 3 ml 1XPBS çözeltisi içeren ağzı kapalı polipropilen tüplere koyulmuştur (Sowjanya ve ark. 2013). 37 °C'ye getirilmiş etüvde 15 gün boyunca inkübe edilmiştir. Daha sonra filtre kağıdı üzerinde oda sıcaklığında kurutulmuştur. Kurutulan örnekler tekrar tartılarak not edilmiştir (Wt). Bu işlem her örnek için en az 3 kez tekrarlanmıştır. Aşağıdaki Denklem 3.2 kullanılarak % biyobozunurlukları hesaplanmıştır.

$$\% \text{Biyobozunurluk} = \frac{W1 - Wt}{W1} \times 100 \quad (3-2)$$

W1: İlk Ağırlık

Wt: Son Ağırlık

3.3.5 Mekanik Dayanıklılık Testi

Farklı polimer ve β -TCP konsantrasyonlarında hazırlanmış doku iskelelerine tekstür cihazıyla mekanik dayanıklılık testi yapılarak gerilim özellikleri bulunmuştur. 2x4x0,35 cm boyutlara sahip doku iskeleleri hazırlanıp 2 ml PBS (pH=7.4) ile tamamen ıslatılmıştır. Mekanik dayanıklılık testleri çekme gerilimi klipsleri kullanılarak 1 mm/sn hızla, 5N yük ile gerçekleştirilmiştir. Bu yöntemle doku iskelesinin yırtılması için gerekli olan kuvvet ve elastikiyeti hakkında bilgi veren uzama (distance) mesafesini ölçülmektedir (Lee ve ark. 2011). Bu işlem her örnek için en az 3 kez tekrarlanıp ortamları alınmıştır. En yüksek gerilim dayanıklılığı (d) ve germe oranı Denklem 3.3 ve Denklem 3.4'e göre hesaplanmıştır.

$$\delta b = \frac{F}{A} \times 100 \quad (3-3)$$

δb : En yüksek gerilim dayanıklılığı

F: Yırtılma yükü (g)

A: İlk boy ve en çarpımı (cm²)

$$b = \frac{l-l_0}{l_0} \times 100 \quad (3-4)$$

b: Germe oranı

l_0 : İskelenin ilk uzunluğu(cm)

l: yırtılma gerçekleştiğinde ölçüm çizgisi uzunluğu (cm)

3.4 Seçilen Üç Tabakalı Doku İskelesinden *In Vitro* Salım Çalışmaları

In vitro salım çalışmalarında büyüme hormonu yerine, yapısal ve işlevsel benzerliği nedeni ile deksametazon kullanılmıştır (Öztürk ve ark. 2008). Salım çalışmaları Yeditepe Üniversitesi Eczacılık Fakültesi laboratuvarlarında gerçekleştirilmiştir.

3.4.1 Model İlaç Deksametazonun Ultraviyole (UV) Spektroskopisi

Deksametazonun verdiği maksimum absorbans değeri Agilent UV spektrometrede kuvarz küvetler kullanılarak ölçülmüştür. 10 mg/100 ml deksametazon sodyum difosfat (DSD) 1:1 (h/h) oranında etanol (%96, h/h) ve PBS (pH 7.4) çözeltisi içerisinde çözülüp hazırlanmıştır. Daha sonra aynı çözücü ile 40 µg/ml'ye seyretilmiştir. 200-400 nm dalga boyları arasında maksimum absorbans verdiği dalga boyu saptanmıştır (Tıgılı ve ark. 2009).

3.4.2 Analitik Yöntem Validasyonu

Analitik yöntem validasyonu çalışmaları Uluslararası Harmonizasyon Konferansı (ICH) Q2(R1) kılavuzuna uygun bir şekilde yapılmıştır.

3.4.2.1 Standart Doğrunun Hazırlanması (Doğrusallık)

Stok çözeltisi için 10 mg/100 ml DSD 1:1 (h/h) oranında etanol (%96, h/h) ve PBS (pH 7.4) çözeltisi içerisinde çözülüp hazırlanmıştır. Stok çözeltiden seyreltilerek 2, 3, 5, 8, 10, 15, 20, 30, 40 ve 50 µg/ml konsantrasyonlarında çözeltiler hazırlanmıştır. Bu çözeltilerin 242 nm’de UV spektrofometre ile ölçümleri alınıp absorbansa (y ekseninde) karşı konsantrasyon (x ekseninde) kalibrasyon eğrisi çizilmiştir. Absorbanslar ve konsantrasyonlar arasındaki korelasyon katsayısı hesaplanmıştır.

3.4.2.2 Yöntemin Geri Kazanım Oranının İncelenmesi

Geri kazanım oranı saptanan değerin gerçeğe yakınlığını ifade eder. Bilinen üç farklı konsantrasyonda üç paralel örneğin verdiği absorbans değerleri ölçülmüştür. % geri kazanım kalibrasyon eğrisi denklemine yerleştirilerek hesaplanmıştır.

3.4.2.3 Yöntemin Tekrar Edilebilirliği

40 µg/ml konsantrasyonunda hazırlanan örneğin verdiği absorbans değerleri art arda altı kez ölçülmüştür. Elde edilen absorbansların ortalaması, standart sapmaları ve varyasyon katsayıları hesaplanmıştır. Varyasyon katsayısının % 2’den az olması yöntemin tekrar edilebilirliğini göstermektedir.

3.4.2.4 Tekrar Elde Edilebilirlik Çalışması

Tekrar elde edilebilirlik için aynı stoktan hareket edilerek seyreltme ile hazırlanan altı adet aynı konsantrasyondaki çözeltinin absorbans değerleri ölçülerek ortalama, standart sapma ve varyasyon katsayısı hesaplanmıştır. Bulunan varyasyon katsayısının % 2’den küçük olması gerekir.

3.4.3 Doku İskelesine DeksaMetazon Yüklenmesi

Doku iskelelerine deksametazonun yüklenmesi gömme tekniği kullanılarak yapılmıştır. 10 mg deksametazon sodyum difosfat 1:1 (h/h) oranında etanol (%96, h/h) ve PBS (pH 7.4) karışımı içerisinde çözülüp, aynı çözücüyle 100’e tamamlanmıştır (Tıgılı ve ark. 2009). Doku iskelelerinin su absorplama kabiliyetlerine göre 0,5 ml deksametazon çözeltisinden damla damla 9 mm çapta 4 mm kalınlıktaki iskelelerin üzerine damlatılmıştır. Daha sonra oda sıcaklığında çözücü uzaklaştırılmıştır. Bu iskeleler 1:1 (h/h) oranında etanol (%96, h/h) ve PBS (pH 7.4) aynı çözücü yardımıyla çözülüp, 15 dakika sonikatörde tutulduktan sonra yüklenen deksametazonun miktarını

ölçmek için valide edilmiş UV spektrofotometrik yöntem kullanılmıştır. Aşağıdaki Denklem 3.5 kullanılarak enkapsülasyon etkinliği hesaplanmıştır.

$$EE (\%) = \frac{A}{B} \times 100 \quad (3-5)$$

EE: Enkapsülasyon etkinliği

A: Yüklenen ilaç miktarı

B: Teorik hesaplanan ilaç miktarı

3.4.4 Deksa metazon Salım Çalışması

500 µg deksametazon yüklenmiş 9 mm çapında 4 mm kalınlığında doku iskelesi 10 ml 1:1 (h/h) oranında etanol (%96, h/h) ve PBS (pH 7.4) çözeltisi içerisine koyulup ağzı kapalı polipropilen tüpün içerisine yerleştirilmiştir. Tüm salım çalışmaları 37°C’de, 20 rpm çalkalama hızında çalışan su banyosunda yürütülmüştür. Belirli zaman aralıklarında salım ortamı değiştirilmiştir, alınan örneklerin 242 nm’de UV spektrofotometre ile ölçümleri alınıp absorbansları kalibrasyon eğrisi denklemine yerleştirilerek kümülatif salım profili hesaplanmıştır.

3.4.5 Deksa metazon Salım Kinetiklerinin Hesaplanması

Deksa metazonun salım profilini aydınlatabilmek için salım sonuçları 0. Derece (% kümülatif salım/zaman), 1. Derece (log % kümülatif salım/zaman), Higuchi model (% kümülatif salım/kare kök zaman), Hixon Crowel (küp kök % kalan etkin madde /zaman) grafikleri ve Pepas profili (log % kümülatif salım/log zaman) gibi birçok salım kinetiğine uyarlanmıştır. r^2 (korelasyon katsayısı) değerleri hesaplanmıştır (Sahoo ve ark. 2012). Sonuçlar Bölüm 2.10’da bulunan denklemlere yerleştirilerek kinetik hesaplamalar yapılmıştır.

3.5 Doku İskelelerinin *In Vitro* Sitotoksitesi

Geliştirilen üç tabakalı doku iskelesi ve her bir tabakası ayrı ayrı olacak şekilde sitotoksite etkileri L-929 fare fibroblast hücre hattı üzerinde MTT hücre canlılık testi yapılarak araştırılmıştır. Bu çalışmalar TSE EN ISO 10993-5 (2009) kılavuzuna uygun olarak yapılmıştır. Hücre kültürü çalışmalarında, besiyeri olarak L-glutamin içeren-DMEM (Dulbecco’s modified Eagle’s minimal essential medium), besiyeri katkısı olarak %10 fetal sığır serumu (FBS) ve %1 penisilin-streptomisin kullanılmıştır.

Çalışmaların tamamı laminar akışlı steril kabinde yapılmış ve hücre kültürleri ise 37°C, %5 CO₂, % 95 nem ortamını sağlayan bir etüvde sürdürülmüştür.

Dondurucuda saklanan (-80°C) hücreler 37°C’ de su banyosunda kısa sürede bekletildikten sonra, 800 rpm de 5 dk santrifüj yapılarak süpernatant uzaklaştırılmıştır. Hücrelerin üzerine hazırlanan besiyeri eklenerek, T25 cm² hücre kültürü kabına alınmış ve etüve 37°C, %5 CO₂’de inkübe edilmiştir. Hücreler yeterli yoğunluğa ulaştığında tripsinizasyon işlemi yapılmıştır ve T75 cm² hücre kültür kabına ekilmiştir. Pasajlama sonrasında hücre sayısı hemotositometrede hesaplanmıştır ve hücreler her bir kuyucukta 1x10⁴ hücre olacak şekilde 100µl alınarak 96 kuyucuklu hücre üretme kapları içine aktarılmış ve 24 saat inkübe edilmiştir.

Özütleme işlemleri TSE EN ISO 10993-12 (2005) kılavuzuna uygun olarak yapılmıştır. Özütleme işleminde, örnekler tartılıp üzerine 0,1 g/ml olacak şekilde besiyeri eklenmiştir. Ayrıca her bir örneğin emme kapasitesi kadar besiyeri ilave edilmiştir. Doku kültürü ortamında 24±2 saat süreyle 37°C’de özütleme yapılmıştır. 96 kuyucuklu hücre kültür plate’inin her bir kuyucuğuna 1x10⁴ hücre ekilip dört farklı konsantrasyonda (% 12,5, % 25, % 50 ve % 100) subkondral, ara yüz ve kıkırdak ve üç tabakalı doku iskelelerinin ekstraktları kuyucuklara dağıtılıp, 24 saat hücreler ekstraktlara maruz bırakılmıştır. Belirtilen inkübasyon zamanından sonra MTT [3-(4,5-dimetiltiyazol-2-il)-2,5-difeniltetrazolyum bromür] besi ortamı ile karıştırılarak konsantrasyonu 1mg/ml olacak şekilde MTT solüsyonu hazırlanmıştır ve her kuyucuğa 50µl MTT solüsyonu eklenmiştir. Plakalar 37°C’de 2 saat inkübe edildikten sonra süpernatant uzaklaştırılmıştır, hücre içinde depolanan MTT formazanı açığa çıkarmak için 100 µl izopropanol hücreler üzerine eklenmiştir. Her kuyucuğun absorbans değeri 570 nm dalga boyunda mikropate okuyucu ile ölçülerek canlı hücre sayısı belirlenmiştir. % 20’lik dimetilsülfoksit (DMSO) pozitif kontrol olarak kullanılmıştır. L929 hücre relatif canlılık (%) Denklem 3.6’ya göre hesaplanmıştır. Deneyler 3 kez tekrarlanmıştır. Sitotoksikite çalışmaları Yeditepe Üniversitesi Eczacılık Fakültesi laboratuvarlarında gerçekleştirilmiştir.

$$\text{Hücre relatif canlılık (\%)} = \frac{\text{OD570 (örnek)}}{\text{OD570 (medyum kontrol)}} \times 100 \quad (3-6)$$

OD: Optik yoğunluk

3.6 *In Vitro* EpidermTM Deri İritasyon Testi (SIT)

Epiderm SIT, hayvan deri iritasyon testine alternatif olarak Avrupa Alternatif Yöntemlerin Tasdiki Merkezi (ECVAM) tarafından geliştirilen valide edilmiş insan epiderma modelidir. Bu modelde deri iritasyon testi için, insan epidermal keratinositlerinin kültürü sonucu çok tabakalı yüksek farklılaşmış üç boyutlu yapay epiderma elde edilmiştir. Bu çalışmada oluşturulan üç tabakalı doku iskelesinin iritasyon potansiyeli EpidermTM kullanılarak üretici firmanın (MATTEK Şirketi) talimatlarına göre test edilmiştir. Her yapay doku test maddesi, negatif kontrol (NC) (steril Dulbecco'nun fosfat tampon solüsyonu, DPBS) ve pozitif kontrol (%5 sodyum dodesil sülfat, SDS) ile ayrı ayrı muamele edildikten sonra MTT analizi yapılmıştır ve % relatif doku canlılık değerleri Denklem 3.7'ye göre hesaplanmıştır. Belirlenen yüzde doku canlılık oranı % 50'den küçük ise doku iskelesi iritan olarak kabul edilecektir (Kandárová ve ark. 2009). Bu çalışmalar Yeditepe Üniversitesi Eczacılık Fakültesi laboratuvarlarında gerçekleştirilmiştir.

$$\text{Relatif canlılık (\%)} = [\text{OD(örnek)} / \text{ortalama OD(negatif kontrol)}] \times 100 \quad (3-7)$$

OD: Optik yoğunluk

3.7 *In Vivo* Osteokondral Defekt Modeli

Bütün çalışmalar etik kurul onayı alındıktan sonra gerçekleştirilmiştir (Yeditepe Üniversitesi Deney Hayvanları Etik Kurulu, No: 367). Bu çalışmada 290-425 g ağırlıklarında erkek Sprague–Dawley sıçanlar (n=26) kullanılmıştır. Anestezi 0,6 ml Ketamin HCl (100 mg/ml) ve 0,15 ml ksilazin (20 mg/ml) intraperitoneal uygulanmıştır. Her sıçanın sağ dizi cerrahi uygulama için seçilmiştir. Dizler etanol ile silindikten sonra traş edilmiştir. Ardından diz fleksiyonda iken medial parapatellar insizyonla cilt altı geçilerek medial parapatellar artrotomi uygulanmış ve subkondral kemik açığa

çıkarılmıştır. Subkondral kemik üzerinde yassı uçlu dril (matkap ucu) yardımıyla 1,5 mm çapta ve 1,5 mm derinlikte kemik noksanı oluşturulmuştur (Ferretti ve ark. 2006). Bu çalışmalar ortopedik cerrahlar tarafından Yeditepe Üniversitesi hayvan deneyleri laboratuvarında gerçekleştirilmiştir.

3.7.1 Deney Grupları

I. gruptaki deneklere cerrahi işlem sırasında herhangi bir doku iskelesi yerleştirilmemiştir. Kontrol grubu; 2 sıçan.

II. gruptaki deneklere cerrahi işlem sırasında kitozan ve aljinat ile hazırlanmış doku iskelesi (C/A/PEK) yerleştirilmiştir. Polimer grubu; 6 sıçan.

III. gruptaki deneklere cerrahi işlem sırasında kitozan, aljinat ve TCP ile hazırlanmış üç tabakalı doku iskelesi yerleştirilmiştir. TCP grubu; 6 sıçan.

IV. gruptaki deneklere cerrahi işlem sırasında kitozan aljinat ve TCP ile hazırlanmış ve üzerine PRP emdirilmiş üç tabakalı doku iskelesi yerleştirilmiştir. PRP grubu; 6 sıçan.

V. gruptaki deneklere cerrahi işlem sırasında referans doku iskelesi (MaioRegen) yerleştirilmiştir. Referans grubu; 6 sıçan.

Denekler standart rat diyeti ile *ad libitum* beslenmiştir. Altı hafta sonra deney sonlandırılarak sıçanlar yüksek doz ketamin uygulaması ile sakrifiye edilerek histopatoloji için doku örneği alınmıştır.

3.7.2 Plateletce Zengin Plazmanın Elde Edilişi ve Doku iskelelerine Yüklenmesi Yöntemleri

Anestezi altındaki sıçandan (Sprague–Dawley, erkek, n=2) taze kan elde edildikten ve RegenKit® kiti içerisine koyulduktan sonra 1500 rpm’de santrifüj edilerek plateletce zengin fraksiyonu elde edilmiştir. Elde edilen PRP mikropipet yardımıyla damla damla önceden hazırlanan biyokompozit içerisine emdirilmiştir (Kutlu ve ark. 2013).

3.7.3 Histopatoloji Çalışmaları

Rutin fiksasyon prosedürleri uygulanmış, doku örnekleri parafin mumu arasına alınıp 5 mikron kalınlıkta enine kesitleri alınmış, toluidin mavisi ve hematoksilin- eozin ile boyanarak ışık mikroskobu altında incelenmiştir. Histolojik analizler ICRS

(Uluslararası Kıkırdak Araştırma Derneği)'nin skarlama sistemine göre incelenmiştir (Ferretti ve ark. 2006). Ayrıca yabancı cisim reaksiyonu (yabancı cisim dev hücreler) ve inflamasyon (infiltratif hücreler) hücreleri incelenerek var (1) ya da yok (2) şeklinde değerlendirme yapılmıştır. Bunların yanı sıra doku iskelesi kalıntısı skarlama 0, 1 ve 2 şeklinde yapılmıştır.

3.8 İstatistiksel Analizler

Sitotoksisite çalışmalarında veriler örnek sayısı en az 3 olacak şekilde ($n \geq 3$) için $\pm$ standart sapma değerleri ile birlikte sunulmuştur. Farklı konsantrasyon değerleri için her bir grubu kendi içinde, medyum kontrolle ve % 20 DMSO ile muamele edilmiş hücre gruplarıyla istatistiksel karşılaştırma yapmak amacıyla varyansların homojenliği kontrol edildikten sonra Kruskal Wallis ve Mann Whitney-U testi uygulanmıştır. Histolojik değerlendirme sonuçlarında ise farklı grupların frekanslarını karşılaştırmak için ki-kare testi kullanılmıştır. İstatistiksel değerlendirmelerin hepsinde, en düşük $p \leq 0,05$ olduğu durum, istatistiksel olarak anlamlı fark kabul edilmiştir.

BULGULAR

4.1 Formülasyon Çalışmaları

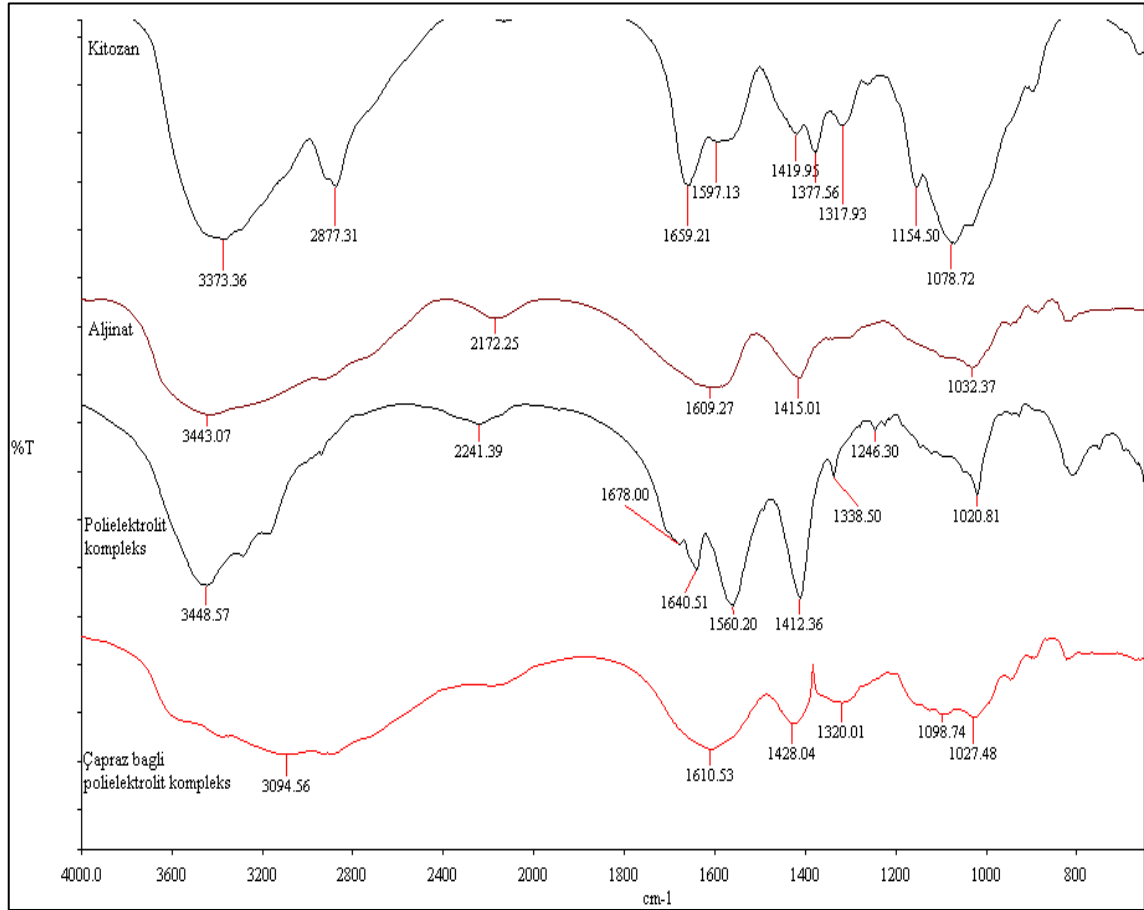
Bu tez çalışmasında biyobenzer kıkırdak, ara yüz ve subkondral tabaka olmak üzere üç tabakalı osteokondral doku iskelesi üretilmesi ve geliştirilmesi planlanmıştır. Bu amaca yönelik formülasyon çalışmalarında bu tabakaları geliştirmek için bölüm 3.2.3’de anlatıldığı gibi çalışılmıştır. Tablo 3.3’de gösterildiği gibi 21 farklı oranla doku iskeleleri hazırlanıp bunların karakterizasyon çalışmaları yapılmıştır. Öncelikle kıkırdak tabakasını oluşturmak için kitozan ve aljinat farklı konsantrasyonlarda hazırlanmıştır. Daha sonra ara yüz tabakasını oluşturmak için % 60 kitozan/aljinat polielektrolit kompleksi (C/A/PEK) ve % 40 β -TCP kullanarak farklı konsantrasyonlarda seramik ve polimer kombinasyonları denenmiştir. Subkondral tabakayı geliştirme için ise % 30 C/A/PEK ve % 70 β -TCP kullanılarak farklı kitozan, aljinat ve seramik konsantrasyonları denenmiştir. En iyi gözenek yapısı, mekanik, şişme ve biyobozunma özelliklerine sahip üç tabakalı doku iskelesi oluşturulmaya çalışılmıştır.

4.2 Doku İskelelerinin Karakterizasyonu

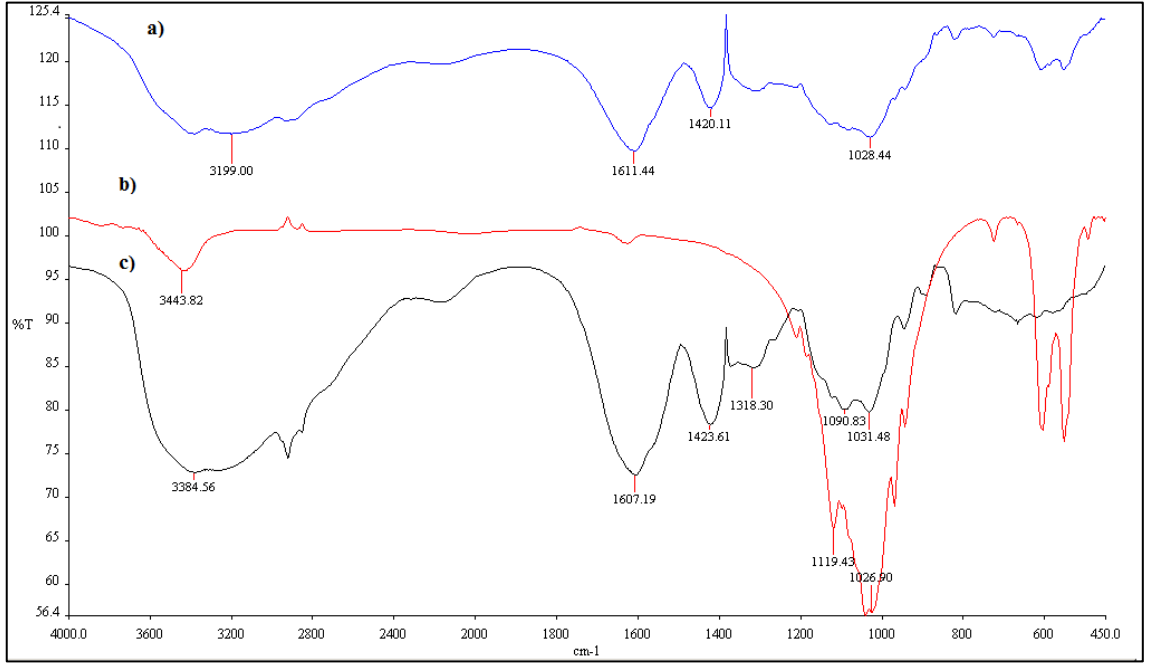
4.2.1 Fourier Dönüşümlü Kızılötesi (FTIR) Spektroskopisi Analiz Bulguları

Yöntem 3.3.1’de anlatıldığı gibi FTIR spektroskopisi analizleri gerçekleştirilmiştir. Kitozan ve aljinat hammaddeleri, C/A/PEK, CaCl_2 ile çapraz bağlanmış C/A/PEK ve C/A/PEK/ β -TCP ile geliştirilmiş doku iskeleleri ayrı ayrı incelenmiştir. Şekil 4.1’ de aljinat, kitozan ve β -TCP kullanılarak hazırlanan doku iskelesinin kimyasal etkileşiminin FTIR spektrumu verilmiştir. Şekil 4.1’de kitozanın karakteristik amit-I ($\text{C}=\text{O}$; 1659 cm^{-1}), amit-II ($\text{C}=\text{O}$; 1597 cm^{-1}) ve amino grup ($\text{C}-\text{N}$; 1154 cm^{-1}) pikleri gösterilmiştir. Ayrıca kitozana ait 1415 cm^{-1} ’deki karboksil grubu ve 1078 cm^{-1} ’deki C-O gerilmesi nedeniyle oluşan pikler aynı şekilde gösterilmiştir. Bunlara ek olarak aljinatın karakteristik karbonil ($\text{C}=\text{O}$) grubuna ait pik 1609 cm^{-1} ’de, karboksil grubuna ait pik 1415 cm^{-1} ’de ve C-O gerilmesine ait pik de 1032 cm^{-1} ’de aynı şekil üzerinde gösterilmiştir. 1026 cm^{-1} ’de β -TCP’nin fosfat şiddetine ait pik Şekil 4.2’de verilmiştir. C/A/PEK’inde amit-II pikinin şiddetinin arttığı ve amit-I pikinin ikiye bölünerek 1659 cm^{-1} ’den 1640 cm^{-1} ’ye kaydığı ve amino grubu pikinin kaybolduğu gözlenmiştir (Şekil 4.1). Çapraz bağlanmış C/A/PEK’inde ise amit-I ve

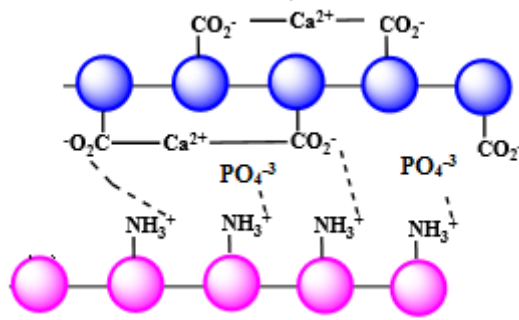
amit-II pikleri kaybolmuştur ve yerini 1607 cm^{-1} 'de tek bir pik almıştır. C/A/PEK/β-TCP ait bulgulara ise 1607 cm^{-1} 'deki pikin kaydığı ve 1028 cm^{-1} 'de fosfat grubuna ait pik gözlenmiştir (Şekil 4.2). Aljinat, kitozan ve trikalsiyum fosfat kullanılarak hazırlanan doku iskelesinin kimyasal etkileşiminin şematik gösterimi Şekil 4.3'de verilmiştir.



Şekil 4-1: FTIR spektrumları kitozan, aljinat polielektrolit kompleksi (CA/PEK) ve çapraz bağlı CA/PEK.



Şekil 4-2: FTIR spektrumları C/A/PEK/ β -TCP (a) β -TCP tozu (b) C/A/PEK (c).



Şekil 4-3: Aljinat, kitozan ve trikalsiyum fosfat kullanılarak hazırlanan doku iskelesinin kimyasal etkileşiminin şematik gösterimi. Bu şema Venkatesan ve ark. (2014) yaptığı çalışmadan uyarlanmıştır.

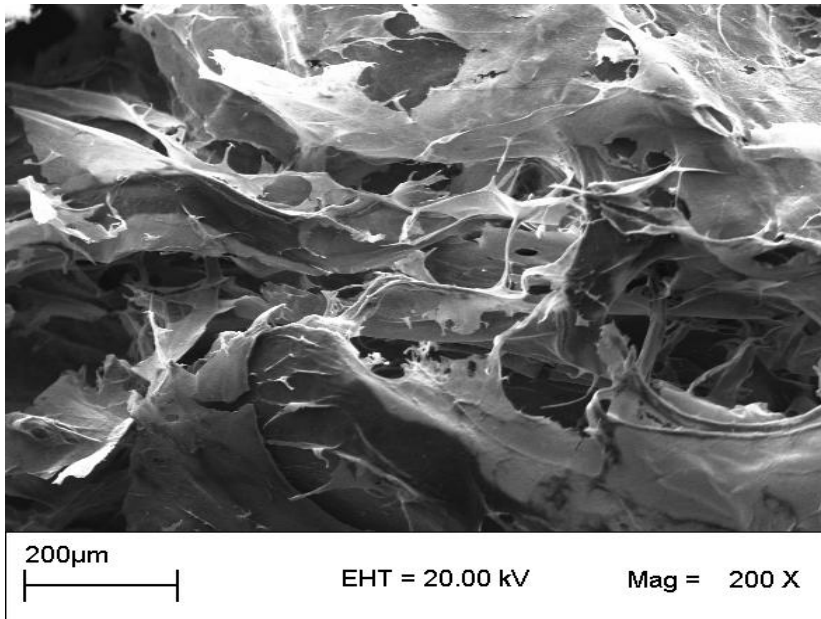
4.2.2 SEM Analizi Bulguları

Bölüm 3.3.2 anlatıldığı gibi P2, P4, P6, TM2, TM4, TM6, SC2, SC4 ve SC6 kodlu formüllerin SEM analizleri yapılmıştır. Görüntülere bakıldığında bütün örneklerin sünger yapısında içsel bağlantılı gözeneklere sahip olduğu gözlenmiştir (Şekil 4.4-14). Ayrıca P grubuna göre TM ve SC grubunun yapısını daha koyu renkte daha gözenekli ve kırık formda olduğu gözlenmiştir. Tablo 4.1’de görüldüğü gibi β -TCP oranı arttıkça gözenek çapları azalmaktadır. Polimer grubunda aljinat miktarı arttıkça gözenek çapının arttığı görülmüştür (Tablo 4.1). Çapraz bağlanmamış P6 formülü (168,76 μm) ve çapraz

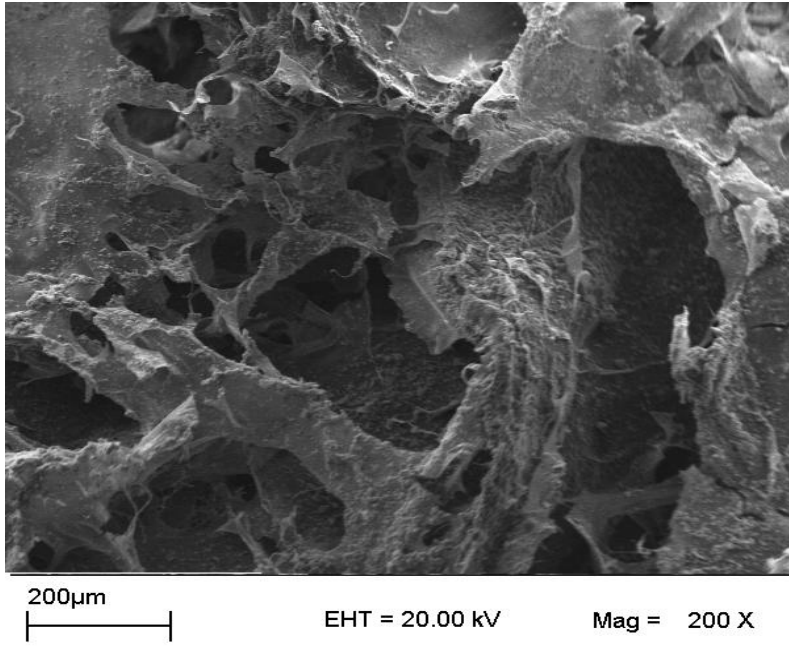
bağlanmış P6 formülünü (169,90 μm) karşılaştırdığımızda gözenek boyutlarında değişiklik olmadığı (Şekil 4.13-14) fakat çapraz bağlanmış formülde köprüler olduğu gözlenmiştir.

Tablo 4-1: Doku iskelelerinin ortalama gözenek çapları.

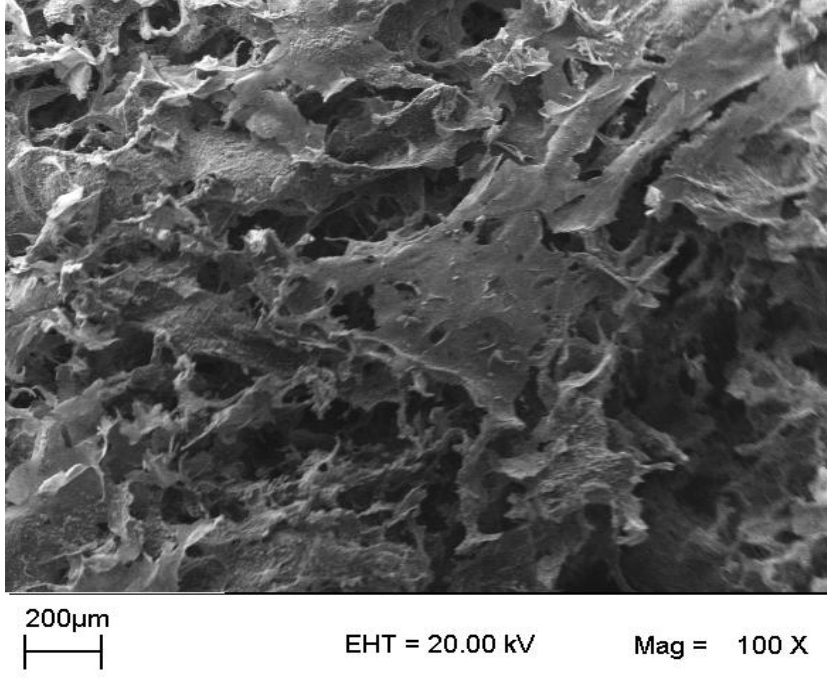
Formül Kodu	Ortalama Gözenek Çapı(μm)	Formül Kodu	Ortalama Gözenek Çapı(μm)	Formül Kodu	Ortalama Gözenek Çapı(μm)
P2	100,151	P4	202,42	P6	247,903
TM2	93,76	TM4	177,198	TM6	169,903
SC2	90,267	SC4	36,501	SC6	122,574



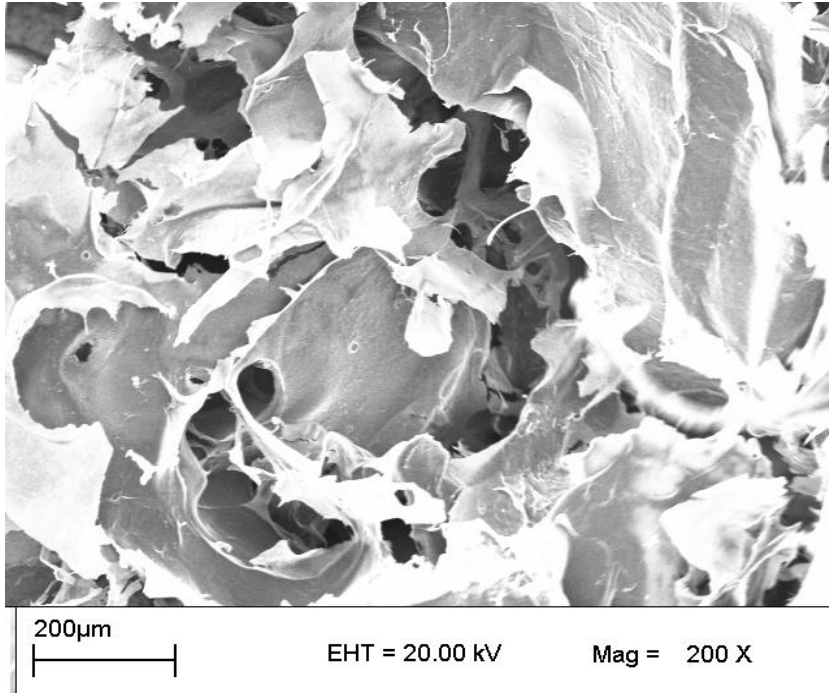
Şekil 4-4: P2 kodlu formüle ait doku iskelesinin SEM görüntüsü.



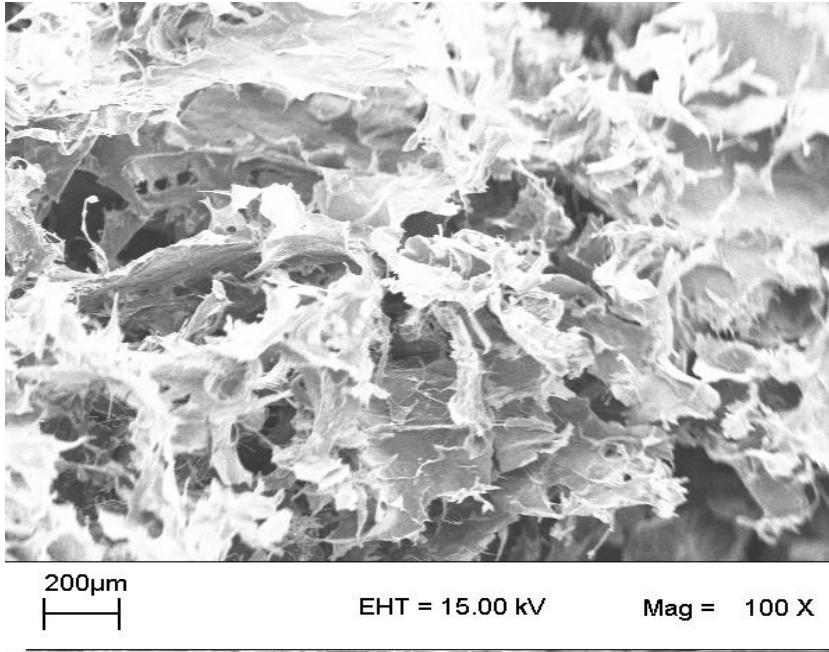
Şekil 4-5: TM2 kodlu formüle ait doku iskelesinin SEM görüntüsü.



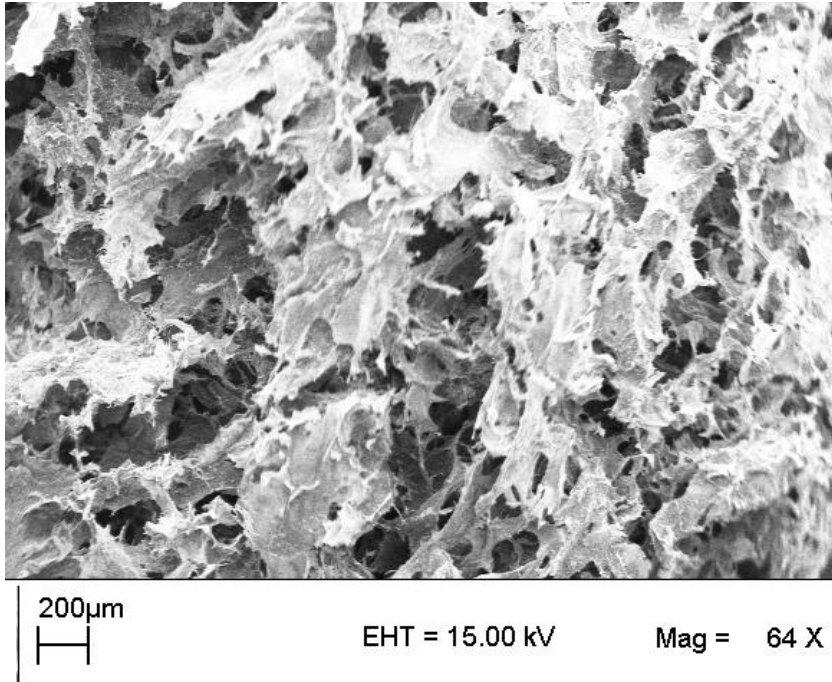
Şekil 4-6: SC2 kodlu formüle ait doku iskelesinin SEM görüntüsü.



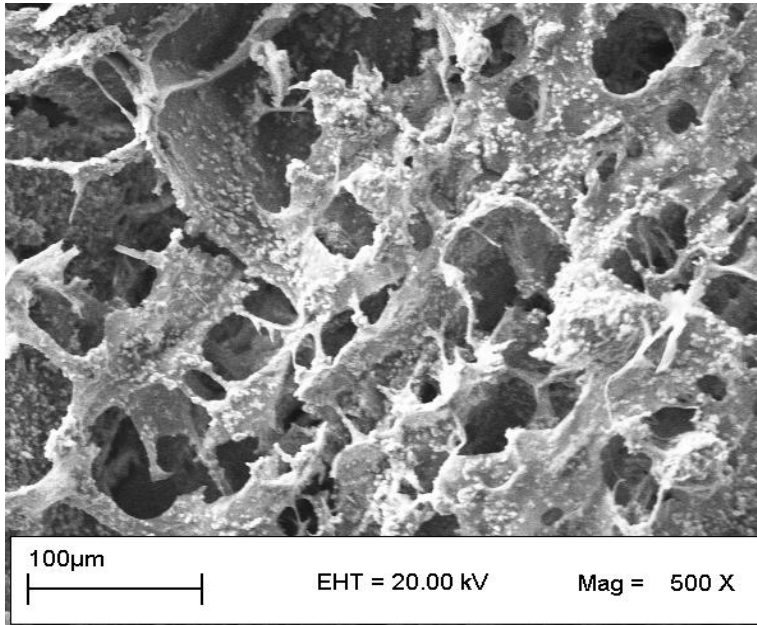
Şekil 4-7: P4 kodlu formüle ait doku iskelesinin SEM görüntüsü.



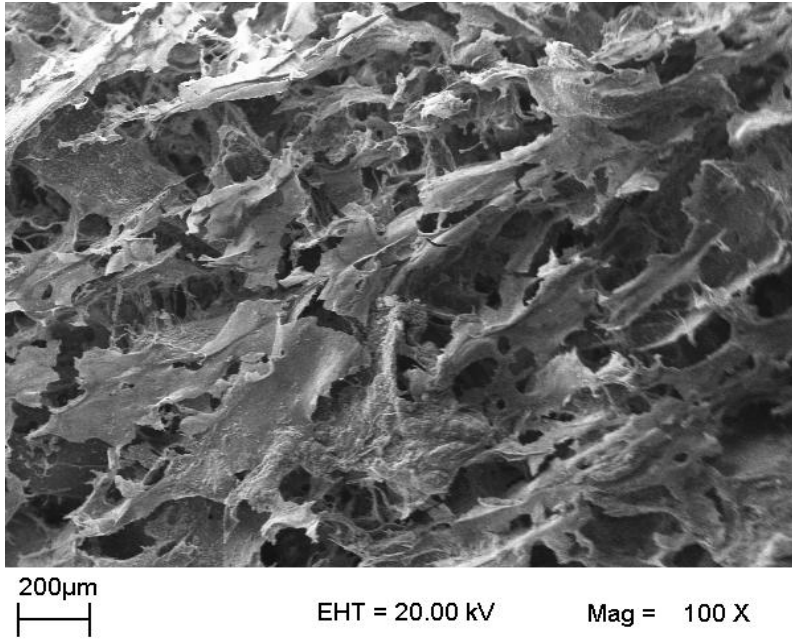
Şekil 4-8: P4 kodlu formüle ait doku iskelesinin SEM görüntüsü.



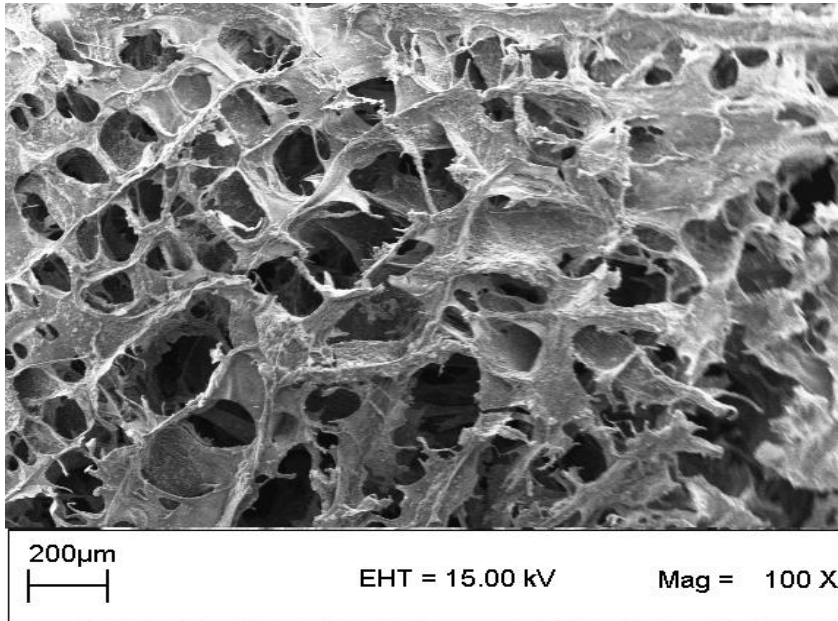
Şekil 4-9: TM4 kodlu formüle ait doku iskelesinin SEM görüntüsü.



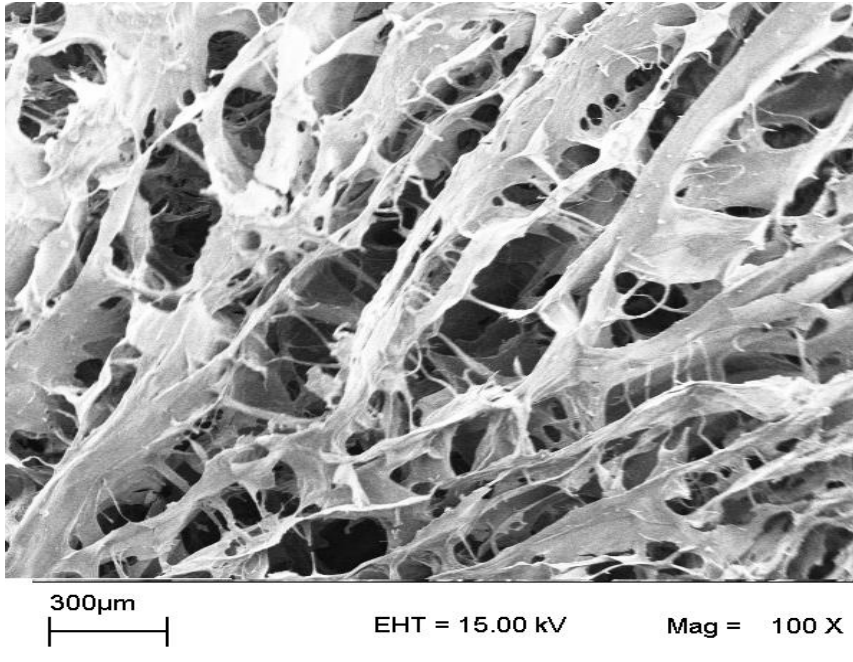
Şekil 4-10: SC4 kodlu formüle ait doku iskelesinin SEM görüntüsü.



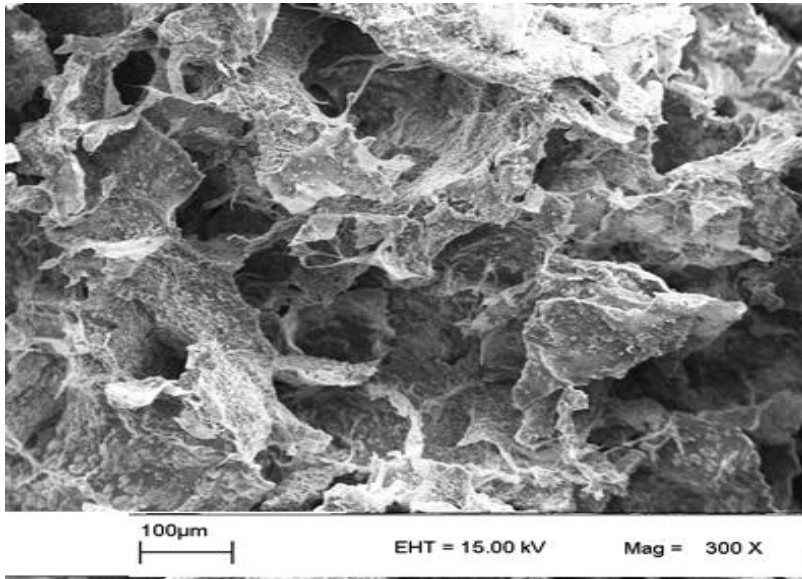
Şekil 4-11: SC6 kodlu formüle ait doku iskelesinin SEM görüntüsü.



Şekil 4-12: TM6 kodlu formüle ait doku iskelesinin SEM görüntüsü.



Şekil 4-13: P6 kodlu formüle ait doku iskelesinin SEM görüntüsü.



Şekil 4-14: Çapraz bağlanmamış P6 kodlu formüle ait doku iskelesinin SEM görüntüsü.

4.2.3 Şişme Testi Bulguları

Bölüm 3.3.3'te verilen yöntem ile gerçekleştirilmiş olan şişme çalışmalarına ait veriler Tablo 4.2'de verilmiştir. Formülasyonlar arasında en yüksek % şişme oranı P5 ($2603,29 \pm \% 60$), TM5 ($2058,69 \pm \% 68$) ve SC5 ($2058,69 \pm \% 68$)'de gözlemlenmiştir. Bu bulgura göre aljinat oranı arttıkça su absorplama kapasitesinin

arttığı ortaya çıkmıştır. Ayrıca formülasyonlarda β -TCP miktarı arttıkça % şişme oranlarının azaldığı gözlenmiştir.

Tablo 4-2: % Şişme analiz sonuçları.

Formül Kodu(FK)	% şişme oranları	FK	% şişme oranları	FK	% şişme oranları
P1	1786,7 $\pm$ 46	TM1	1541,02 $\pm$ 67	SC1	922,16 $\pm$ 24
P2	2186,3 $\pm$ 107	TM2	1483,03 $\pm$ 155	SC2	776,28 $\pm$ 44
P3	1895,75 $\pm$ 63	TM3	1572,91 $\pm$ 80	SC3	861,29 $\pm$ 85
P4	1622,91 $\pm$ 16	TM4	1299,62 $\pm$ 22	SC4	652,95 $\pm$ 41
P5	2603,29 $\pm$ 60	TM5	2058,69 $\pm$ 68	SC5	1021,7 $\pm$ 95
P6	2149,27 $\pm$ 18	TM6	1336,17 $\pm$ 56	SC6	680,19 $\pm$ 20
P7	1808,81 $\pm$ 15	TM7	1446,53 $\pm$ 46	SC7	883,07 $\pm$ 85

4.2.4 *In Vitro* Biyobozunma Testi Bulguları

Biyobozunma testleri bölüm 3.3.4 anlatılan yöntemle göre biyobozunma testleri gerçekleştirilmiştir. Çapraz bağlanmamış polielektrolit komplekslerinin hepsinin aynı gün dağıldığı fark edilmiştir. 15 gün boyunca bozunmaya bırakılan çapraz bağlı formülasyonların P1, P2, P5, TM1, TM2, TM3, SC1, SC3, SC4 kodlu olanlarının tamamen bozunduğu gözlenmiştir (Tablo 4.3). Kıkırdak tabakası için P4 (% 22,45 $\pm$ 3,75), ara yüz tabakası için TM6 (18,92 $\pm$ 5,55) ve subkondral kemik tabakası için ise SC6 (% 43,90 $\pm$ 9,66) en düşük biyobozunma hızlarına sahip formülasyonlar olarak bulunmuştur. Ayrıca genel olarak β -TCP oranları arttıkça biyobozunma oranlarının P<TM<SC şeklinde arttığı gözlenmiştir.

Tablo 4-3: % Biyobozunma analiz sonuçları.

Formül Kodu(FK)	% Biyobozunma	FK	% Biyobozunma	FK	% Biyobozunma
P1	100	TM1	100	SC1	100
P2	100	TM2	100	SC2	74,9 ± 1,07
P3	39,67±5,34	TM3	100	SC3	100
P4	22,45±3,75	TM4	63,82±1,87	SC4	100
P5	100	TM5	22,44±7,5	SC5	47,99±4,40
P6	35,04± 3,81	TM6	18,92±5,55	SC6	43,90±9,66
P7	30,79±2,61	TM7	23,06±1,21	SC7	44,24± 0,79

4.2.5 Mekanik özellikler

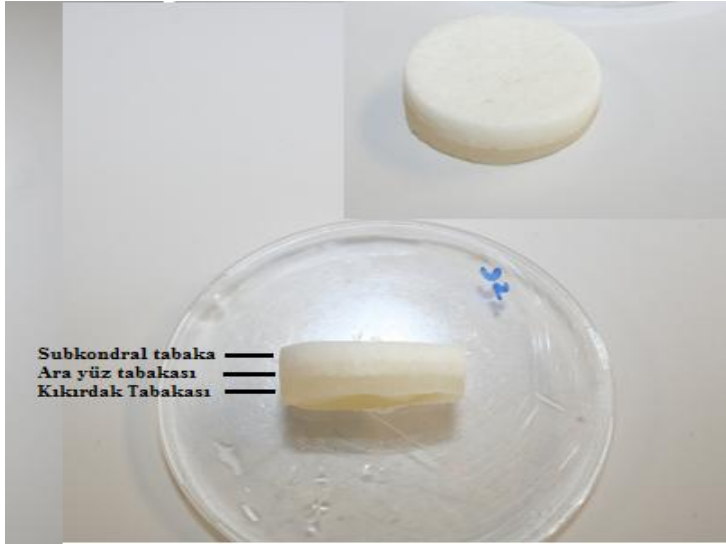
Doku iskelelerinin mekanik özelliklerindeki etkisinin belirlenebilmesi amacıyla çekme gerilimi testleri yapılmıştır. Doku iskeleleri örnekleri önceden PBS (pH=7.4) ile tamamen ıslatılmıştır. Islatılmadan sonra çapraz bağlanmamış iskelelerin cihaza yerleştirilirken bütünlüğünün bozulduğu gözlenmiştir. Bu nedenle çapraz bağlanmamış doku iskeleleriyle ölçüm alınamamıştır. Çapraz bağlanmış doku iskelelerinin test sonuçlarına bakıldığında bütün formülasyon gruplarında (P, TM ve SC) aljinat oranı arttıkça doku iskelesinin yırtılması için gerekli olan kuvvette artış olduğu gözlenmiştir (Tablo 4.4). Tablo 4.4’de gösterildiği gibi % gerilme sonuçları ise değişkenlik göstermiştir. Genel olarak P grubu en yüksek elastikiyet göstermiştir. Gruplar arasında en yüksek gerilim dayanıklılığına sahip örnekler P5, TM7 ve SC7 kodlu formülasyonlardır.

Tablo 4-4: Mekanik dayanıklılığı testi sonuçları.

Formül Kodu (FK)	En yüksek gerilim dayanıklılığı (g/cm ²)	% gerilme	FK	En yüksek gerilim dayanıklılığı (g/cm ²)	% gerilme	FK	En yüksek gerilim dayanıklılığı (g/cm ²)	% gerilme
P1	1,26 ± 0,42	54,125	TM1	1,86 ± 0,62	42,67	SC1	1,83 ± 0,28	47,47
P2	1,68 ± 0,23	58,50	TM2	2,26 ± 0,62	48,12	SC2	1,95 ± 0,88	52,17
P3	2,13 ± 0,17	58,60	TM3	2,37 ± 0,37	48,25	SC3	2,28± 0,65	48,55
P4	2,35 ± 0,48	59,67	TM4	3,30 ± 0,49	49,60	SC4	2,67 ± 1,64	49,8
P5	5,85 ± 0,78	53,9	TM5	4,38 ± 0,56	42,37	SC5	3,43 ± 0,20	51,6
P6	4,26 ± 2,02	61,77	TM6	5,18 ± 0,51	52,22	SC6	4,43± 0,21	54,85
P7	3,31 ± 1,10	58,7	TM7	6,08 ± 0,58	48,37	SC7	4,59 ± 0,48	45,05

4.3 Üç tabakalı Doku İskelesinin Tabakalarının Belirlenmesi

Bütün formülasyonlar Bölüm 3.2.3’de anlatıldığı gibi tabaka tabaka üretilmiştir. Hazırlanan formülasyonların özelliklerini aydınlatabilmek ve hazırlama aşamalarından gelebilecek olumsuzlukları araştırmak üzere bir seri karakterizasyon yapılmıştır. Yapılan bu çalışmaların değerlendirilmesi sonucunda kıkırdak tabakası için P4, ara yüz TM6 ve subkondral tabaka için SC6 kodlu formülasyonlar seçilmiştir. Daha sonra Bölüm 3.2.3.3’de anlatıldığı gibi monolitik yapıda üç tabakalı doku iskelesi üretilmiştir (Şekil 4.15) ve etilen oksitle sterilizasyonu gerçekleştirilmiştir. *In vitro* salım, sitotoksisite ve *in vivo* hayvan deneylerinde seçilen bu üç tabakalı iskele kullanılmıştır.

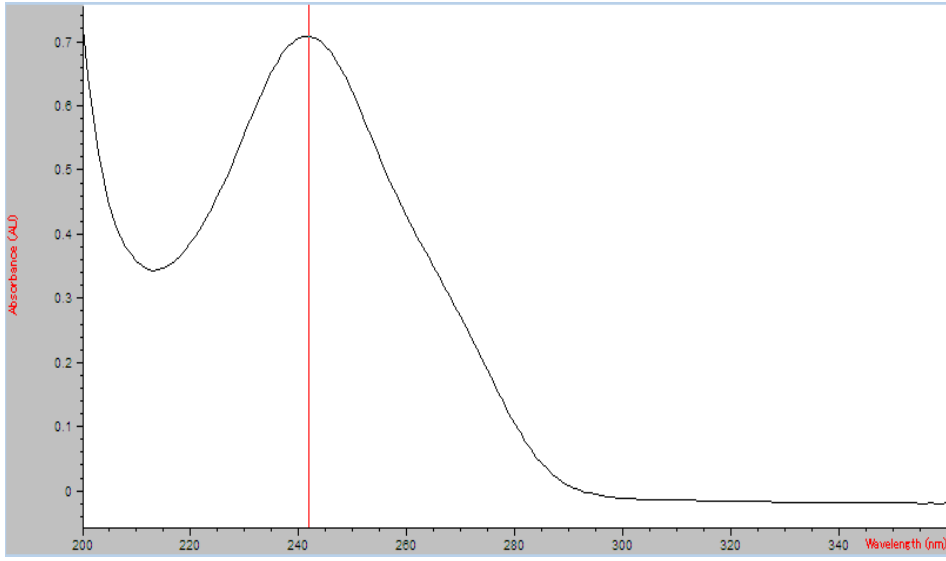


Şekil 4-15: Seçili monolitik yapıda üç tabakalı doku iskelesinin fotoğrafları.

4.4 *In vitro* Salım Çalışması Bulguları

4.4.1 Model İlaç Deksetazonun UV Analiz Bulguları

Deksetazonun yöntem 3.4.1’de belirtildiği gibi çalışılarak maksimum absorbanı verdiği dalga boyu (λ_{max}) 242 nm olarak bulunmuştur. Şekil 4.16’da deksetazonun UV spektrumu verilmiştir.

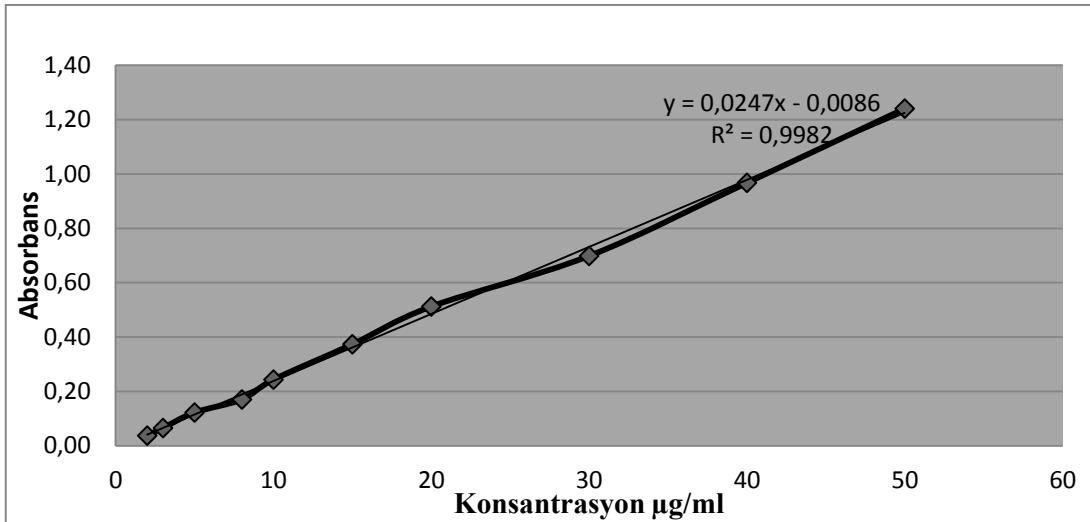


Şekil 4-16: Doku iskelesi içerisindeki deksametazonun UV spektrumu.

4.4.2 Analitik Yöntem Validasyonuna Ait Bulgular

4.4.2.1 Standart Doğrunun Hazırlanması (Doğrusallık)

Bölüm 3.4.2.1’de anlatıldığı gibi çalışılmıştır. Sonuçlara göre çizilen kalibrasyon eğrisi Şekil 4.17’de gösterilmiştir. r^2 değeri 0.998 olarak bulunmuştur.



Şekil 4-17: Deksametazonun UV’de 242 nm dalga boyunda çizilen kalibrasyon eğrisi.

4.4.2.2 Yöntemin Geri Kazanımının Tespitine Ait Bulgular

Bölüm 3.4.2.2’de anlatıldığı gibi çalışılmıştır. Tablo 4.5’de görüldüğü gibi ortalama yüzde geri kazanım farkı $\pm$ % 10 aralığındadır.

Tablo 4-5: % Geri kazanım bulguları.

Teorik Hesaplanan Konsantrasyon ($\mu\text{g/ml}$)	Absorbans	Pratik Elde Edilen Konsantrasyon ($\mu\text{g/ml}$)	Geri Kazanım Oranı (%)
5	0,121	5,247	104,94
5	0,12	5,21	104,13
5	0,12	5,21	104,13
		ORT	104,4
		SS	0,467
		% VK	0,447
10	0,229	9,62	96,202
10	0,225	9,479	94,785
10	0,221	9,287	92,87
		ORT	94,619
		SS	1,672
		% VK	1,767
15	0,367	15,206	101,376
15	0,362	15,004	100,027
15	0,363	15,045	100,297
		ORT	100,567
		SS	0,714
		% VK	0,71

4.4.2.3 Yöntemin Tekrar Edilebilirlik Bulguları

Bölüm 3.4.2.3’de anlatıldığı gibi çalışılmıştır. Altı kez art arda ölçülen absorbanların % varyasyon sayısı 2’den az bulunmuştur (Tablo 4.6). Yöntemin tekrar edilebilirliği kanıtlanmıştır.

Tablo 4-6: Tekrar edilebilirlik bulguları.

Örnek No	Absorbans
1	0,943
2	0,937
3	0,933
4	0,941
5	0,939
6	0,935
ORT	0,938
SS	0,003742
% VK	0,398897

4.4.2.4 Tekrar Elde Edilebilirlik Çalışması Bulguları

Bölüm 3.4.2.4’de anlatıldığı gibi çalışılmıştır. Aynı stoktan hareketle hazırlanan aynı konsantrasyonda 6 farklı örneğin absorbanları ölçülmüştür. Varyasyon katsayısı % 2’den az bulunmuştur (Tablo 4.7). Yöntemin tekrar elde edilebilirliği kanıtlanmıştır.

Tablo 4-7: Tekrar elde edilebilirlik bulguları.

Örnek No	Absorbans
1	0,966
2	0,943
3	0,952
4	0,941
5	0,943
6	0,951
ORT	0,949
SS	0,009
% VK	0,985

4.4.3 Doku İskelesine Deksametazon Yüklenmesi

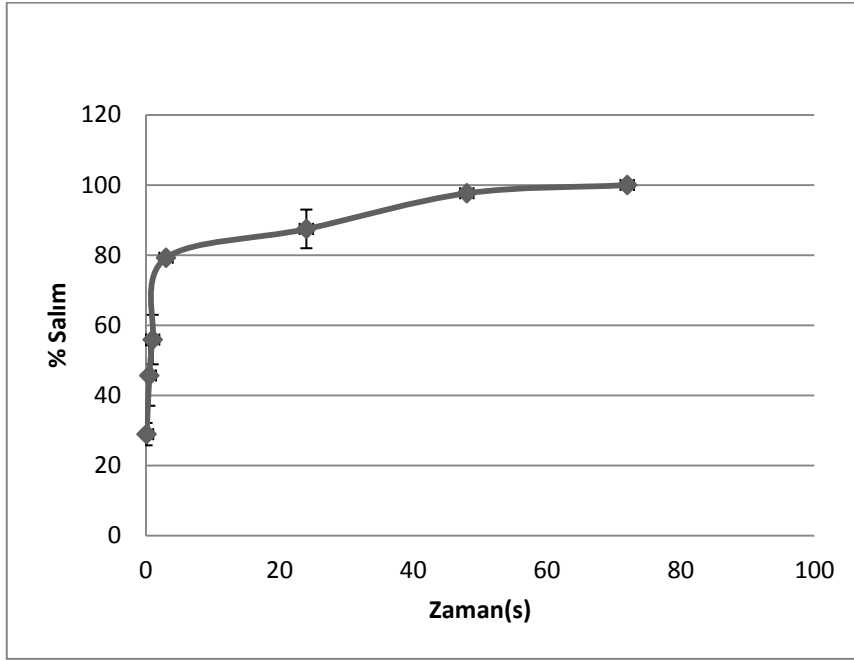
Bölüm 3.4.3’de anlatıldığı gibi gömme tekniği kullanılarak deksametazon doku iskelesine yüklenmiştir. Yüklenmiş deksametazon miktarının tayin edilebilmesi için daha önce bahsedildiği gibi UV spektrofotometrik yöntem kullanılmıştır. Beş kez aynı işlem tekrarlanmıştır ve Denklem 3.5’e göre enkapsülasyon etkinliği hesaplanmıştır. Enkapsülasyon etkinliği % 78,661 olarak bulunmuştur (Tablo 4.8).

Tablo 4-8: Doku iskelesine deksametazon en kapsülasyon etkinliği bulguları.

Örnek No	Absorbans	Teorik	Pratik Elde	Enkapsülasyon etkinliği (%)
		Hesaplanan Konsantrasyon (µg/ml)	Edilen Konsantrasyon (µg/ml)	
1	1,017	50	41,534	83,069
2	0,913	50	37,311	74,622
3	0,933	50	38,117	76,235
4	0,937	50	38,300	76,600
5	1,014	50	41,389	82,777
			ORT	78,661
			SS	3,963

4.4.4 Deksametazon Salım Çalışması Bulguları

Salım çalışması bölüm 3.4.4’de anlatıldığı şekilde yapılmış ve salım profili Şekil 4.18’de gösterilmiştir.



Şekil 4-18: Üç tabakalı iskeleden deksametazon salım grafiği.

4.4.5 Deksametazon Salım Kinetiklerinin Hesaplanması

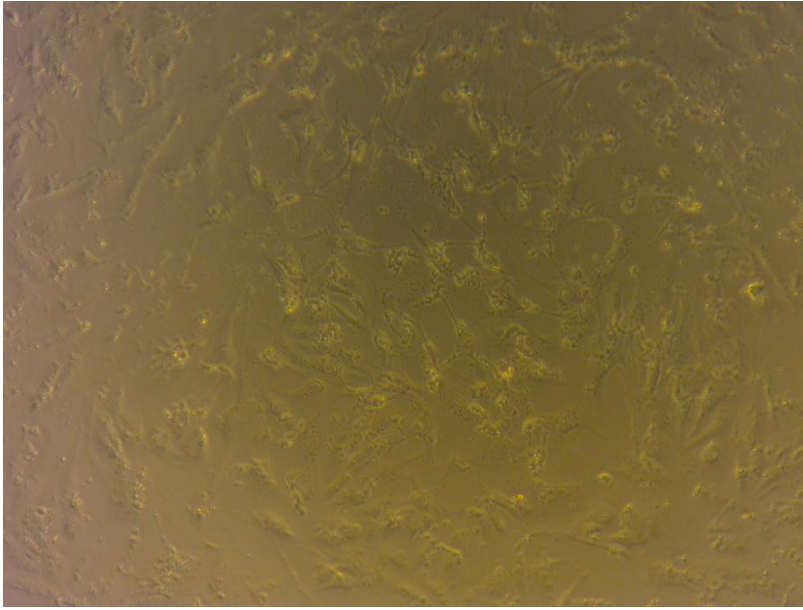
Salım kinetiği hesaplamaları Bölüm 3.4.6’de anlatıldığı gibi hesaplanmıştır. Formülasyona ait salım kinetikleri Tablo 4.9’da gösterilmiştir.

Tablo 4-9: Üç tabakalı iskeleye ait salım kinetikleri.

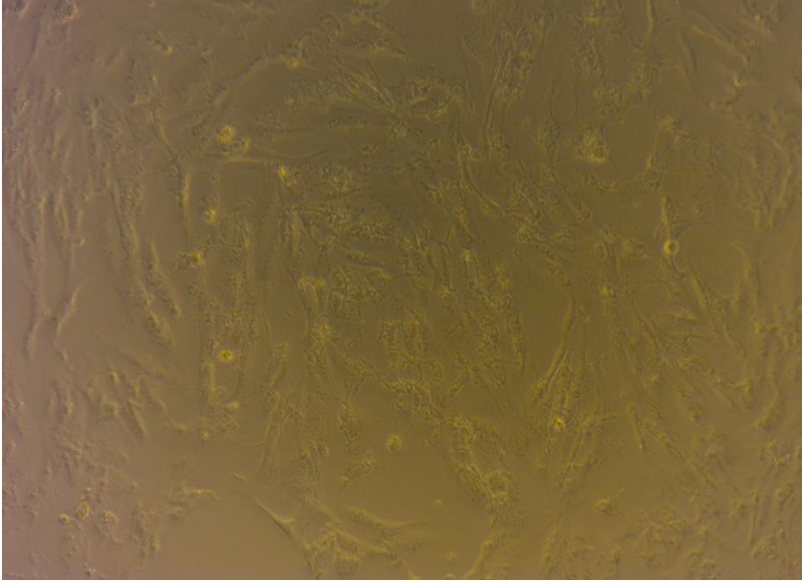
Kinetik Model	r^2	k	n	Dm (cm ² /s)
Birinci derece	0,524	0,005		
Higuchi	0,788	7,474		
Sıfırıncı derece	0,648	0,773		
Hixon Crowel	0,935	0,050		
Korsmeyer-Peppas modeli	0,999	0,554	0,263	$1,68 \times 10^{-4}$

4.5 Doku İskelelerinin *In Vitro* Sitotoksitesi Bulguları

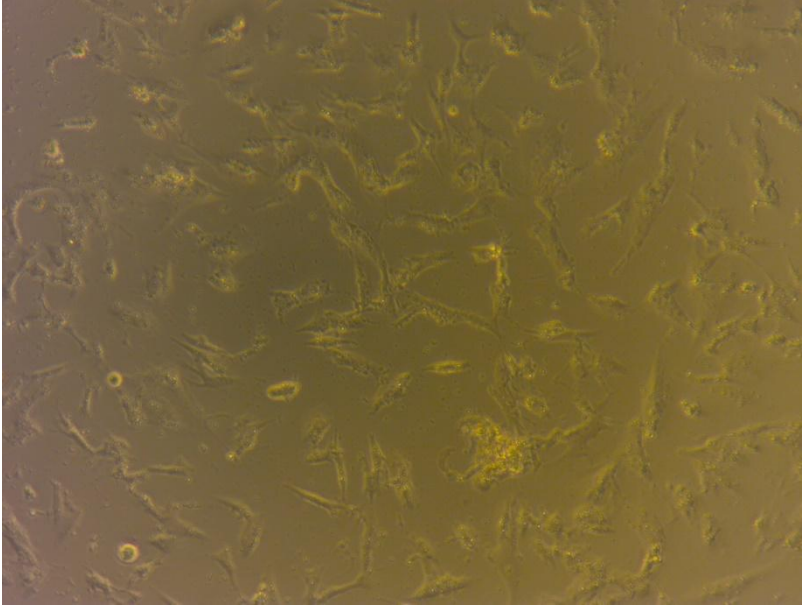
Geliştirilen üç tabakalı doku iskelesinin ve her bir tabakanın ayrı ayrı sitotoksik etkileri L-929 fare fibroblast hücre hattı üzerinde MTT hücre canlılık testi yapılarak Bölüm 3.5’de anlatıldığı gibi araştırılmıştır. Her bir tabakanın ve üç tabakalı iskelenin optik dansiteleri birbirlerinden farklı çıkmıştır (Şekil 4.19-22) ve hücre canlılıkları medyum kontrole (Şekil 4.23) göre hesaplanmıştır. Şekil 4.24’de pozitif kontrol DMSO ile muamele edilmiş hücrelerin resmi verilmiştir.



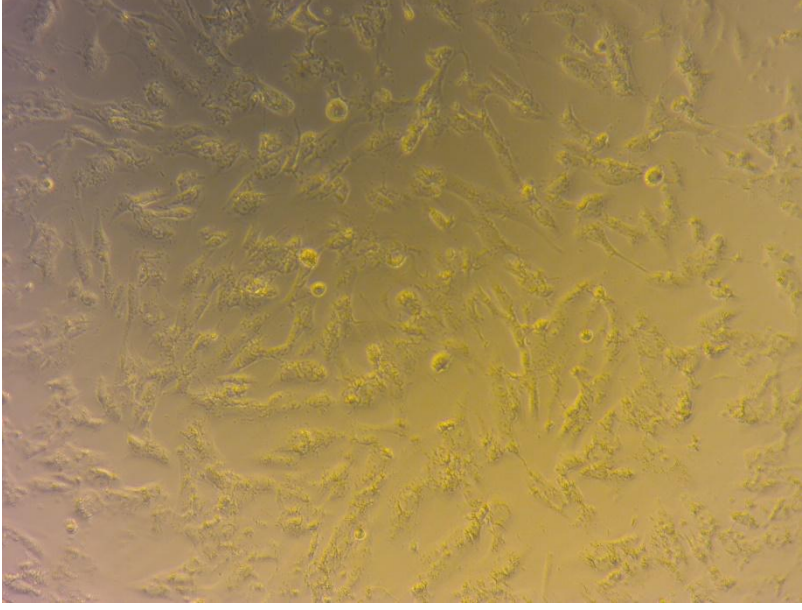
Şekil 4-19: % 100 kıkırdak tabakası doku iskelesine maruz kalan L929 hücrelerinin morfolojisi (x20).



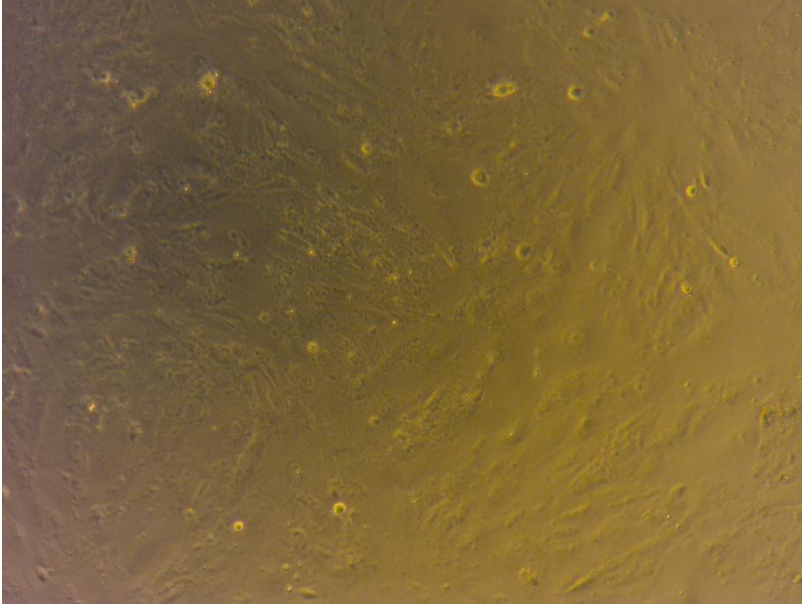
Şekil 4-20: % 100 ara yüz tabakası doku iskelesine maruz kalan L929 hücrelerinin morfolojisi (x20).



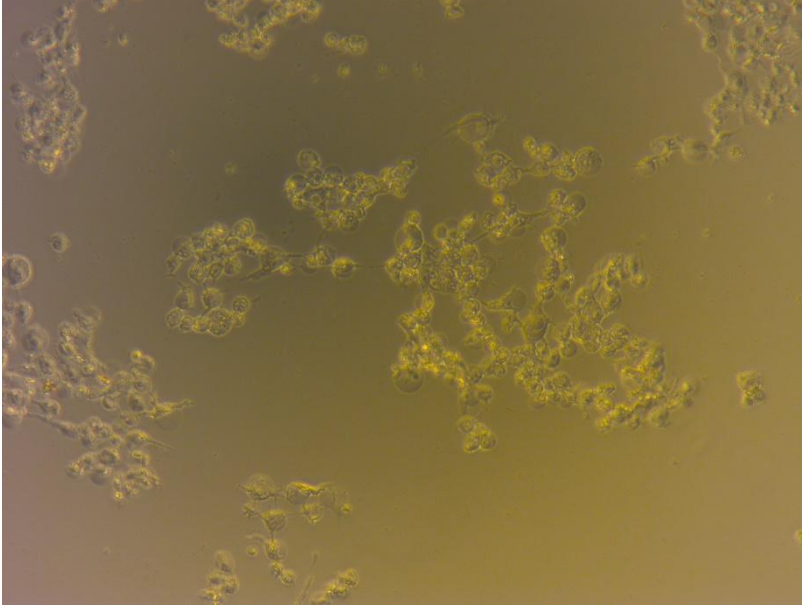
Şekil 4-21: % 100 subkondral tabakası doku iskelesine maruz kalan L929 hücrelerinin morfolojisi (x20)



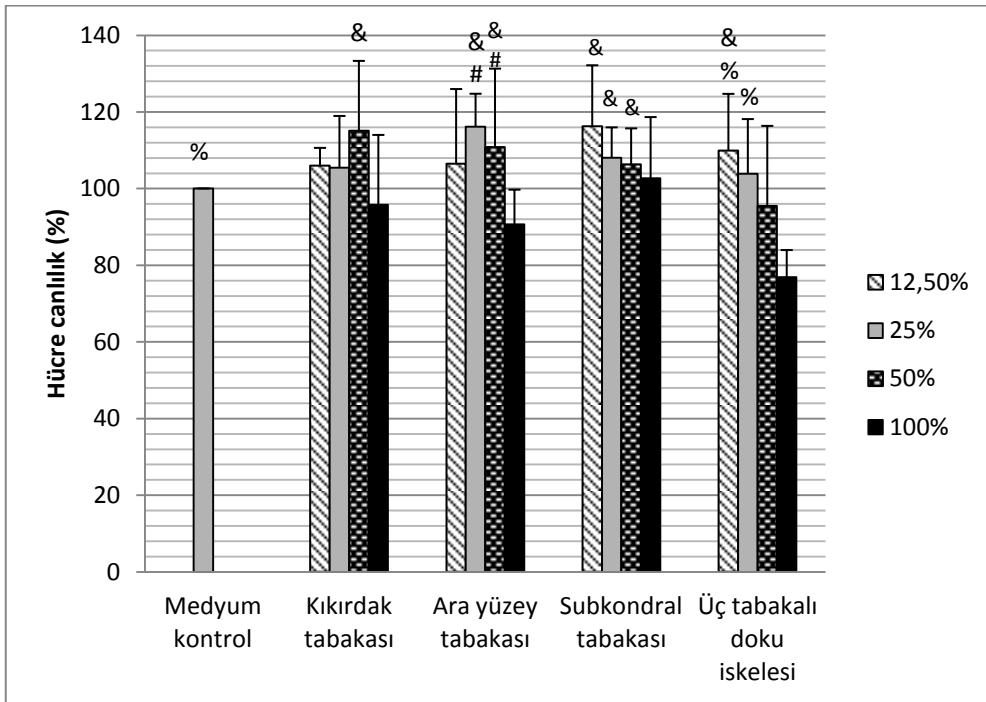
Şekil 4-22: % 100 Üç tabakalı doku iskelesine maruz kalan L929 hücrelerinin morfolojisi (x20)



Şekil 4-23: Medyum L929 hücrelerinin morfolojisi (x20).



Şekil 4-24: % 20 DMSO'ya maruz kalan L929 hücrelerinin morfolojisi (x20).



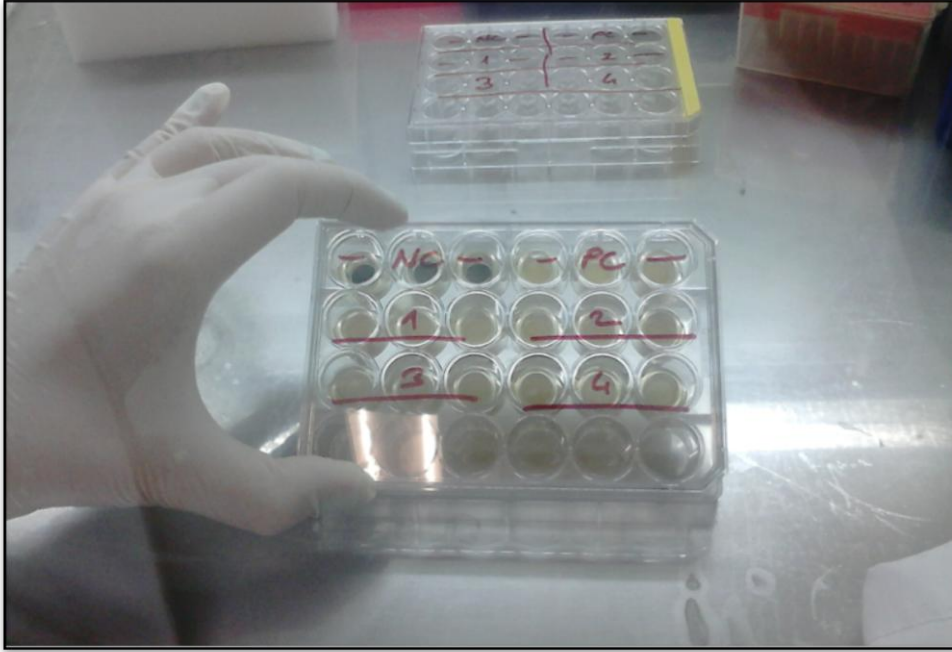
Şekil 4-25: Hücre canlılığının MTT analizi ile takibi sonuçları (İstatistiksel önem farklılığı, $n=3$, $p<0,05$, '&' Medyum kontrol ile karşılaştırma, '%' % 100 Üç tabakalı iskele ile karşılaştırma, '#' % 100 Ara yüz ile karşılaştırma).

İstatistiksel analizlerde varyanslar arası homojenlik testinde $p<0,05$ çıkmıştır dolayısıyla grupların normal dağılmadığı sonucuna varılmıştır. Bu nedenle nonparametrik test olan Kruskal Wallis uygulanmıştır ve $p<0,05$ bulunmuştur. Mann

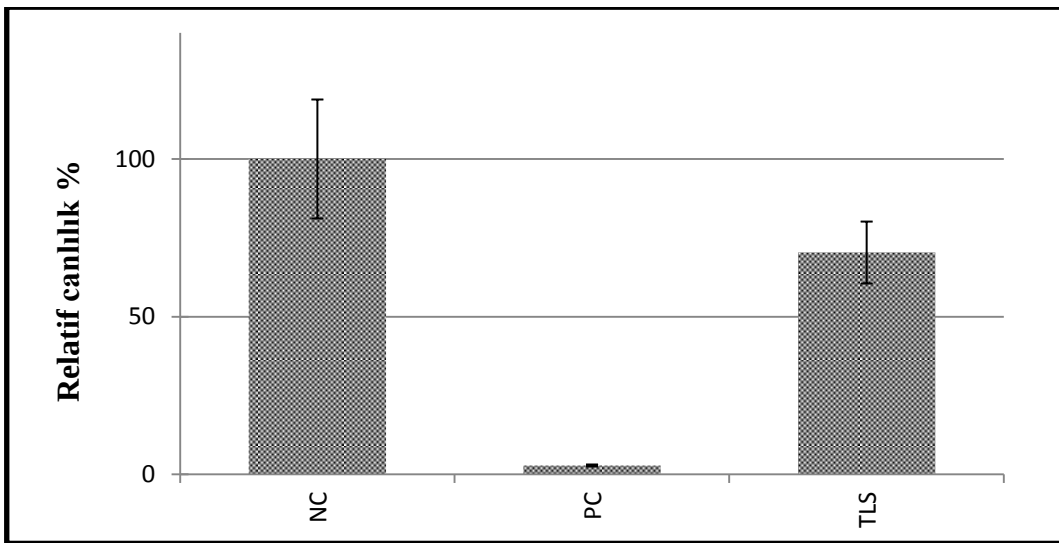
Whitney-U testi ile ikili karşılaştırmalar yapılmıştır. Sonuçlar her grubu kendi içerisinde konsantrasyonları (% 12,5, % 25, % 50 ve % 100), medyum kontrol ve pozitif kontrole göre bütün gruplar istatistiksel olarak ikili karşılaştırmalar yapıp yorumlanmıştır. Bütün ekstrakt konsantrasyonları ve medyum kontrol % 20 DMSO ile ikili karşılaştırıldığında aralarında istatistiksel olarak anlamlı farklılık görülmüştür ($p<0,05$). Medyum kontrol ile % 12,5 subkondral tabaka, % 12,5 üç tabakalı doku iskelesi, % 25 ara yüz tabakası ve % 25 subkondral tabaka, % 50 kıkırdak tabakası ve % 50 osteokondral tabaka arasında istatistiksel olarak anlamlı-farklılık bulunmuştur ($p< 0,05$) (Şekil 4.25). Bu sonuçlara göre çeşitli konsantrasyondaki doku iskeleleri hücre sayı artışını indüklemiştir. Ara yüz tabakasının 4 farklı konsantrasyonu karşılaştırıldığında, örneğin % 100'lük ekstrakt ile % 25 ve % 50'lik ekstraktları arasında anlamlılık bulunmuştur. Bu sonuçlara göre ara yüz tabakasının % 25 ve % 50 konsantrasyonları hücre sayısını % 100'e göre anlamlı bir şekilde arttırmıştır. Üç tabakalı iskelenin ekstraktları karşılaştırıldığında ise örneğin % 12,5 ve % 25'lik ekstraktları ile % 100'lük ekstraktı arasında anlamlı bir şekilde azalma görülmüştür. Bunlara ek olarak % 100 üç tabakalı iskele ile medyum kontrol karşılaştırıldığında hücre canlılığı anlamlı bir şekilde düştüğü fakat % 70 sınır kabul edilen değerin altına düşmediği bulunmuştur. En yüksek ekstrakt konsantrasyonlarına bakıldığında en yüksek canlılık oranı % 100 subkondral tabakada (% 102,70) en düşük % canlılık oranı ise üç tabakalı doku iskelesinde (% 76,89) görülmektedir. Sitotoksikite sonuçlarına göre bütün örneklerin % canlılık oranları % 70'in üstündedir dolayısıyla biyouyumlu bulunmuşlardır.

4.6 *In Vitro* Epiderm™ Deri İrritasyon Testi (SIT) Sonuçları

Epiderm SIT sonuçları Bölüm 3.6’da anlatıldığı gibi gerçekleştirilmiştir (Şekil 4.26). Bu test sonuçlarına göre üç tabakalı doku iskelesinin doku canlılık oranı % 70,9 bulunmuştur (Şekil 4.27).



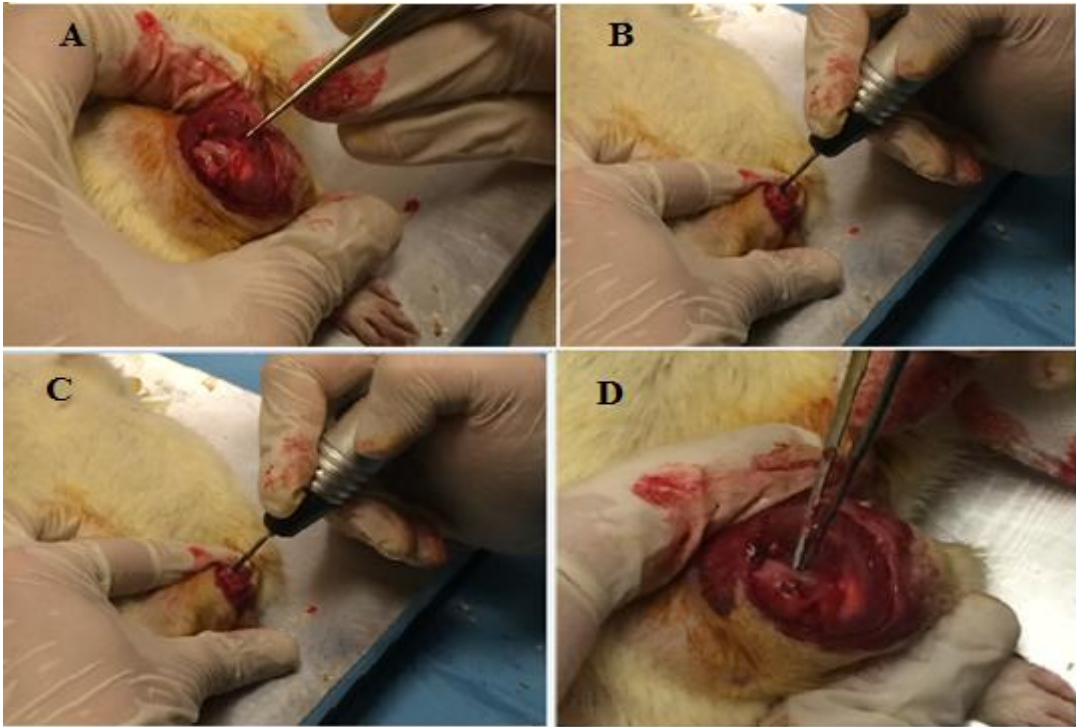
Şekil 4-26: Epiderm™ deri irritasyon testi plağı.



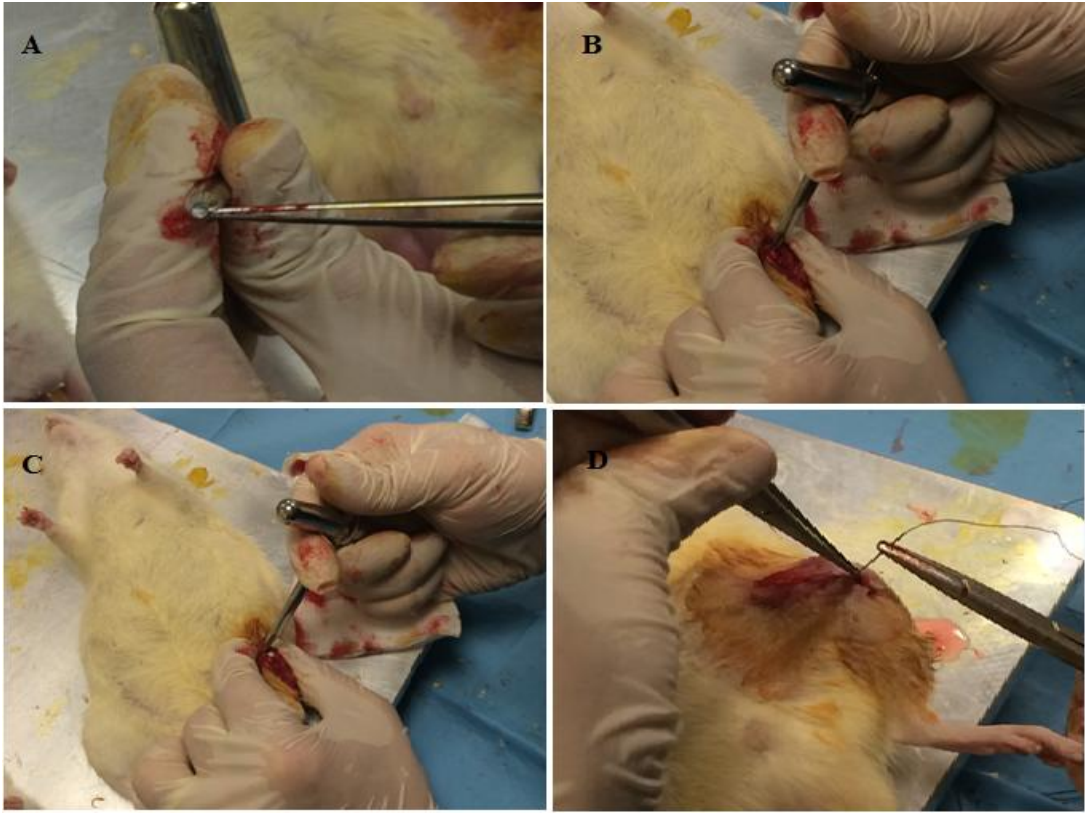
Şekil 4-27: Epiderm SIT sonuçları (NC: steril DPBS, PC: %5 SDC, TLS: Üç tabakalı doku iskelesi).

4.7 In Vivo Osteokondral Defekt Modeli Bulguları

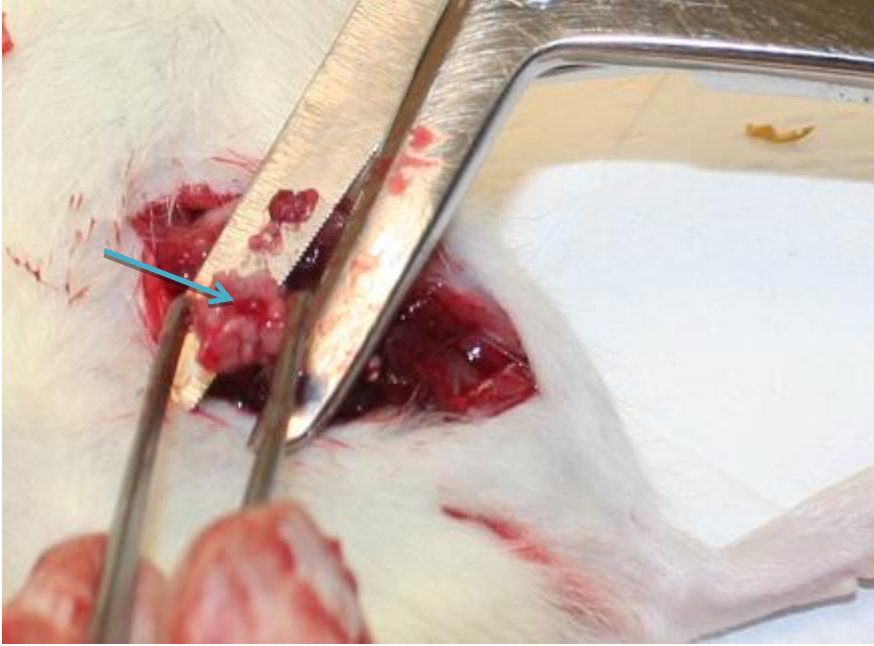
Canlı dokuda meydana gelebilecek reaksiyonları, biyouyumluluğu ve doku iyileşmesini izlemek için Bölüm 3.7’de anlatıldığı gibi sıçanların dizlerinde osteokondral defekt meydana getirilmiştir (Şekil 4.28) daha sonra polimer, TCP grubu ve PRP ve referans gruplarına doku iskeleleri yerleştirilmiştir (Şekil 4.29). Kontrol grubunun defekt bölgeleri boş bırakılırken PRP grubuna Bölüm 3.6.2’deki anlatıldığı gibi hazırlanmış PRP çözeltisi damla damla emdirilip doku iskeleleri defekt bölgesine yerleştirilmiştir. Altı hafta sonunda yüksek doz anestezi ile sıçanlar öldürülüp defekt bölgesi etrafındaki dokuyla birlikte alınmıştır (Şekil 4.30). Histopatolojik analiz için toluidin mavisi ve hematoksilin-eozin ile boyanan dokular ışık mikroskobu altında incelenerek skorlanmışlardır (Tablo 4.10) ve istatistiksel analiz yapılmıştır.



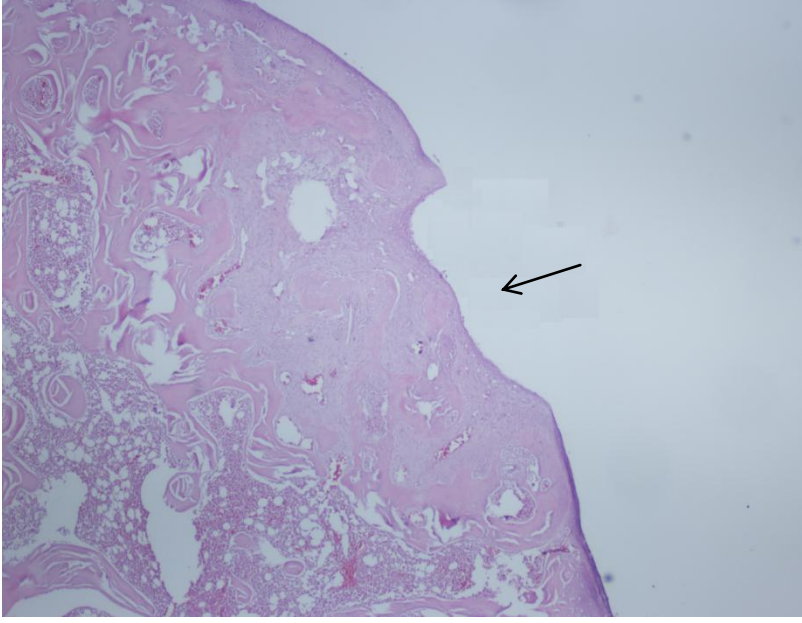
Şekil 4-28: Osteokondral defektin oluşturulma aşamalarının fotoğrafları.



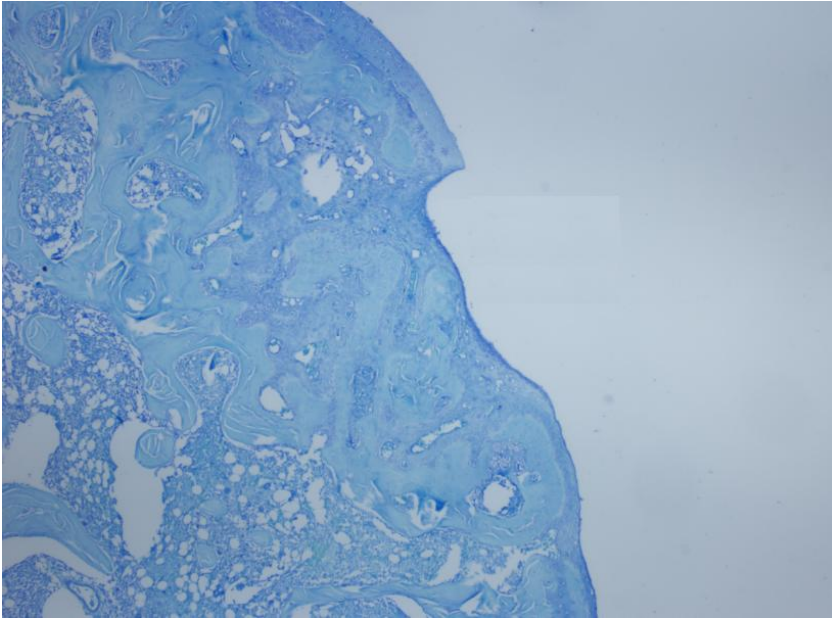
Şekil 4-29: Osteokondral defekte üç tabakalı doku iskelesinin yerleştirme aşamalarının fotoğrafları.



Şekil 4-30: Sakrifikasyon sonrası alınan kontrol grubuna ait doku örneği.

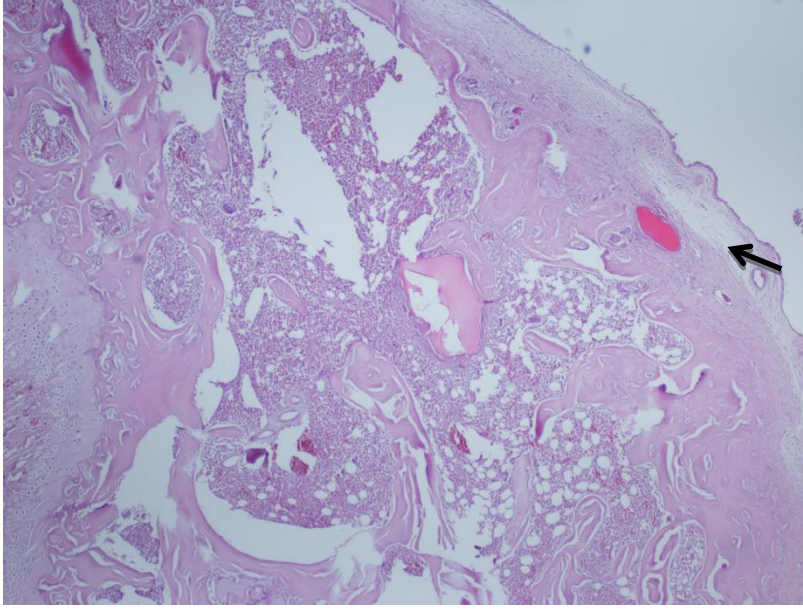


Şekil 4-31: Kontrol grubuna ait hematoksilien-eozin ile boyanmış doku örneği (X40).

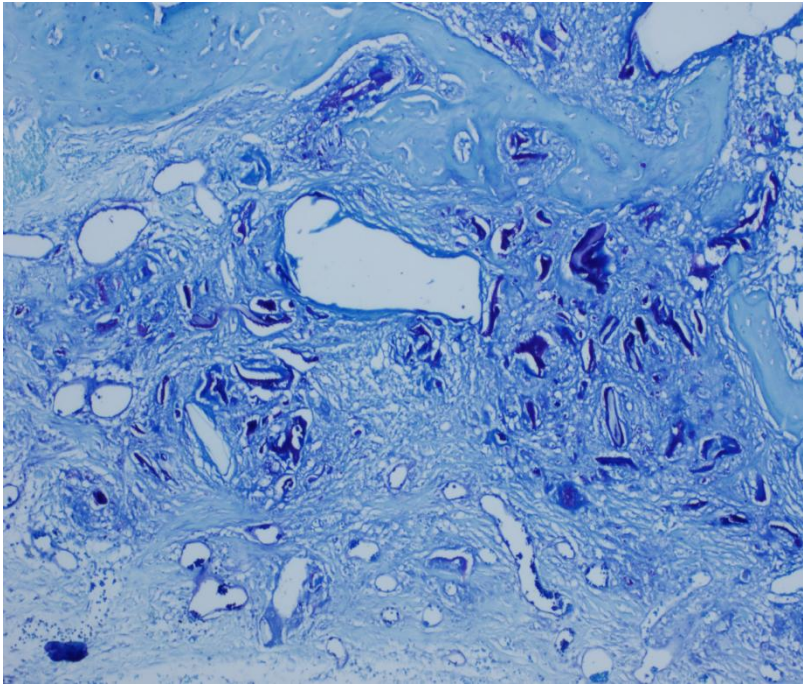


Şekil 4-32: Kontrol grubuna ait toluidin mavisi ile boyanmış doku örneği (x40).

Altı hafta sonunda kontrol grubuna ait dokularda defekt bölgesi hala boş olup çevresinde herhangi bir mikroskopik patolojik duruma rastlanmamıştır (Şekil 4.30-32).



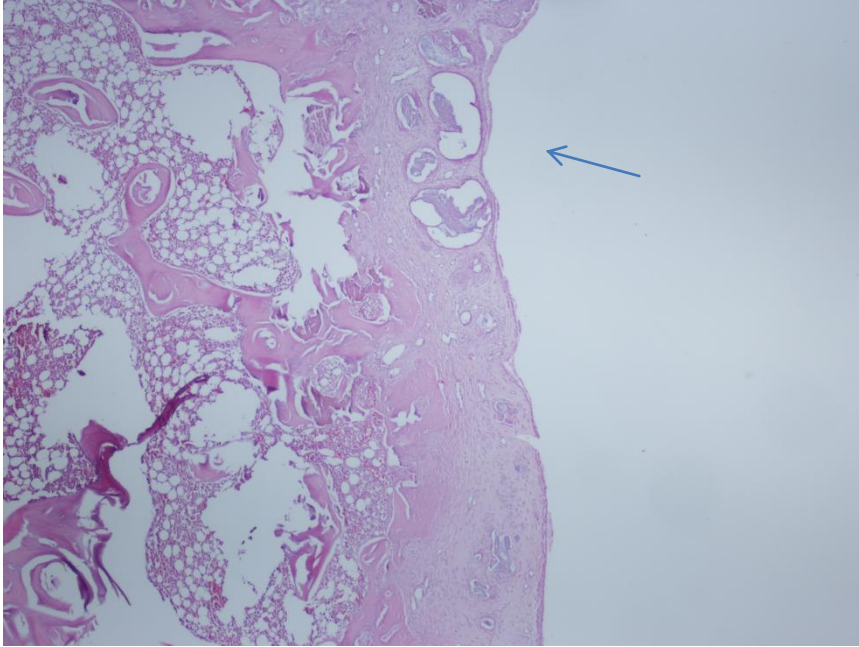
Şekil 4-33: Polimer grubuna ait hematoksilen-eozin ile boyanmış doku örneği (X40).



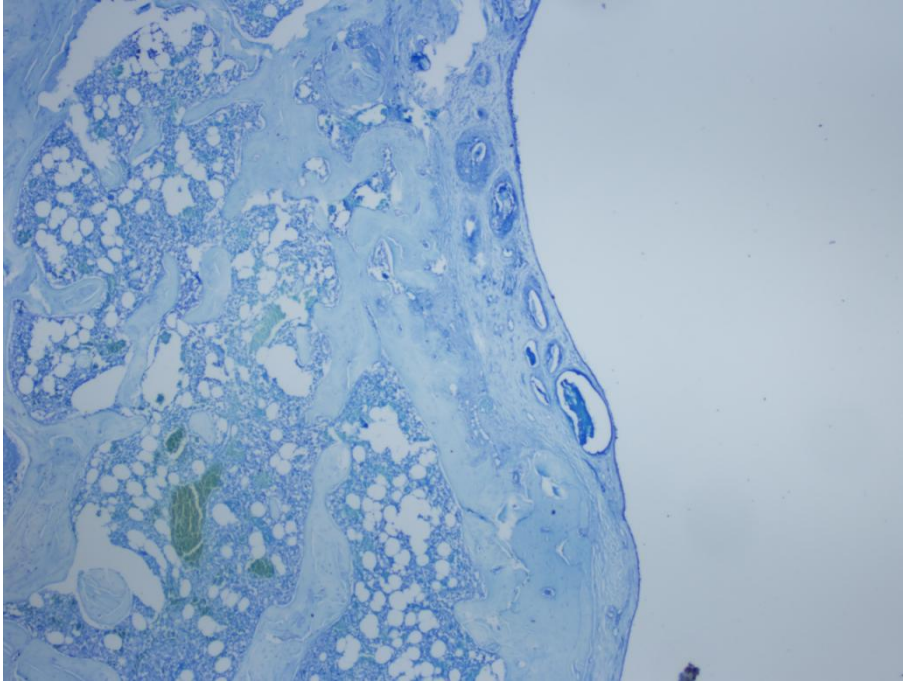
Şekil 4-34: Polimer grubuna ait toluidin mavisi ile boyanmış doku örneği (x40).

Şekil 4.33’de hematoksilen-eozin ile boyanmış polimer grubuna ait doku kesitinde polimer kalıntıları izlenmektedir. Yerleştirilen kitozan aljinat polielektrolit kompleksinde bölünmelerin meydana geldiği ve dejeneratif bir materyale dönüştüğü görülmüştür. Ayrıca bu kalıntıların kenarında yabancı cisim dev hücre reaksiyonları

görülmüştür. Şekil 4.34’de toluidin mavisiyle boyanmış kesitteki koyu mavi kısımlar polimer kalıntıları göstermektedir.



Şekil 4-35: Referans grubuna ait hematoksilen-eozin ile boyanmış doku örneği (X40).

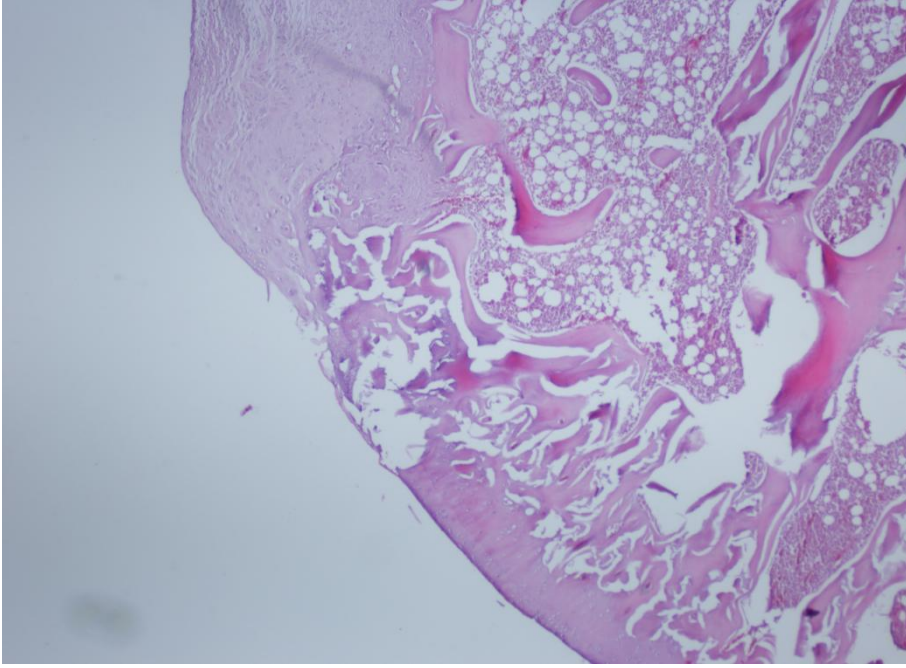


Şekil 4-36: Referans grubuna ait toluidin mavisi ile boyanmış doku örneği (X40).

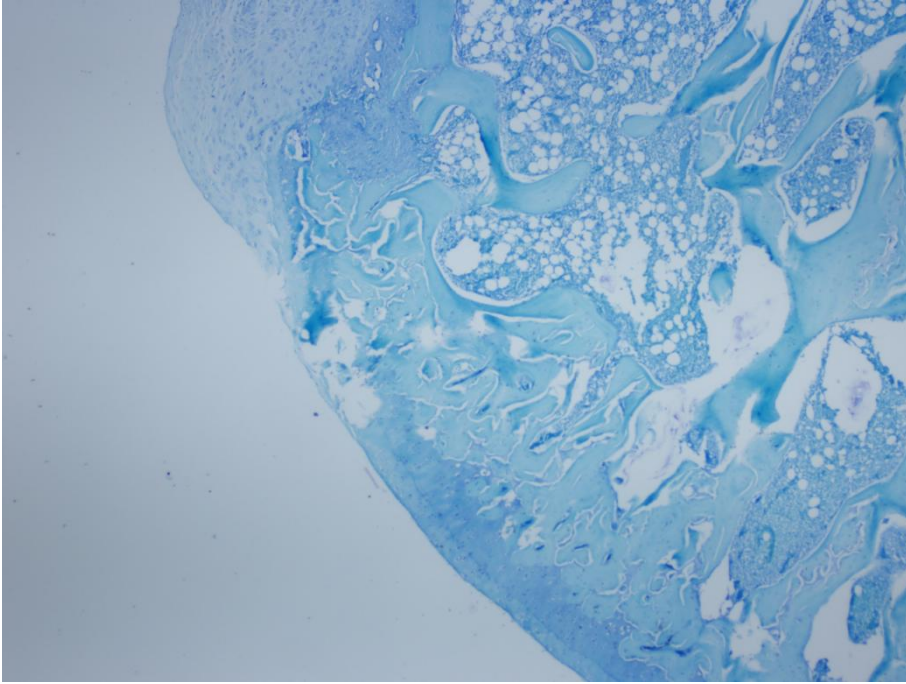
Şekil 4.35’de hematoksilen-eozin ile boyanmış referans grubuna ait doku kesitinde eklem bölgesinde tam kat kayıp ve referans madde artıkları görülmektedir. Şekil 4.36’da ise toluidin mavisi ile boyanmış kesitte referans madde artıkları izlenmektedir.



Şekil 4-37: Sakrifikasyon sonrası alınan üç tabakalı doku iskelesine ait doku örneği.



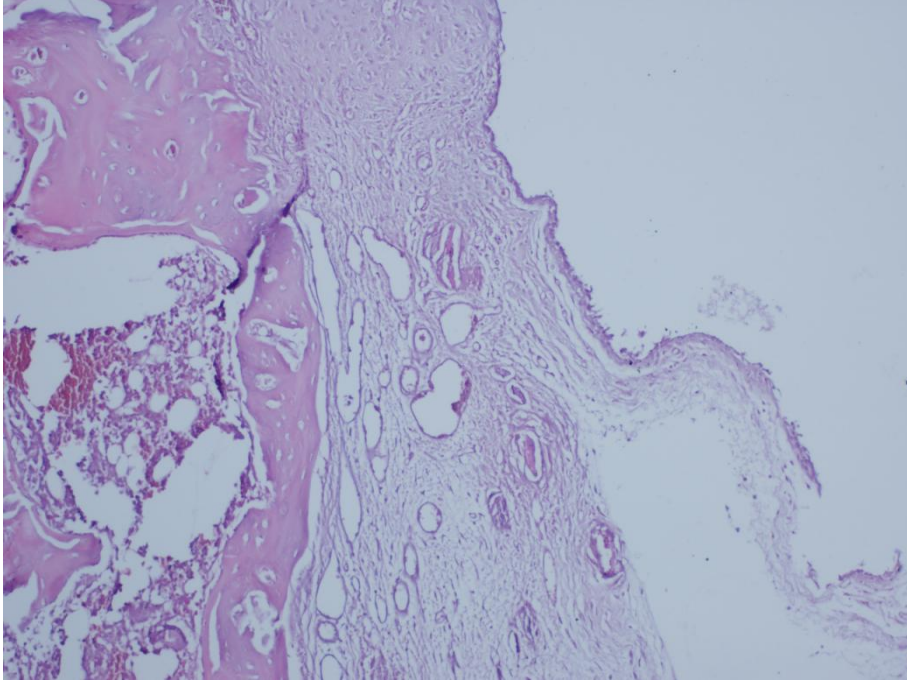
Şekil 4-38: TCP grubuna ait hematoksilen-eozin ile boyanmış doku örneği (X40).



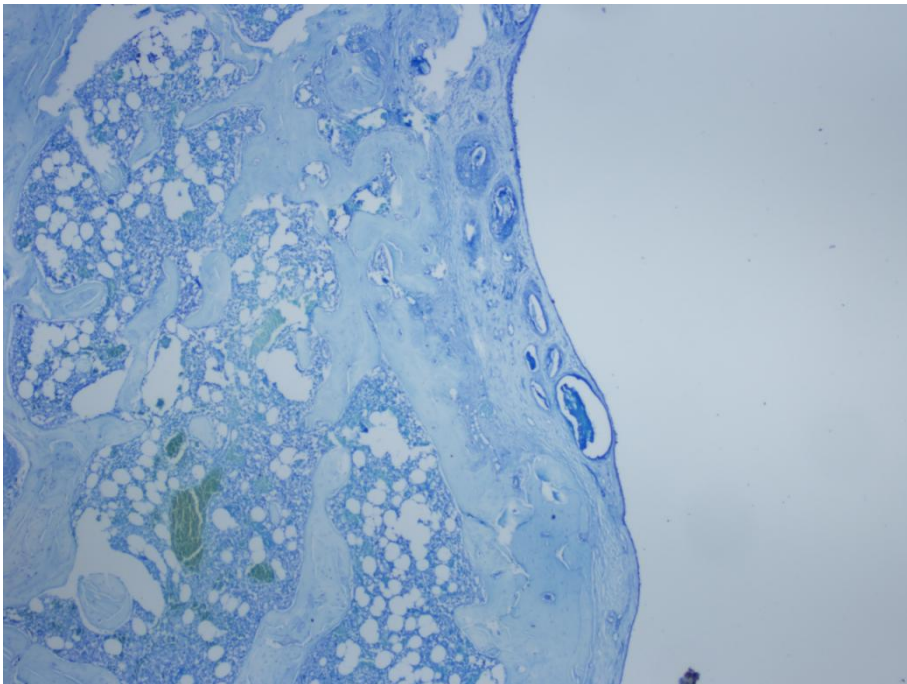
Şekil 4-39: TCP grubuna ait toluidin mavisiyle boyanmış doku örneği (X40).

Şekil 4.37’de sakrifikasyon sonrası alınan üç tabakalı doku iskelesi implante edilmiş diz görülmektedir ok ile işaretli kısım defektin olduğu bölgeye işaret etmektedir. Gözle incelendiğinde yerleştirilen iskelenin sertleşip hayvanın dokusuyla iç içe geçtiği gözlenmiştir. Şekil 4.38’deki TCP grubuna ait doku kesitinde gibi kıkırdak

kaybı olmadan iyileşme mevcut olup artık madde izlenmemekte ve hafif granülasyon dokusu oluşumu izlenmektedir. Şekil 4.39'da ise aynı kesitin toluidin mavisi ile boyanmış fotoğrafı görülmektedir.

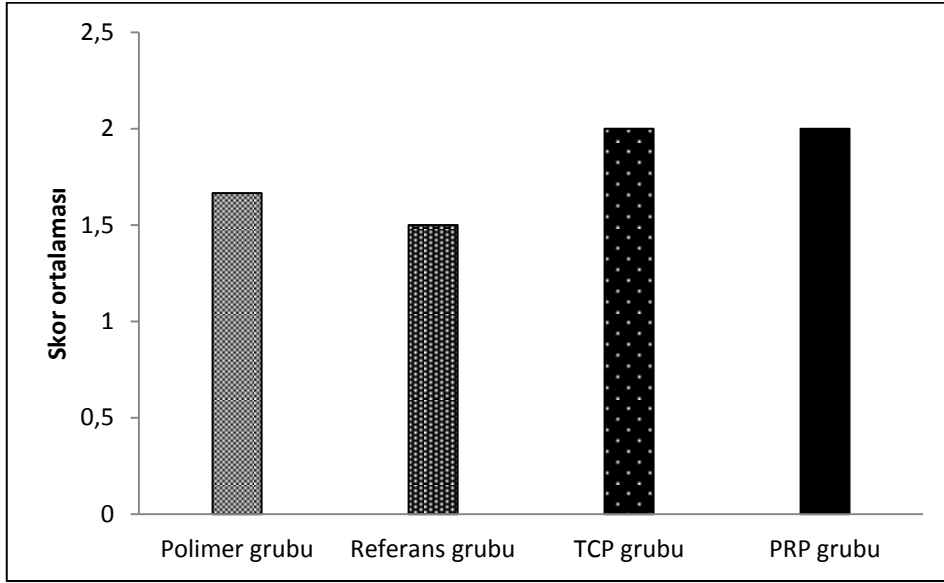


Şekil 4-40: PRP grubuna ait hematoksilin-eozin ile boyanmış doku örneği (X40).

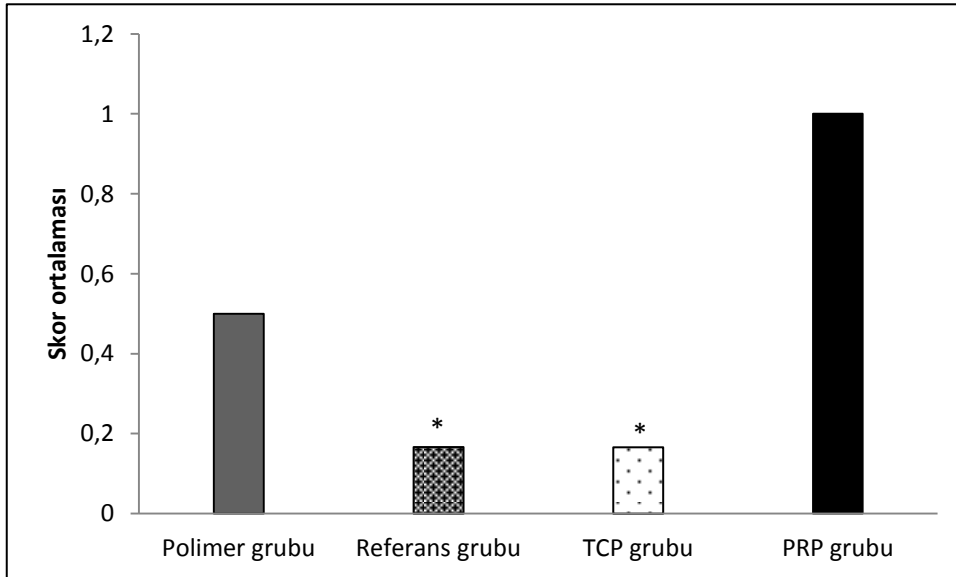


Şekil 4-41: PRP grubuna ait toluidin mavisine boyanmış doku örneği (x40).

Şekil 4.40’da hematoksilen-eozin ile boyanmış PRP grubuna ait doku kesitinde kırıldak kaybı, üç tabakalı doku iskelesi artıkları ve yabancı cisim dev hücre reaksiyonları görülmüştür. Şekil 4.41’de ise toluidin mavisi ile boyanmış kesitte üç tabakalı doku iskelesi artıkları izlenmektedir.



Şekil 4-42: Histopatolojik değerlendirme sonucu implant kalıntısı skorlarının oranları.



Şekil 4-43: Histopatolojik değerlendirme sonucu yabancı cisim dev hücre reaksiyonu skorlarının oranları.

Histopatolojik değerlendirmeler sonucunda grupların hiç birinde inflamasyon hücreleri izlenmemiştir. Yerleřtilen implant kalıntıları skorlanarak istatistiksel analizle karşılaştırılmıştır istatistiksel olarak anlamlılık bulunmadığı saptanmıştır (şekil 4.42). Aynı şekilde yabancı cisim dev hücre reaksiyonları skorlanıp istatistiksel analizleri yapılmıştır. Bu analizler sonucunda PRP grubu ile TCP ve referans grupları arasında anlamlı fark ($p<0,05$) bulunmuştur (şekil 4.43).

Tablo 4-10: ICRS’in histolojik değerlendirme sistemi ve grupların ICRS’in histolojik değerlendirme sistemini kullanarak skorlanması. (İstatistiksel önem farklılığı, $p \leq 0,05$, ‘*’ referans grubuyla karşılaştırma.)

ICRS kırıldak doku tedavi skor skalası	Polimer grubu	TCP grubu	PRP grubu	Referans grubu
I. Yüzey:				
3:Düzgün/Devamlı	3 bacak	2 bacak		1 bacak
0: Devamlılık yok/ Düzgün değil	3 bacak	4 bacak	6 bacak	5 bacak
II. Matriks:				
3: Hiyalin	1 bacak *			
2: miks; hyalin/fibrokartilaj	4 bacak	2 bacak *	2 bacak	
1: Fibrokartilaj	1 bacak	3 bacak	2 bacak	3 bacak
0: Fibröz		1 bacak	2 bacak	3 bacak
III. Hücre dağılımı:				
3: Columnar	1 bacak	1 bacak		
2: miks; kolumnar/cluster	4 bacak	2 bacak	1 bacak	1 bacak
1: Cluster	1 bacak	2 bacak	3 bacak	2 bacak
0: düzensiz tek tek hücreler		1 bacak	2 bacak	3 bacak
IV. Hücre popülasyon canlılığı :				
3: Canlı hücre popülasyonu baskın	5 bacak	3 bacak	3 bacak	1 bacak
1: kısmi canlılık 0: < % 10 canlılık	1 bacak	3 bacak	3 bacak	5 bacak
V. Subkondral kemik				
3: Normal		1 bacak	3 bacak	
2: Artmış yeniden şekillenme	5 bacak	4 bacak	1 bacak	3 bacak
1: Kemik nekrozu/granülasyon dokusu	1 bacak	1 bacak	2 bacak	3 bacak
0:Bağımsız/kırık/kallus				
VI. Minerilizasyon				
3: Normal	5 bacak	3 bacak	5 bacak	3 bacak
0: Anormal/uygun değil	1 bacak	3 bacak	1 bacak	3 bacak

Doku kesitleri boyandıktan sonra mikroskop altında grupların yüzey özellikleri, matriks yapıları, hücre dağılımları, subkondral kemik yapıları ve mineralizasyonları incelenerek ICRS'in histolojik değerlendirme sistemi kullanılarak skorlanmıştır (Tablo 4.10). Skorlar arasında yapılan istatistiksel analiz sonucunda matriks gelişimi TCP ve polimer gruplarında referans grubuna göre daha fazla görülmüştür ve istatistiksel olarak anlamlı fark bulunmuştur ($p \leq 0,05$). PRP grubu ile yapılan istatistiksel analizlerde anlamlı fark saptanmamıştır.

TARTIŞMA

5.1 Bileşenlerin Seçilmesi ve Konsantrasyonların Belirlenmesi İşleminin Değerlendirilmesi

Kıkırdak dokusunun kuru ağırlığının yaklaşık % 60'ını kollajenler, % 25-30'unu proteoglikanlar geri kalanını ise yapısal makromoleküllerden kollajen dışındaki proteinler ve glikoproteinler oluşturmaktadır (Buckwalter ve ark. 2005). Bu tez çalışmasında kıkırdak tabakasını taklit etmek için kitozan ve aljinat polielektrolit kompleksi oluşturulmuş ve CaCl_2 ile çapraz bağlanmıştır. Kemik yapısının organik bileşenleri kollajenler, kollajen olmayan diğer proteinler ve hücrelerdir, inorganik başlıca elementleri ise kalsiyum ve fosfattır (Korkusuz ve ark. 2011). Kemik dokusunun ağırlığının %70'ini inorganik maddeler oluşturur (Tampieri ve ark. 2003). β -TCP ile hazırlanmış doku iskelelerinin güçlü osteokondaktif etkileri ve osteojenik aktiviteleri olduğu, sıkıştırma ve gerilme direnci kuvvetlerinin doğal kanselous kemikle benzer olduğu bilinmektedir (Lu ve Zreiqat 2010). Doğal kemik mineral presipitasyonunda kemik oluşması kalsiyum ve fosfat konsantrasyonlarına bağlıdır (Szpalski ve ark. 2011). Bu nedenlerden dolayı bu tez çalışmasında ara yüz tabakası için % 40, subkondral tabaka için ise %70 oranında β -TCP kullanılmıştır.

5.2 Doku İskelelerinin Karakterizasyonu

5.2.1 Fourier Dönüşümlü Kızılötesi (FTIR) Spektroskopisi Analiz Bulguları

Şekil 4.1 verilen sonuçlara göre C/A/PEK'e ait spektrumda amit-I ve amit-II pikleri kaybolmuş yerini 1607 cm^{-1} 'de tek bir pik almıştır ve amino piki kaybolmuştur. Bu sonuçlarla kitozanın yapısındaki pozitif yüklü amino gruplarıyla ($-\text{NH}_2$) aljinatın yapısındaki negatif yüklü karbonil ($\text{C}=\text{O}$) gruplarının iyonik bağlandığı ve kitozan aljinat polielektrolit kompleksinin olduğu kanıtlanmıştır. Çapraz bağlanmış C/A/PEK'de ise amit-I ve amit-II piklerinin kaybolup yerine tek bir pikin oluşması (Şekil 4.1) aljinat yapısında bulunan karboksilik grupların kalsiyum ile çapraz bağlanarak matriks ağını oluşturduğunun göstergesidir. C/A/PEK/ β -TCP ait bulgularda ise 1607 cm^{-1} 'deki pikin kayması ve 1028 cm^{-1} 'de dalga boyunda oluşan pikin varlığı (Şekil 4.2) yapıya β -TCP'nin katıldığını göstermektedir (Han ve ark. 2010).

5.2.2 SEM Analizi Bulgularının Değerlendirilmesi

Doku iskeleleri kemik ve kıkırdak dokularının büyümesini ve damarlanmasını sağlamak için gözenekli bir yapıya sahip olmalıdır ve biyokompozit materyalinin içerisine hücre göçüne, yapışmasına ve çoğalmasına izin vermelidir. Gözenekli yapılar besin sağlanması ve atıkların taşınması için önemli bir parametredir. Kemik ve kıkırdak dokuları için geliştirilen doku iskelelerinin gözenek çapı ve şeklinin incelenmesi mikroskopik yöntemlerle yapılmaktadır. Bu çalışmada oluşturulan doku iskelelerinin gözenek yapıları ve boyutları SEM kullanılarak analiz edilmiştir. Yapılan bir çalışmada hidroksiapatit/kitozan/aljinat ile geliştirdikleri doku iskelelerinin hidroksiapatit miktarı arttıkça iskelelerin gözenek çaplarının azaldığı rapor edilmiştir. (Jin ve ark. 2008). Tablo 4.1’ de görüldüğü gibi β -TCP oranı arttıkça gözenek çapları azalmaktadır bu durum literatürle uyumlu bulunmuştur (Jin ve ark. 2008). Ayrıca P grubuna göre TM ve SC grubu formülasyonlarının yapılarının daha koyu renkte ve yüzeyleri kırışık formda olduğu gözlenmiştir (Şekil 4.5-6-8-9-11-12). Bu yapıların β -TCP’nin polielektrolit kompleksinin matriks yapısına girmesinden kaynaklandığı düşünülmektedir. SEM bulgularına göre kıkırdak tabakasının gözenek boyutları 100-250 μm arasında, ara yüzey için geliştirilen tabaka gözenek boyutu 93-170 μm ve subkondral tabaka gözenek boyutu ise 90-123 μm arasında değişmektedir. Cheung ve ark. (2007) derlemesinde kemik gelişmesi için optimum gözenek boyutunun 75 μm ile 250 μm arasında, fibro-kıkırdak için ise 200 μm ile 300 μm arasında değişmekte olduğu bildirilmiştir. Bu tez çalışmasında, geliştirilen üç tabakalı doku iskelesinin her bir tabakası uygulama bölgesine göre literatürde verilen değerlerle uyumlu bulunmuştur.

5.2.3 Şişme Testi

Doku iskelelerinin su tutma kapasiteleri fizyolojik sıvıların içerisine alınması, besin veya atık maddelerin taşınması için kritik parametrelerden biridir bu nedenle kitozan/aljinat matriksin hidrofilik karakterleri çok önemlidir. Aljinatın daha önce yapılan çalışmalarda kendi ağırlığının 200-300 kat su absorblama kapasitesinin olduğu bulunmuştur (Venkatesan ve ark 2014). Yapılan bir çalışmada karboksimetilselüloz ve kitozanla oluşturulan polielektrolit kompleksin içerisine kalsiyum fosfat ilave edildiğinde polielektrolit komplekse göre kalsiyum fosfatlı iskelelerin daha düşük şişme kabiliyetlerinin olduğu gösterilmiştir (Salama ve El-Sakhaw 2014). Mohamed ve ark. (2014) yaptığı çalışmada ise kitozan, jelatin ve hidroksiapatit ile oluşturdukları doku

iskelelerinin yapısında hidroksiapatit oranı arttıkça şişme yüzdelerinin azaldığını yani iskele yapısında kristal yapı oranı arttıkça su absorplama kapasitesinin düştüğünü rapor etmiştir. Bu tez çalışmasında pH 7.4 PBS içerisinde gerçekleştirilen şişme testi sonuçlarına göre, aljinat oranı arttıkça su absorplama kapasitesinin arttığı ortaya çıkmıştır. Ayrıca formülasyonlarda β -TCP miktarı arttıkça şişme oranlarının yüzdesinin azaldığı gözlenmiştir (Tablo 4.3). Şişme testi sonuçları literatürlerle uyumlu bulunmuştur.

5.2.4 Biyobozunma testi

Biyomateryallerin uzun süreli implantasyon süresi boyunca biyobozunma davranışları kritik rol oynamaktadır. Biyobozunan polimerlerden oluşturulan doku iskelelerinin implante oldukları bölgede yeni doku oluşumuna kadar mekanik özelliklerini sürdürmeleri ve biyobozunma ürünlerinin iz bırakmadan yok olması beklenmektedir (Venkatesan ve ark. 2012). Kitozan gibi doğal polimerlerin yapısı genelde hidrofilik ortamda stabil değildir sulu ortamda bozunmaya uğrarlar. Kitozan bazlı polimerlerle oluşturulan doku iskeleleri yüzeyine hücre tutunmasını sağlayan ve biyobozunarak yeni oluşan dokuya kütle transferi yapan yapıdadırlar. Bu tezde biyobozunma deneylerinde *in vivo* biyobozunmadan sorumlu birincil enzim lizozim enzimi kullanılmıştır. Lizozim enzimi kitozan zinciri üzerinde bulunan N-asetilglukosamin gruplarını hidroliz etmektedir (Sowjanya ve ark. 2013). Çapraz bağlanmış kitozan ve aljinatın polielektrolit yapısından dolayı kemiğin matriks yapısına benzemektedir. Tablo 4.4'e bakıldığında SC grubundaki biyobozunma diğer tabakalardan daha fazla bulunmuştur. Bu grupta β -TCP içerik oranı polimer matriks oranına göre daha fazla olduğu için (% 70 β -TCP/% 30 polimer) kitozan ve aljinatın polielektrolit yapısı bozulmuş olabileceği düşünülmektedir. TM grubu sonuçlarına bakıldığında ise polielektrolit kompleks korunarak β -TCP'nin matriks yapısına girmiş olduğu sonucuna varılmıştır. Mohamed ve ark. (2014) yaptığı çalışmada ise kitozan, jelatin ve hidroksiapatit ile oluşturdukları doku iskelelerinin yapısında hidroksiapatit oranı arttıkça biyobozunmanın arttığını rapor etmişlerdir. Bu çalışma sonuçlarının bizim çalışmamızla uyumlu olduğu görülmüştür.

5.2.5 Mekanik Dayanıklılık Testi

Kemik ve kırıldak doku iskelelerinin sahip olması gereken en önemli özelliklerden biri yeterli mekanik dayanıklılıktır. Bu iskelelerin maruz kalacağı yüklere

dayanıklı olması beklenmektedir. Oluşturulan doku iskeleleri bu mekanik özelliklerini yerlerine yeni kemik dokusu gelişimi tamamlanana kadar korumalıdır. Dolayısıyla doku iskelelerinin mekanik dayanıklılık özelliklerinin araştırılması ve geliştirilmesi çok önemlidir. İnsan vücudunda ekstrasellüler matriks dokuya sertlik ve elastikiyet gibi mekanik dayanıklılık özellikleri sağlamaktadır. Ekstrasellüler proteoglikanlar ile kollajen ve elastin gibi fibröz proteinler, bir çapraz bağ ağ yapıda örülürler. Böylece ekstrasellüler matriksin dayanıklılık ve elastikiyeti sağlanır. Kollajen, kondroitin sülfatla 1:1 oranında birleşerek kıkırdığı oluştururlar.

Yapılan çalışmalarda doğal polimerlerin sentetik polimerlere oranla daha iyi biyolojik özelliklere sahip olduğu gösterilmiştir. En çok kullanılan doğal polimerlerden biri kitozandır. Kitozanın çok iyi biyouyumluluk özelliğine sahip olmasıyla beraber zayıf mekanik özellikleri olması birçok çalışmayla ispat edilmiştir (Liu ve Ma 2004; Li ve ark. 2005). Bu tez çalışmasında kitozanın mekanik özelliklerini düzeltmek için aljinat ile polielektrolit kompleks oluşturulmuştur, bu kompleks kıkırdak tabakasının ekstrasellüler matriksini taklit etmek için geliştirilmiştir. Ayrıca bu dokunun fibröz proteinlerin çapraz bağ ağ yapısını taklit etmek ve mekanik dayanıklılık gücünü arttırmak için aljinat üzerinde en iyi iyonik çapraz bağlamayı sağlayan CaCl_2 ile çapraz bağlanması sağlanmıştır (Sun ve Tan 2013). Tablo 4.5’de gözlendiği gibi P grubunda aljinat konsantrasyonu arttıkça yırtılma için gereken kuvvet artmaktadır. Bu bulguların çapraz bağlanmış aljinatın daha iyi mekanik özelliklere sahip olmasından kaynaklandığı düşünülmektedir. 2010 yılında Han ve ark. yaptığı çalışmada Ca^{2+} ile çapraz bağlamış aljinatın mekanik özelliklerinin arttığını rapor etmişlerdir. Sherwood ve ark. (2002) yaptıkları çalışmada ise polimer (polimer/ β -TCP) oranı arttıkça elastikiyetin arttığını göstermişlerdir. Bölüm 4.2.4’de verilen sonuçlara göre genel olarak P grubunun en yüksek elastikiyete sahip olduğu söylenebilir. Shuai ve ark. farklı oranlarda poli(laktik-ko-glikolik) ve HA kullanarak oluşturdukları doku iskelelerine sıkıştırma kuvveti testi uygulamışlardır. Bu test sonuçlarında HA miktarı arttıkça sıkıştırma kuvveti arttığını gözlemlemişlerdir fakat HA miktarının daha fazla arttırılması sıkıştırma kuvvetinde azalmaya yol açmıştır. Tablo 4.5’e bakıldığında grupların en yüksek gerilim dayanıklılığına sahip konsantrasyonlarının gerilim dayanıklılığı $\text{TM7}(6,08) > \text{P5}(5,85) > \text{SC7}(4,59)$ şeklindedir. β -TCP içermeyen P grubuna göre % 40 β -TCP içeren TM grubunun gerilim dayanıklılığı fazladır. TM grubuna göre β -TCP miktarı arttırılmış SC grubunun gerilim dayanıklılığı düşme göstermiştir. Bu bulgu Shuai ve ark. bulgularını

destekler niteliktedir. Mekanik dayanıklılık testi bulgularının literatürle uyumlu olduğu sonucuna varılmıştır.

5.3 Model İlaç Dekametazonun Salım Sonuçlarının Değerlendirilmesi

Deksametazon güçlü antiinflamatuvar ve antiproliferatif etkiye sahip glukokortikoid türevi bir ilaçtır. Büyüme hormonuna benzer yapıya sahip olması nedeniyle bu tez çalışmasında deksametazon model ilaç olarak kullanılmıştır. Dekametazonun seçilmesinin bir diğer nedeni ise noniyonize formda olan ilaçların salım mekanizmasını aydınlatmak için kullanılmış olmasıdır (Liao ve ark. 2005). Analizler UV spektrofotometre kullanılarak gerçekleştirilmiştir. Dekametazonun maksimum absorbans verdiği dalga boyu (λ_{max}) 242 nm olarak bulunmuştur. Bulunan değerin literatürlerde belirtilen değerle uyumlu olduğu görülmüştür (Duarte ve ark. 2009). Uygulanan yöntemin doğruluğu, kesinliği ve beklenen sonucu verdiğini kanıtlamak için yöntem validasyonu yapılmıştır. Doğrusallık, geri kazanım, yöntem tekrar edilebilirliği ve tekrar elde edilebilirlik gibi validasyon deneyleri yapılarak kullanılan miktar tayini yönteminin geçerliliği ispatlanmıştır. Daha sonra hazırlanan üç tabakalı doku iskelesine gömme tekniği kullanılarak deksametazon yüklenmiştir. Bu iskelenin enkapsülasyon etkinliği hesaplanmıştır ve % 78,661 oranında enkapsülasyon kapasitesinin olduğu bulunmuştur. Yapılan salım çalışmalarında deksametazonun tamamı 72 saat içerisinde salınmıştır. İlaç salımı başlangıçta yüksek (3. saat % 78,275), sonrasında yavaş etkin madde salımı şeklinde seyir etmiştir. Doku iskelesinin iç kısımlarına kolaylıkla girmeye başlayan çözeltinin etkin madde salımını hızlandırdığı % 78,275'e ulaştıktan sonra ise muhtemelen azalan etkin madde miktarına bağlı olarak deksametazon salımında yavaşlama meydana geldiği düşünülmektedir.

Yapılan kinetik hesaplamalarda beklendiği üzere polimerik sistemlerin çoğunlukla uyum gösterdiği Higuchi ($r^2=0,796$), Hixson Crowell ($r^2=0,936$), Korsmeyer-Peppas ($r^2=0,999$) kinetik modellerinde en yüksek korelasyon katsayısı elde edilmiştir. Hixson crowell korelasyon katsayısı diğer modellere göre çok daha yüksek bulunduğu için bu kinetik profiline daha uyumlu olduğu şeklinde yorumlanmıştır. Korsmeyer-Peppas kinetik hesaplamalarında 'n' değeri 0,263 bulunması nedeniyle salım mekanizmasında Fick'e uyan difüzyon kontrollü salımın etkili olduğu düşünülmektedir. Salım derişim gradyanına göre gerçekleşmektedir ve etkin maddenin moleküler özelliğine bağlıdır. Tıgılı ve ark. (2009) yaptığı bir çalışmada kitozana

gömme tekniği ile deksametazon yüklenmiştir ve salım profillerinin Fick'e uyan difüzyona uyumlu olduğu bulguları bu çalışmayı destekler niteliktedir. Yapılan diğer bir çalışmada ise deksametazon yüklü liflerden salım çalışması yapılmıştır sonuç olarak yine Fick'e uyan difüzyonla uyumlu salım profili elde edilmiştir. Polimerik taşıyıcı sistemlerde genelde şişme ve biyobozunma kontrollü salım profilleri gözlenmektedir. Polimerik matriks/gömme sistemlerinde kullanılan polimerik matriks ilaca göre inert ise dissolüsyon ortamı matriksin içerisine girer ve ilaç polimerin gözeneklerinden difüze olur (Nokhodchi ve ark. 2012). Bu çalışmada Fick'le uyumlu salım profilinin ortaya çıkması deksametazonun küçük moleküler ağırlığa sahip olmasından kaynaklandığı düşünülmektedir.

5.4 Doku İskelelerinin *In Vitro* Sitotoksitesisi ve Epiderm™ SIT Bulgularının Değerlendirilmesi

Biyometaryallerin doğrudan canlı dokuya temas etmeleri nedeniyle piyasaya sürülmeden önce biyouyumluk testlerinin tamamlanmış olması ve ISO standartlarına uygun olmaları gerekmektedir. Fizikokimyasal özelliklerinin yanı sıra biyolojik özelliklerinin de canlı dokuyla uyumlu olması önemlidir. Biyometaryalin biyolojik olarak uyumlu olduğunu göstermek için başlangıç testi olarak *in vitro* hücre kültürü testleri kullanılmaktadır. Bu tez çalışmasında ISO 10993-5 standardında önerildiği gibi L929 fare fibroblast hücreleri kullanılarak hücre canlılık testi yapılmıştır. Bölüm 4.5'de verilen Şekil 4.19-22'ye baktığımızda fibroblast hücreleri sağlıklı, iğ şeklinde, sitoplazmik uzantılara sahip ve yaygın tek tabaka oluşturdıkları ve müdahale edilmemiş medyum kontrolle aynı yapıya sahip oldukları görülmektedir. Şekil 4.24'deki DMSO ile inkübe edilmiş hücreler (pozitif kontrol) yuvarlak formda kalıp, flaska yapışmamıştır ve % relatif hücre canlılık oranı % 12,08 bulunmuştur.

Kitozan ve aljinat en çok kullanılan doğal polimerlerdendir. Dessi ve ark. (2013) yaptıkları bir çalışmada kemik yapısını taklit etmesi için geliştirdikleri kitozan ve TCP'li doku iskelelerinde farklı konsantrasyonlarda TCP kullanarak hücre canlılık ve proliferasyon etkilerini MG63 osteoblast hücre hattını kullanarak araştırmışlardır. Bu çalışma sonunda TCP miktarı arttıkça hücre canlılık oranlarının arttığını bulmuşlardır. TCP varlığının osteojenik hücre büyümesine, yapışmasına ve proliferasyonuna neden olduğunu rapor etmişlerdir. Şekil 4.25'deki grafikte % 100 ekstraksiyon konsantrasyonundaki örnek grupları karşılaştırıldığında en yüksek hücre canlılık oranı

en yüksek β -TCP içeren subkondral tabaka grubunda saptanmış ve bu sonuçların Dessi ve ark. sonuçlarıyla paralel olduğu görülmüştür. Swain ve Sarkar'ın (2014) yaptıkları çalışmada ise L929 fibroblast hücre hattı kullanarak nanohidroksiapatit/jelatin/polivinil alkol ile oluşturdukları doku iskelesinin sitotoksitesini indirekt yöntem kullanarak araştırmışlardır. En yüksek sitotoksiste en yüksek konsantrasyondaki ekstraktla muamele edilen hücrelerde görülmüştür. Bu çalışmada % 40 hücre canlılığı bile sitotoksik kabul edilmemiştir. Üç tabakalı doku iskelelerinin ekstrakt konsantrasyonları arttıkça hücre canlılık oranlarında hafif bir azalma olsa da % 76,89'un altına düşmemiştir. Hücreler üç tabakalı doku iskelesinin %100'lük ekstraktı ile muamele edildiğinde hücre canlılık oranının medyum kontrole göre anlamlı olarak ($p<0,05$) azaldığı ancak hücre canlılığının biyoyumluluk testlerinde sınır kabul edilen %70'in üzerinde olduğu gözlenmiştir. Kullanılan hammaddelerin yanı sıra üretim tekniği, kullanılan çözücüler ve yardımcı maddeler doku iskelesinin biyoyumluluğunu değiştirebilmektedir. Yapılan bir çalışmada kollajen ve TCP kullanılarak hazırlanan doku iskelesinin sitotoksitesi L929 fibroblast hücre hattı kullanılarak araştırılmıştır. Doku iskelesinin üretimi aşamasında hidroklorik asit ve çapraz bağlayıcı ajan olan glutaraldehit kullanılmasına rağmen üretilen doku iskeleleri sitotoksik çıkmadığı şeklinde yorumlanmıştır (Zou ve ark. 2005). Vittelova ve ark. (2014) geliştirdikleri deri doku iskelelerinin biyoyumluluklarını fare fibroblastları kullanarak incelemişlerdir. Çalışmalar sonucunda en düşük hücre canlılığı asetik asit kullanarak ürettikleri iskelede bulunmuştur. Bu sonucun asetik asit kalıntısından kaynaklanabileceğini rapor etmişlerdir. Yapılan bir diğer çalışmada ise aljinat filmini CaCl_2 ile çapraz bağlamışlardır. Oluşturulan filme hücre canlılık testi yapılmıştır. Çalışma sonucunda hücre canlılığının düşük çıkma nedenini CaCl_2 artıklarına doğrudan temas eden hücrelerin yaşamaması olarak göstermişlerdir (Lee ve ark. 2013). Bu tez çalışmasında, üretim aşamasında çözücü olarak asetik asit ve çapraz bağlama materyali olarak CaCl_2 kullanılmıştır daha sonra etanol ve su yardımıyla bu maddeler uzaklaştırılmaya çalışılmıştır. Sitotoksiste test sonuçlarına göre bu maddelerin doku iskelesinden tamamen uzaklaştırıldığı düşünülmektedir. Şekil 4.25'e bakıldığında konsantrasyonlar arası ve gruplar arası istatistiksel olarak anlamlı farklar görüldüğü fakat hiçbir grup ya da konsantrasyonun % 70 hücre canlılık oranı sınırının altına inmediği görülmektedir. Yapılan sitotoksiste çalışmaları sonucunda, üretilen üç tabakalı iskelenin ve her bir tabakasının sitotoksik olmadığı bulunmuştur.

Epiderm SIT sonuçlarına bakıldığında (Şekil 4.26) üç tabakalı doku iskelesinin negatif kontrole göre relatif doku canlılık oranı % 70,9 çıkmıştır. Üç tabakalı iskele irritan değildir çünkü bir kimyasalın irritan kabul edilebilmesi için relatif doku canlılığının % 50'nin altında çıkması gerekmektedir (Kandárová ve ark. 2009). Hem sitotoksiste hem de iritasyon çalışmalarında oluşturulan iskelenin biyuyumlu olduğu ve biyometaryal olarak kullanılabileceği sonucuna varılmıştır.

5.5 *In Vivo* Osteokondral Defekt Modeli Bulgularının Değerlendirilmesi

Kitozan ve aljinat biyobozunabilen, biyuyumlu ve düşük imünojenik cevaba ve ekstraselüler matrikste bulunan glikozaminoglikanlara benzeyen yapılara sahip olan iki doğal polimerdir. Kitozan osteoblastların büyümesini destekleyen, mineralize matriks oluşmasını, kemik oluşumunu destekleyen bir yapıya sahip olan polisakkarit türevi katyonik bir polimerdir (Di Martino ve ark. 2005; Rinaudo 2008). Aljinat ise anyonik yapıda polisakkarit türevi polimerdir. Kitozanın tek başına biyuyumluluk özellikleri çok iyi iken mekanik özellikleri zayıftır, aljinat ise negatif yüklü olduğu için hücreler aljinata bağlanmak istemezler bu nedenlerden dolayı bu tez çalışmasında kıkırdak tabakayı taklit etmek amacıyla aljinat ve kitozanla polielektrolit kompleksi oluşturulmuştur. Tablo 4.11'de verildiği gibi kitozan aljinat polielektrolit kompleksi yerleştirilmiş polimer grubu ile üç tabakalı doku iskelesi yerleştirilmiş TCP grubunun matriks oluşumları referans grubuna göre daha iyi bulunmuştur ve istatistiksel olarak anlamlı fark çıkmıştır. Bu durumun kitozan ve aljinattan kaynaklandığı düşünülmektedir. Florczyk ve ark. (2013) yaptıkları çalışmada kitozan ve aljinat polielektrolit kompleksine kemik morfogenetik proteini ve mezenkimal kök hücre yükleyerek sıçanların kafataslarında oluşturdukları defekt bölgesine yerleştirmişlerdir. Bu çalışma sonucunda söz konusu polielektrolit kompleksinin kemik dokusu yerine kullanılabileceği anlaşılmıştır. Histopatolojik değerlendirmelerde TCP ve polimer gruplarının yüzey özellikleri, matriks yapıları, hücre dağılımları, subkondral kemik yapıları ve mineralizasyonlarının skor ortalamalarının referansa göre yüksek olduğu görülmüştür fakat aralarında matriks oluşumu hariç istatistiksel fark bulunamamıştır. Fizyolojik yükü düşük oldukça küçük canlı olan sıçanın bu parametreler için sağlıklı bir sonuç elde edilmesine izin vermediği düşünülmektedir. Daha büyük deney hayvanı kullanılarak, daha çok denek sayısı ile deneyler tekrar edildiğinde gruplar arasında daha fazla anlamlılığın oluşabileceği düşünülmektedir.

Hasarlı doku iyileşme sürecinde granülasyon dokusu, implantın etrafını sararken yabancı cisim dev hücreleri implantın yüzeyine yapışırlar. Eğer bu hücreler doku iskelesini fagosite edemezlerse yabancı cisim implantı tamamen izole etmek için fibröz doku kapsül şeklinde implantın etrafını sarar. Histopatolojik incelemeler sonucunda hiçbir hayvanın defekt bölgesinde ya da etrafında inflamasyon hücrelerine ve fibröz kapsül oluşumuna rastlanmamıştır ve implantların etrafında normal yabancı cisim dev hücre reaksiyonları gözlenmiştir. Ayrıca kesitlerde hem polimer grubunda, hem de üç tabakalı doku iskelesinin kalıntılarının bulunması fagositik hücrelerin implant materyalini parçaladığı ve yeni doku oluşumu ile kalıntıların uyum içerisinde olduğu gözlenmiştir. Bu durum biyobozunur polimerler ve β -TCP'nin kullanılmasından kaynaklanmaktadır. Elde edilen histopatolojik görüntülerde üç tabakalı iskelenin biyobozunma zamanının iyi ayarlanmış olduğu görülmektedir. Biyobozunur bir implantın başarılı bir şekilde tasarlandığı düşünülmektedir.

Ferretti ve ark. (2006) yaptıkları çalışmada genipin ve polietilen glikol ile geliştirdikleri hidrojelleri, sıçanların dizlerinde osteokondral defekt açarak uygulamışlardır. Bu deney sonucunda inflamasyonun görülmemesi nedeniyle hidrojellerin biyoyumlu olduğu rapor edilmiştir. Birçok çalışmada ise etrafında kapsül oluşmayan implantlar biyoyumlu kabul edilmiştir. (Liuyun ve ark. 2009; Kim ve ark. 2010; Uzun ve Bayındır 2011). Bu çalışmada üç tabakalı iskele ve polimer gruplarında inflamasyonun görülmemesi, implantların çevrelerinde kapsül oluşmaması ve sağlıklı biyobozunmanın gerçekleşmesi oluşturulan iskelelerin biyoyumlu olduğunu göstermektedir.

In vitro salım çalışmalarında üç tabakalı doku iskelesine yüklenen deksametazonun kontrollü salım yaptığı anlaşılmıştır. Büyüme hormonuna yapısal benzerliğinden dolayı deksametazon *in vitro* salım çalışmalarında model ilaç olarak kullanılmıştır. *In vivo* hayvan deneylerinde ise kontrollü salımının gerçekleşeceği düşünüldükçe üç tabakalı doku iskelesine PRP yüklenerek etkinliği diğer gruplarla karşılaştırılmıştır. Gruplara histolojik skora yapıldığında yabancı cisim dev hücre reaksiyonu en çok PRP grubunda görülmüştür. PRP grubu referans ve TCP grupları ile karşılaştırıldığında PRP ile her iki grup arasında anlamlı fark ($p<0,05$) görülmüştür (Şekil 4.40). Diğer histolojik parametreler için bir karşılaştırma yapıldığında ise PRP grubuyla diğer gruplar arasında istatistiksel olarak anlamlılık bulunmamıştır. Büyüme

hormonlarının konsantre bir şekilde verilmesi için sıklıkla kullanılan PRP uygulamasının etkileri bu çalışmada test edilememiştir. Bergen ve ark. (2013) koyunların talus bölgesinde oluşturdıkları hasara PRP uygulamışlardır ve çalışma sonunda PRP'nin talusun iyileşme sürecinde etkisiz olduğunu rapor etmişlerdir. PRP'nin iyileşme sürecini hızlandırıcı etkisinin rapor edildiği çalışmaların çoğunda kontrol grubu ve istatistiksel olarak yeterli denek sayısının olmadığı görülmüştür (Park ve ark. 2012).

Doku iskelelerinin sterilizasyonunda, kuru ve buhar sterilizasyonları polimerde degradasyona ve hidrolize neden olması nedeniyle tercih edilmemektedir (Premnath ve ark. 1996). Gama ışınlarıyla sterilizasyon biyomateryal ve medikal ürünlerin sterilizasyonu için en güvenilir tekniklerden biri sayılmaktadır. Ancak Draget ve ark. (1997) aljinatın gama ışınlarıyla yapılan sterilizasyonu sonucu serbest radikallerin meydana geleceğini ve felakete yol açabileceğini rapor etmişlerdir. Etilen oksit sterilizasyonu polimerik materyallerde ve ısıya duyarlı materyallerde kullanılmaktadır. Griffon ve ark. (2006) kitozanla oluşturdıkları doku iskelesinin sterilizasyonunu etilen oksitle yapmışlardır. Literatürdeki rapor edilmiş çalışmalar incelendikten sonra ve aseptik koşullarda üretim imkanlarının olmaması nedeniyle artık bırakma riskine rağmen iskelelerin sterilizasyonunda % 70 etanol'den sonra etilen oksit sterilizasyonu kullanılmıştır. Histopatolojik bulgulara enflamasyonun ya da herhangi bir yan etkinin görülmemesi kullanılan sterilizasyon tekniğinin uygun olduğunu ortaya çıkarmıştır.

5.6 Sonuç Ve Öneriler

Çalışmamızda sonuç olarak; osteokondral doku rejenerasyonunu destekleyecek özelliklere sahip β -trikalsiyum fosfat, kitozan ve aljinat polimerleri kullanılarak monolitik yapıda üç tabakalı doku iskelesi üretilmiştir ve bu iskelelerin klinik uygulamalarda kullanılabilirliğinin belirlenmesine yönelik bulguların elde edilmesine çalışılmıştır. Çalışma kapsamında elde edilen önemli sonuçlar aşağıda özetlenmiştir.

- Dondurarak kurutma yöntemiyle sünger yapısında içsel bağlantılı gözeneklere sahip doku iskelelerinin üretimi gerçekleştirilmiştir.
- Üç farklı tabaka için farklı oranlarda β -TCP, kitozan ve aljinat polimerleri kullanılarak formülasyon çalışmaları yapılmıştır.
- FT-IR spektrofotometrisi kullanılarak aljinat, kitozan ve β -TCP arasındaki kimyasal etkileşim açıklanmıştır.

- Lizozim enzimi varlığında gerçekleştirilen biyobozunurluk deneylerine ait sonuçlar, doku iskelelerinin lizozim varlığında biyobozunduğunu göstermiştir.
- Doku iskelelerinin her bir tabakasının su tutma kapasiteleri şişme testleriyle ölçülüp sonuçlar literatürlerle karşılaştırılmıştır.
- Yapılan mekanik dayanıklılık testleri sonucunda literatürlerle karşılaştırma yapılmıştır.
- Karakterizasyon çalışmaları, farklı polimer ve β -TCP bileşimlerine sahip doku iskelelerinin şişme, biyobozunurluk, gözeneklilik ve mekanik özelliklerinin farklı olduğunu ortaya koymuştur. Yapılan bu çalışmaların değerlendirilmesi sonucunda kırık tabakası için P4, ara yüz TM6 ve subkondral tabak için SC6 kodlu formülasyonların osteokondral dokunun yapısına daha uygun olduğu sonucuna varılmıştır.
- Seçili üç tabakalı doku iskelesine gömme tekniği ile deksametazon yüklenip enkapsülasyon etkinliği hesaplanmıştır. Enkapsülasyon etkinliği % 78,661 olarak bulunmuştur.
- Deksametazon yüklenmiş iskeleyle salım çalışmaları yapılmıştır. Çalışmalar sonucunda doku iskelelerinden gerçekleşen deksametazon salımı 72 saatte tamamlanmıştır.
- Bu sistemlerden deksametazonun salımının, çoğunlukla Korsmeyer-Peppas kinetik modeline uyum gösterdiği tespit edilmiştir.
- L929 fibroblast hücre hattı ile yürütülen sitotoksikite hücre kültür çalışmaları kapsamında yapılan MTT analizleri sonucunda seçili her bir tabaka ve üç tabakalı monolitik yapının biyoyumlu olduğu ve biyometaryal olarak kullanılabileceği sonucuna varılmıştır.
- Yapay doku EpidermTM üzerinde gerçekleştirilen deri irritasyon testi çalışmalarında oluşturulan üç tabakalı doku iskelesi irritan olmadığı sonucuna varılmıştır.
- Yapılan hayvan deneyleri sonucunda üretilen üç tabakalı doku iskelesinin sitotoksikite deneylerini destekler nitelikte biyoyumlu olduğu kanıtlanmıştır. Biyobozunan implantın yeni oluşan dokuyla yer değiştirme zamanlaması, oluşturulan doku iskelesinin istenen biyobozunma karakterine sahip olduğunu

göstermiştir. Ayrıca matriks oluşumu açısından referans materyale göre daha iyi olduğu istatistiksel çalışmalar sonucunda ortaya çıkmıştır ($p<0,05$).

- Tezden sonra yapılabilecek çalışmalar ve öneriler aşağıda yer almaktadır;
 - Çekme gerilimi test sonuçlarını desteklemesi için mekanik dayanıklılık testlerinden ayrıca sıkıştırma tekniğinin gelecek çalışmalarda yapılması planlanmaktadır.
 - Hayvan deneylerinde referans ile üç tabaka karşılaştırıldığında üç tabakalı iskelenin daha iyi sonuçlar verdiği görülmektedir. Ancak aralarındaki fark matriks oluşumu haricinde istatistiksel olarak anlamlı çıkmamıştır. Hayvan sayısı arttırılarak ve/veya tavşan ya da koyun gibi daha gelişmiş hayvanlarda denendiği takdirde aralarındaki farkın istatistiksel olarak anlamlı çıkacağı düşünülmektedir.
 - Ayrıca kontrol grubunun sayısal azlığı nedeniyle kontrol grubuyla diğer gruplar arasında istatistiksel bir karşılaştırma yapılamamıştır. Yapılacak ilave çalışmada kontrol grubunun sayısının da arttırılarak çalışılması planlanmaktadır.
 - Üç tabakalı doku iskelesinin farklı etkin maddeler ve özellikle tedavinin başlangıcında yüksek etkin madde salımı istenen durumlar açısından incelenmesi ve geliştirilmesinin yararlı olacağı düşünülmektedir.

KAYNAKLAR

1. Abou Neel, E.A., Pickup, D.M., Valappil, S.P., Newport, R.J. ve Knowles, J.C. (2009). Bioactive functional materials: a perspective on phosphate-based glasses. *Journal of Materials Chemistry*, 19, 690 -701.
2. Ağabeyoğlu İ. (2006). Biyofarmasötik. İçinde, Modern Farmasötik Teknoloji. Ankara: Türk Eczacılar Birliği Akademi Yayını; 428-431.
3. Alves, N.M. ve Mano, J.F. (2008). Chitosan derivatives obtained by chemical modifications for biomedical and environmental applications. *International Journal of Biological Macromolecules*, 43, 401-414.
4. Barrere, F., Blitterswijk, C.A. ve Groot, K. (2006). Bone regeneration: molecular and cellular interactions with calcium phosphate ceramics. *International Journal of Nanomedicine*, 1, 317-332.
5. Bartis, D. ve Pongrácz, J. (2011). Three dimensional tissue cultures and tissue engineering. Erişim 07.11.2014, University of Pécs: http://www.tankonyvtar.hu/hu/tartalom/tamop425/0011_1A_3D_en_book/ch01s05.html
6. Bergen, C.J.A., Kerkhoffs, G.M.M.J., Özdemir, M., Korstjens, C.M., Everts, V. ve ark. (2013). Demineralized bone matrix and platelet-rich plasma do not improve healing of osteochondral defects of the talus: an experimental goat study. *Osteoarthritis and Cartilage*, 21, 1746-1754.
7. Boden, B.P., Pearsall, A.W., Garrett, W.E. ve Feagin, J.A. (1997). Patellofemoral instability: evaluation and management. *Journal of the American Academy of Orthopaedic Surgeons*, 5(1), 47–57.
8. Bose, S., Vahabzadeh, S. Ve Bandyopadhyay, A. (2013). Bone tissue engineering using 3D printing. *Materials Today*, 16(12), 496-504.
9. Bourell, D.L., Beaman, J.J., Marcus, H.L. ve Barlow, J.W. (1990). Solid Freeform Fabrication An Advanced Manufacturing Approach. Erişim 10.11.2014, The Texas University: <http://www.google.com.tr/url?sa=t&rct=j&q=&esrc=s&source=web&cd=2&ved=0CCgQFjAB&url=http%3A%2F%2Futwired.engr.utexas.edu%2F1990%2F1990-01-%2Fproceedingsarchive%2Fpubs%2Fmanuscripts%2F1990%2F1990-01->

bourell.pdf&ei=edtgVKX5Ao_isASw24KwBA&usg=AFQjCNF4Usi6q3z0GP8dyODcxXeHZbWaqA&sig2=wVuWxDg0AuQ7wSuZT5NGIA

10. Buckley, C.T. ve O'Kelly, K.U. (2010). Fabrication and characterization of a porous multidomain hydroxyapatite scaffold for bone tissue engineering investigations. *Journal of Biomedical Materials Research Part B: Applied Biomaterials*, 93, 459-467.
11. Buckwalter, J.A., Mankin, H.J. ve Grodzinsky A.J. (2005). *American Academy of Orthopaedic Surgeons Instructional Course Lectures*, 54, 465-480.
12. Bueter, C.L., Specht, C.A. ve Levitz S.M. (2013). Innate Sensing of Chitin and Chitosan. *PLOS Pathogens*, 9, e1003080.
13. Castner, D.G. ve Ratner, B.D. (2002). Biomedical surface science: Foundations to frontiers. *Surface Science*, 500, 28–60.
14. Chatterjee, K., Kraigsley, A.M., Bolikal, D., Kohn, J. ve Simon, C.G. (2012). Gas-Foamed Scaffold Gradients for Combinatorial Screening in 3D. *Journal of Functional Biomaterials*, 3, 173-182.
15. Chen, J., Wang, C., Lu, S., Wu, J., Guo, X., Duan, C., Dong, L., Song, Y., Zhang, J., Jing, D., Wu, L., Ding, J. ve Li, D. (2005). In vivo chondrogenesis of adult bone-marrow-derived autologous mesenchymal stem cells. *Cell Tissue Research*, 319, 429–438.
16. Cheung, H-Y. Lau, K-T. Lu, T.P. ve Hui, D. (2007). A critical review on polymer-based bio-engineered materials for scaffold development. *Composites Part B: Engineering*, 38(3), 291–300.
17. Chung, HJ. ve Park, TG. (2007). Surface engineered and drug releasing prefabricated scaffolds for tissue engineering. *Advanced Drug Delivery Reviews*, 59(4-5), 249-262.
18. Colilla, M.,Manzano, M. ve Vallet-Regí, M. (2008). Recent advances in ceramic implants as drug delivery systems for biomedical applications. *International Journal of Nanomedicine*, 3, 403–414.
19. Costa-Pinto, A.R., Reis, R.L. ve Neves, N.M. (2011). Scaffolds Based Bone Tissue Engineering: The Role of Chitosan. *Tissue Engineering: Part B*, 17(5), 1-17.
20. Christensen, B.B., Foldager, C.B., Hansen, O.M., Kristiansen, A.A., Le, D.Q.S., Nielsen, A.D. ve ark. (2012). A novel nano-structured porous polycaprolactone scaffold improves hyaline cartilage repair in a rabbit model compared to a collagen

- type I/III scaffold: *in vitro* and *in vivo* studies. *Knee Surg Sports Traumatol Arthroscopy*, 20, 1192-1204.
21. Çapan, Y. (2004). Kontrollü Salım Sistemlerinin Salım Mekanizmaları ve Kullanılış Yolları. İçinde A.Z. Gürsoy (Ed.), *Farmasötik Teknoloji-Temel Konular ve Dozaj Şekilleri*. İstanbul: Kontrollü Salım Sistemleri Derneği; 41-64.
 22. Da, H., Jia, S., Meng, G., Cheng, J., Zhou, W., Xiong, Z. ve ark. (2013). The Impact of Compact Layer in Biphasic Scaffold on Osteochondral Tissue Engineering. *Plos One*, 8, 1-14.
 23. Dash, A.K. ve Cudworth G.C. (1998). Therapeutic Applications of Implantable Drug Delivery Systems. *Journal of Pharmacological and Toxicological Methods*, 40, 1-12.
 24. Dash, D., Murthy, P.N., Nath, L. ve Chowdhury, P. (2010). Kinetic Modeling On Drug Release From Controlled Drug Delivery Sytems. *Acta Poloniae Pharmaceutica- Drug Research*, 67(3), 217-233.
 25. Dessi, M., Borzacchiello, A., Mohamed, T.H.A., Abdel-Fattah, W.I. ve Ambrosio, L.(2013). Novel biomimetic thermosensitive b-tricalcium phosphate/ chitosan-based hydrogels for bone tissue engineering. *Journal of Biomedical Materials Research A*, 101A(10), 2984-2993.
 26. Di Maio, E., Mensitieri, G., Iannace, S., Nicolais, L., Li, W. ve Flumerfelt, R.W. (2005). Structure optimization of polycaprolactone foams by using mixtures of CO₂ and N₂ as blowing agents. *Polymer Engineering and Science*, 45, 432-441.
 27. Di Martino, A., Sittingeri, M. ve Risbud, M.V. (2005). Chitosan: A versatile biopolymer for orthopaedic tissue-engineering. *Biomaterials*, 26(30), 5983-5990.
 28. Dortunç, B. (2004). Kontaminasyon ve Sterilizasyon. Kontrollü Salım Sistemleri. İçinde A.Z, Gürsoy (Ed.), *Farmasötik Teknoloji-Temel Konular ve Dozaj Şekilleri*. İstanbul: Kontrollü Salım Sistemleri Derneği; 101-115.
 29. Draget, K.I., Skja-Barke, G. ve Smidsrod, O. (1997). Alginate based new materials. *International Journal of Biological Macromolecules*, 21, 47-55.
 30. Drug Delivery. Erişim: 9.12.2014, http://www.gatewaycoalition.org/files/hidden/deliv/Ch4/4_4_4f.htm.
 31. Duarte, A.R.C., Mano, J.F. ve Reis R.L. (2009). Preparation of chitosan scaffolds loaded with dexamethasone for tissue engineering applications using supercritical fluid technology. *European Polymer Journal*, 45, 141-148.

32. Dubnika, A., Loca, D., ve Berzina-Cimdina, L. (2012). Functionalized hydroxyapatite scaffolds coated with sodium alginate and chitosan for controlled drug delivery. *Proceedings of the Estonian Academy of Sciences*, 61(3), 193–199.
33. Falah, M., Nierenberg, G., Soudry, M., Hayden, M. ve Volpin, G. (2010). Treatment of articular cartilage lesions of the knee. *International Orthopaedics*, 34, 621–630.
34. Fernandes, G.F. ve Laranjeira, C.M.M. (2000). Calcium Phosphate Biomaterials From Marine Algae. Hydrothermal Synthesis And Characterisation. *Quimica Nova*, 23, 441-446.
35. Ferretti, M., Marra, K.G., Kobayashi, K., Defail, A.J. ve Chu, C.R. (2006). Controlled In Vivo Degradation of Genipin Crosslinked Polyethylene Glycol Hydrogels within Osteochondral Defects. *Tissue Engineering*, 12, 2657-2663.
36. Florczyk, S.J., Leung, M., Li, Z., Huang, J.I., Hopper, R.A. ve Zhang, M. (2013). Evaluation of three-dimensional porous chitosan–alginate scaffolds in rat calvarial defects for bone regeneration applications. *Journal of Biomedical Materials Research A*, 101A(10), 2974-2983.
37. Francis Suh, J.K. ve Matthew, H.W.T. (2000). Application of chitosan-based polysaccharide biomaterials in cartilage tissue engineering: a review. *Biomaterials*, 21, 2589-2598.
38. Fu, Q., Saiz, E., Rahaman, M.N. ve Tomsia A.P. (2011). Bioactive glass scaffolds for bone tissue engineering: state of the art and future perspectives. *Materials Science and Engineering C*, 31, 1245–1256.
39. Gelinsky, M., Eckert, M. ve Despong, F. (2007). Biphasic, but monolithic scaffolds for the therapy of osteochondral defects. *International Journal Material Research*, 98, 747-753.
40. Gerçek Beşkardeş, I. (2008). Biyoseramik ve Biyosinyal Moleküllerle Desteklenmiş Poli(kaprolakton) Doku İskeleleri: Sentez, Karakterizasyon ve Kemik Doku Mühendisliği Uygulamaları. Yüksek Mühendislik Tezi, Hacettepe Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü, Ankara, p. 24.
41. Griffon, D.J., Sedighi, M.R., Schaeffer, D.V., Eurell, J.A. ve Johnson, A.L. (2006). Chitosan scaffolds: interconnective pore size and cartilage engineering. *Acta Biomaterialia*, 2(3), 313-320.
42. Han, J., Zhou, Z., Yin, R., Yang, D. Ve Nie, J. (2010). Alginate–chitosan/hydroxyapatite polyelectrolyte complex porous scaffolds: Preparation and

- characterization. *International Journal of Biological Macromolecules*, 46(2), 199-205.
43. Harley, B.A., Lynn, A.K., Wissner-Gross, Z., Bonfield, W., Yannas, I.V. ve Gibson, L.J. (2010). Design of a multiphase osteochondral scaffold III: Fabrication of layered scaffolds with continuous interfaces. *Journal of Biomedical Materials Research Part A*, 92, 1078-1093.
 44. Hing, K.A., Wilson, L.F. ve Buckland, T. (2007). Comparative performance of three ceramic bone graft substitutes. *Spine Journal*, 7, 475-490.
 45. Hong, H.S., Um, J., Lee, Z.H. ve Son, Y. (2014). Long-term comparative study of Substance-P with methylprednisolone on the development of osteoporosis. *The Journal of Toxicological Sciences*, 39(3), 391-399.
 46. Huang, Y.C., Huang, Y.Y., Huang, C.C. ve Liu, H.C. (2005). Manufacture of porous polymer nerve conduits through a lyophilizing and wire-heating process. *Journal of Biomedical Materials Research Part B-Applied Biomaterials*, 74, 659-664.
 47. Hutmacher, D.W., Sittinger, M. ve Risbud, M.V. (2004). Scaffold-based tissue engineering: rationale for computer-aided design and solid free-form fabrication systems. *Trends in Biotechnology*, 22 (7), 354-362.
 48. Hutmacher, D.W. (2000). Scaffolds in tissue engineering bone and cartilage. *Biomaterials*, 21, 2529-2543.
 49. ICH Guideline: Q2(R1): CPMP/ICH/381/95. Analytical method validation, International Conference on Harmonisation, November 1994.
 50. ICH Guideline: Q2(R1): CPMP/ICH/381/95. International Conference on Harmonisation, November 1994.
 51. International Organization for Standardization (ISO). ISO 10993-12: Biological evaluation of medical devices. 2009. Part 12: Sample preparation and reference materials.
 52. International Organization for Standardization (ISO). ISO 10993-5: Biological evaluation of medical devices. 2009 Part 5: Tests for cytotoxicity: *In vitro* methods.
 53. Jacobson, J.A., Yanoso Scholl, L., Reynolds, D.G., Dadali, T., Bradica, G., Bukata, S. ve ark. (2010). Teriparatide therapy and beta-TCP enhance scaffold reconstruction of mouse femoral defects. *Tissue Engineering Part A*, 17, 3889-398.

54. Jain, K.K. (2006). Role of nanotechnology in developing new therapies for diseases of the nervous system. *Nanomedicine*, 1, 9-12.
55. James, P.F. (1995). Glass ceramics: new compositions and uses. *Journal of Non-Crystalline Solids*, 181, 1-15.
56. Jayakumar, R., Prabakaran, M., Nair, S.V. ve Tamura, H. (2010). Novel chitin and chitosan nanofibers in biomedical applications. *Biotechnology Advances*. 128, 142-150.
57. Jin, H., Lee C-H. Lee, W-K., Lee, J-K., Park, H-C. ve Yoon, S-Y. (2008). In-situ formation of the hydroxyapatite/chitosan-alginate composite scaffolds. *Materials Letters*, 62(10–11), 1630–1633.
58. Kakita, H. ve Kamishima, H. (2008). Some properties of alginate gels derived from algal sodium alginate. *Journal of Applied Phycology*, 20, 543–549.
59. Kandárová, H, Hayden, P., Klausner, M., Kubilus, J., ve Sheasgreen, J. (2009). An *In Vitro* Skin Irritation Test (SIT) using the EpiDerm Reconstructed Human Epidermal (RHE) Model. *Journal of Visualized Experiments*, 29(e1366), 1-6.
60. Kenny, S.M. ve Buggy, M. (2003). Bone cements and filler: A review. *Journal of Materials Science: Materials in Medicine*, 14, 923-938.
61. Khor, E. ve Lim, L.Y. (2003). Implantable applications of chitin and chitosan. *Biomaterials*, 24, 2339-2349.
62. Khotimchenko, Y.S., Kovalev, V.V., Savchenko, O.V. ve Ziganshina, O.A. (2001). Physical–Chemical Properties, Physiological Activity, and Usage of Alginates, the Polysaccharides of Brown Algae. *Russian Journal of Marine Biology*, 27, S53–S64.
63. Kim, B., Park, I., Takashib, H., Jiang, H., Choi, Y., Akaike, T. ve Cho, C. (2011). Design of artificial extracellular matrices for tissue engineering. *Progress in Polymer Science*, 36, 238-268.
64. Kim, J., Dadsedan, M., Ameenuddin, S., Windebank, A.J., Yaszemski, M.J. ve Lu, L. (2010). In Vivo Biodegradation and Biocompatibility of PEG/Sebacic Acid-Based Hydrogels using a Cage Implant System. *Journal of Biomedical Materials Research Part A*, 95(1), 191–197.
65. Kim, S.J., Jang, D.H., Park, W.H. ve Min, B-M. (2010). Fabrication and characterization of 3-dimensional PLGA nanofiber/microfiber composite scaffolds. *Polymer*, 51, 1320-1327.

66. Kim, Y., Seo, S., Moon, H., Yoo, M., Park, I., Kim, B. ve Cho, C. (2008). Chitosan and its derivative for tissue engineering applications. *Biotechnology Advances*, 26, 1-21.
67. Kon, E., Filardo, G., Delcogliano, M., Fini, M., Salamanna, F., Giavaresi, G. ve ark. (2010). Platelet autologous growth factors decrease the osteochondral regeneration capability of a collagen-hydroxyapatite scaffold in a sheep model. *BMC Musculoskeletal Disorders*, 11, 220.
68. Korkusuz, F., Tomin, E., Yetkinler, D.N., Timuçin, M., Öztürk, A. ve Korkusuz, P. (2011). Yapay Kemik Dokusu. *TOTBİD Dergisi*, 10, 134-142.
69. Kuettner, K.E., Cole, A.A. (2005). Cartilage degeneration in different human joints. *OsteoArthritis and Cartilage*, 13, 93-103.
70. Kuo, C.K. ve Ma, P.X. (2007). Maintaining dimensions and mechanical properties of ionically crosslinked alginate hydrogel scaffolds *in vitro*. *Journal of Biomedical Materials Research Part A*, 84A(4), 899-907.
71. Kuran, B. (2011). Osteoartritte Subcondral Kemikteki Değişiklikler. *Türk Geriatri Dergisi*, 14, 57-61.
72. Kutlu B., Aydın R.S.T., Akman A.C., Gumusderelioglu M. ve Nohutcu R.M. (2013). Platelet-rich plasma-loaded chitosan scaffolds: preparation and growth factor release kinetics. *Journal of Biomedical Materials ResearchB: Applied Biomaterials*, 101, 28-35.
73. Lattermann, C. ve Romine, S.E. (2009). Osteochondral allografts: state of the art. *Clinics in sports medicine*, 28, 285-301.
74. Lee, H., Ahn, S. Bonassar, L.J. Chun, W. ve Kim, G. (2013). Cell-Laden Poly(ϵ -caprolactone)/Alginate Hybrid Scaffolds Fabricated by an Aerosol Cross-Linking Process for Obtaining Homogeneous Cell Distribution: Fabrication, Seeding Efficiency, and Cell Proliferation and Distribution. *Tissue Engineering: Part C*, 19(10), 784-793.
75. Lee, J., Choi, Y-J., Kim, C.H., Kim, H., Son, Y. (2011). Articular Cartilage Repair with Tissue-Engineered Hyaline Cartilage Reconstructed in a Chitosan-Hyaluronic Acid Scaffold by Costal Chondrocytes. *Tissue Engineering and Regenerative Medicine*, 8(5), 446-453.
76. Lee, K-W., Wang, S., Fox, B.C., Ritman, E.L., Yaszemski, M.J. ve Lu, M.J. (2007). Poly(propylene fumarate) Bone Tissue Engineering Scaffold Fabrication Using

- Stereolithography: Effects of Resin Formulations and Laser Parameters. *Biomacromolecules*, 8(4), 1077-1084.
77. Li, Z., Ramay, H.R., Hauch, K.D., Xiao, D. ve Zhang, M. (2005). Chitosan–alginate hybrid scaffolds for bone tissue engineering. *Biomaterials*, 26, 3919–3928.
 78. Liao, F., Chen, Y., Li, Z., Wang, Y., Shi, B., Gong, Z. ve Cheng, X. (2010). A novel bioactive three-dimensional b-tricalcium phosphate/chitosan scaffold for periodontal tissue engineering. *Journal of Materials Science: Materials in Medicine*, 21, 489–496.
 79. Liao, I-C., Wan, A.C.A., Yim, E.K.F. ve Leong K.W. (2005). Controlled release from fibers of polyelectrolyte complexes. *Journal of Controlled Release*, 104(2), 347-358.
 80. Liu Y., Lim J., Teoh S. (2012). Review: Development of clinically relevant scaffolds for vascularised bone tissue engineering. *Biotechnology Advances*. 31(5), 688-705.
 81. Liu, M., Yu, X., Huang, F., Cen, S., Zhong, G. ve Xiang, Z. (2013). Tissue Engineering Stratified Scaffolds for Articular Cartilage And Subcondral Bone Defects Repair. *Ortopedics*, 38, 868-873.
 82. Liu, Q., Cen, L., Yin, S., Chen, L., Liu, G., Chang, J. ve ark. (2008). A comparative study of proliferation and osteogenic differentiation of adipose-derived stem cells on akermanite and beta-TCP ceramics. *Biomaterials*, 29, 4792–4799.
 83. Liu, X. ve Ma, P.X. (2004). Polymeric Scaffolds for Bone Tissue Engineering. *Annals of Biomedical Engineering*, 32(3), 477–486.
 84. Liuyun, J., Yubao, L. ve Chengdong, X. (2009). Preparation and biological properties of a novel composite scaffold of nano-hydroxyapatite/chitosan/carboxymethyl cellulose for bone tissue engineering. *Journal of Biomedical Science*, 16, 65.
 85. Lu, Z. Ve Zreiqat, H. (2010). Beta-tricalcium phosphate exerts osteoconductivity through alpha2beta1 integrin and downstream MAPK/ERK signaling pathway. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 394, 323–329.
 86. Lynn, A. K., Brooks, R. A., Bonfield, W. ve Rushton, N. (2004). Repair of defects in articular joints. *The Journal Of Bone And Joints Surgery*. 86(B): 1093-1099.
 87. Madry, H., Dijk, C.N. ve Mueller-Gerbl, M. (2010). The basic science of the subchondral bone. *Knee Surgery, Sports Traumatology, Arthroscopy*, 18, 419-433.

88. Malafaya, P.B. ve Reis, R.L. (2009). Bilayered chitosan-based scaffolds for osteochondral tissue engineering: Influence of hydroxyapatite on *in vitro* cytotoxicity and dynamic bioactivity studies in a specific double-chamber bioreactor. *Acta Biomaterialia*, 5(2), 644-660.
89. Mano, J.F., Silva, G.A., Azevedo, H.S., Malafaya, P.B., Sousa, R.A. ve Silva, S.S. (2007). Natural origin biodegradable systems in tissue engineering and regenerative medicine: present status and some moving trends. *Journal of Royal Society Interface*, 4, 999-1030.
90. Martino, A., Sittering, M. ve Risbud, M. (2005). Chitosan: A versatile biopolymer for orthopaedic tissue engineering. *Biomaterials*, 26, 5983-5990.
91. Maruyama, S., Hasegawa, Y., Sakano, S., Warashina, H., Kitamura, S., Yamauchi, K. ve ark. (2003). Experimental evaluation of the usefulness of osteochondral allograft for articular cartilage defect. *Journal of Orthopaedic Science*, 8, 560-566.
92. Marx R.E., Carlson E.R., Eichstaedt R.M., Schimmele S.R., Strauss J. E., Georgeff K.R. (1998). Platelet-rich plasma: Growth factor enhancement for bone grafts. *Oral Surgery Medicine Oral Pathology*, 85, 638-646.
93. Mazaki, T., Shiozaki, Y., Yamane, K., Yoshida, A., Nakamura, M., Yoshida Y. ve ark. (2014). A novel, visible light-induced, rapidly cross-linkable gelatin scaffold for osteochondral tissue engineering. *Scientific Reports*, 4, 44-57.
94. Mikos, A.G. ve Temenoff, J.S. (2000). Formation of highly porous biodegradable scaffolds for tissue engineering, *EJB Electronic Journal of Biotechnology*, 3, 1-6.
95. Mikos, A.G., Sarakinos, G., Vacanti, J.P., Langer, R. ve Cima, L.G. (1996). Biocompatible polymer membranes and methods of preparation of three dimensional membrane structures. United States Patent No. 5514378.
96. Mohamed, K.R., Beherei, H.H. ve El-Rashidy, Z.M. (2014). *In vitro* study of nano-hydroxyapatite/chitosan-gelatin composites for bio-applications. *Journal of Advanced Research*, 5(2), 201-208.
97. Nag, S. ve Banerjee, R. (2012). Fundamentals of Medical Implant Materials. İçinde R. Banerjee (Ed.). *ASM Handbook*; 6-14.
98. Nam, Y. S. ve Park, T. G. (1999). Biodegradable polymeric microcellular foams by modified thermally induced phase separation method. *Biomaterials*, 20, 1783- 1790.
99. Nandagiri, V.K., Gentile, P., Chiono, V., Tonda-Turo, C., Matsiko, A., Ramtools, Z., Montevicchi, F.M. ve Ciardelli, G. (2011). Incorporation of PLGA nanoparticles

- into porous chitosan–gelatin scaffolds: Influence on the physical properties and cell behavior. *Journal of the mechanical behavior of biomedical materials*, 4, 1318 – 1327.
100. Nienhuijs, M.E., Walboomers, X.F., Briest, A., Merkkx, M.A., Stoelinga, P.J. ve Jansen, J.A. (2010). Healing of bone defects in the goat mandible, using COLLOSS® and betatricalciumphosphate. *Journal Biomedical Material Research B Applied Biomaterial*, 92, 517-524.
 101. Nokhodchi, A. ve Tailor, A. (2004). In situ cross-linking of sodium alginate with calcium and aluminum ions to sustain the release of theophylline from polymeric matrices. *II Farmaco*, 59, 999–1004.
 102. Nokhodchi, A., Raja, S., Patel, P. ve Asare-Addo, K. (2012). The Role of Oral Controlled Release Matrix Tablets in Drug Delivery Systems. *BioImpacts*, **2(4)**: 175-187.
 103. Nooeaid, P., Salih V., Beier, J. P. ve Boccaccini, A. R. (2012). Osteochondral tissue engineering: scaffolds, stem cells and applications. *Journal of Cellular and Molecular Medicine*, 16, 2247-2270.
 104. Nystrom, B., Kjoniksen, A. ve Iversen, C. (1999). Characterization of association phenomena in aqueous systems of chitosan of different hydrophobicity. *Advances In Colloid And Interface Science*, 79, 81-103.
 105. Okuda, T., Uysal, A.C., Tobita, M., Hyakusoku, H. ve Mizuno, H. (2010). Prefabrication of tissue engineered bone grafts: an experimental study. *Annals Of Plastic Surgery*, 64, 98-104.
 106. Özalp, Y. ve Özdemir, N. (1996). Biyomateriyaller ve Biyouyumluluk: Biomaterials and Biocompatibility. *Ankara Üniversitesi Eczacılık Fakültesi Dergisi*. 25(2), 57-72.
 107. Öztürk, A., Timuçin, M., Bayramlı, E., Kahraman, S., Korkusuz, F., Korkusuz P., Durucan, C. ve Candan, Z.N. (2008). Kemik Ve Kıkırdak Dokusu Onarımına Yönelik Olarak Yağ Dokusundan Farklılandırılmış Hücre Ve Seramik/Polimer Kompozit İçeren Yapay Dokuların Geliştirilmesi. TÜBİTAK MAG Proje 106M063, 1-58.
 108. Pan, Z. ve Ding, J. (2012). Poly (lactide-co-glycolide) porous scaffolds for tissue engineering and regenerative medicine. *Interface Focus*, 2, 366–377.

109. Park, S.H., Park, D.S., Shin, J.W., Kang, G.Y., Kim, H.K., Yoon T.M. ve ark. (2012). Scaffolds for bone tissue engineering fabricated from two different materials by the rapid prototyping technique: PCL versus PLGA. *Journal of Materials Science: Materials in Medicine*, 23, 2671–2678.
110. Park, Y-G., Han, S.B., Song, S.J., Kim, T.J. ve Ha, C-W. (2012). Platelet-Rich Plasma Therapy for Knee Joint Problems: Review of the Literature, Current Practice and Legal Perspectives in Korea. *Knee Surgery & Related Research*, 24(2), 70-78.
111. Parks, K.L. ve Beckman, E.J. (1996). Generation of microcellular polyurethane foams via polymerization in carbon dioxide II: Foam formation and characterization. *Polymer Engineering and Science*, 36, 2417-2431.
112. Pate, D.V., Breazeale, N.M., Behr, C.T., Warren, R.F., Wickiewicz, T.L. ve O'Brien, S.J. (1998). Osteonecrosis of the knee: current clinical concepts. *Knee Surgery, Sports Traumatology, Arthroscopy*, 6(1), 2–11.
113. Porter, J.R., Ruckh, T.T. ve Popat, K.C. (2009). Bone Tissue Engineering: A Review in Bone Biomimetics and Drug Delivery Strategies. *Biotechnology Progress*, 25, 1539-1560.
114. Prabakaran, M., Rodriguez-Perez, M.A., Saja, J.A. ve Mano, J.F. (2006). Preparation and Characterization of Poly(L-lactic acid)-Chitosan Hybrid Scaffolds With Drug Release Capability. *Journal of Biomedical Materials Research Part B: Applied Biomaterials*, 427-434.
115. Premnath, V., Harris, WH., Jasty, M. ve Merrill E.W. (1996). Gamma sterilization of UHMWPE articular implants: an analysis of the oxidation problem. *Biomaterials*, 17, 1741-1753.
116. Pubchem: Erişim: 9.12.2014, <http://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/dexamethasone#section=2D-Structure>.
117. Quaglia, F. (2008). Bioinspired tissue engineering: The great promise of protein delivery technologies. *International Journal of Pharmaceutics*, 364, 281–297.
118. Quirk, R.A, France, R.M., Shakesheff, K.M. ve Howdle, S.M. (2004). Supercritical fluid technologies and tissue engineering scaffolds. *Current Opinion in Solid State & Materials Science*, 8, 313-321.
119. Rahaman, M.N., Brown, R.F., Bal, B.S. ve Day, D.E. (2006). Bioactive Glasses for Nonbearing Applications in Total Joint Replacement. *Semi Arthroplasty*, 17, 102–112.

120. Rajgor, N., Patel, M. ve Bhaskar, V.H. (2011). Implantable drug delivery systems: An overview. *Systemic Reviews in Pharmacy*, 2(2), 91-95.
121. Rezwan, K., Chen, Q.Z., Blaker, J.J. ve Boccaccini, A.R. (2006). Biodegradable and bioactive porous polymer/inorganic composite scaffolds for bone tissue engineering, *Biomaterials*, 27, 3413–3431.
122. Riley, D.J., Bavastrello, V., Covani, U., Barone, A. ve Nicolini, C. (2005). An in-vitro study of the sterilization of titanium dental implants using low intensity UV-radiation. *Dental Materials*, 21(8), 756–760.
123. Rinaudo, M. (2008). Main properties and current applications of some polysaccharides as biomaterials. *Polymer International*, 57, 397-430.
124. Rodrigues, M.T., Gomes, M.E. ve Reis, R.L. (2011). Current strategies for osteochondral regeneration: from stem cells to pre-clinical approaches. *Current Opinion in Biotechnology*, 22(5), 726-733.
125. Saarai, A., Kasparkova, V., Sedlacek, T. ve Saha, P. (2011). A Comparative Study of Crosslinked Sodium Alginate/Gelatin Hydrogels for Wound Dressing. the 4th WSEAS international conference on Energy and development environment biomedicine, 384-389.
126. Sahoo, S., Chakraborti, C.K. ve Behera, P.K. (2012). Development and Evaluation of Gastroretentive Controlled Release Polymeric Suspensions Containing Ciprofloxacin and Carbopol Polymers. *Journal of Chemical and Pharmaceutical Research*, 4(4), 2268-2284.
127. Salama, A. ve El-Sakhawy, M. (2014). Preparation of polyelectrolyte/calcium phosphate hybrids for drug delivery application. *Carbohydrate Polymers*, 26(113), 500-506.
128. Salgado, A.J., Coutinho, O.P. ve Reis, R.L. (2004). Bone Tissue Engineering: State of the Art and Future Trends, *Macromolecular Biosciences*, 4, 743–765.
129. Salinas, A.J., Esbrit, P. ve Vallet-Regí M. (2013). A tissue engineering approach based on the use of bioceramics for bone repair. *Biomaterial Science*, 1, 40–51.
130. Sayın, B. ve Çalış, S. (2006). Kemik Graftleri. *TÜFTAD Haberler*, 13(4), 3-7.
131. Sherwooda, J.K., Rileyb, S.L., Palazzoloa, R., Brown, S.C., Monkhousea, D.C., Coatesc, M. ve ark. (2002). A three-dimensional osteochondral composite scaffold for articular cartilage repair. *Biomaterials*, 23, 4739–4751.

132. Shintani, N. ve Hunziker, E.B. (2011). Differential Effects Of Dexamethazon On The Chondrogenesis Of Mesenchymal Stromal Cells: Influence Of Microenvironment, Tissue Origin And Growth Factor. *European Cells and Materials*, 22, 302-320.
133. Shuai, C., Yang, B., Peng, S., Li, Z. (2013). Development of composite porous scaffolds based on poly(lactide-co-glycolide)/nano-hydroxyapatite via selective laser sintering *International Journal of Advanced Manufacturing Technology*, 69, 51–57.
134. Siclari, A., Mascaro, G., Gentili, C., Cadedda, R.ve Boux, E. (2012). A Cell-free Scaffold-based Cartilage Repair Provides Improved Function Hyaline-like Repair at One year. *Clinical Orthopaedics and Related Research*, 470, 910–919.
135. Sill, T.J. ve von Recum, H.A. (2008). Electrospinning: applications in drug delivery and tissueengineering. *Biomaterials*, 29, 1989–2006.
136. Singhvi, G. ve Singh, M. (2011). Review: In-Vitro Drug Release Characterization Models. *International Journal of Pharmaceutical Studies and Research*, 2(1), 77-84.
137. Sowjanya, J.A., Singh, J., Mohita, T., Sarvanan, S., Moorthi, A., Srinivasan, N. ve Selvamurugan, N. (2013). Biocomposite scaffolds containing chitosan/alginate/nano-silica for bone tissue engineering. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*, 109, 294-300.
138. Srinivas, P., Swamy, R.K., Devi, K.P. ve Sailaja B. (2014). Assesment Of Dietary Practice Among Osteoarthritis Patients. *International Journal of Pharmacy and Pharmaceutical Sciences*, 6, 578-581.
139. Sun, J. ve Tan, H. (2013). Alginate-Based Biomaterials for Regenerative Medicine Applications. *Materials*, 6, 1285-1309.
140. Swain, S.K. ve Sarkar D. (2014). Fabrication, bioactivity, *in vitro* cytotoxicity and cell viability ofcryo-treated nanohydroxyapatite–gelatin–polyvinyl alcoholmacroporous scaffold. *Journal of Asian Ceramic Societies*, 2, 241–247.
141. Szpalski, C., Wetterau M., Barr J. ve Warren, S.M. (2012). Bone Tissue Engineering: Current Strategies and Techniques Part I: Scaffolds. *Tissue Engineering: Part B*, 18, 246-257.

142. Şenköylü, A. ve Korkusuz, F. (2004). Kıkırdak Onarımında Doku Mühendisliği Uygulamaları. *TOTBİD (Türk Ortopedi ve Travmatoloji Birliği Derneği) Dergisi*, 3, 3-4.
143. Tampieri, A. Celotti, G. Landi, E., Sandri, M., Roveri, R. ve Falini, G. (2003). Biologically inspired synthesis of bone-like composite: Self-assembled collagen fibers/hydroxyapatite nanocrystals. *Journal of Biomedical Materials Research Part A*, 67, 618-625.
144. Tampieri, A., Sandri, M., Landi, E., Pressato, D., Francioli, S., Quarto, R. ve Martin, I. (2008). Design of graded biomimetic osteochondral composite scaffolds. *Biomaterials*, 29(26), 3539-3546.
145. Thamaraiselvi, T. V. ve Rajeswari S. (2004). Biological Evaluation of Bioceramic Materials A Review. *Trends Biomaterials Artificial Organs*, 18, 9-17.
146. Thavornnyutikarn, B., Chantarapanich, N., Sitthiseripratip, K., Thouas, G. A. ve Chen, Q. (2014). Bone tissue engineering scaffolding: computer-aided scaffolding techniques. *Progress in Biomaterials*, 3, 1-42.
147. Tıǧlı, R.S., Akman, A.C., Gümüşderelioǧlu, M. ve Nohutçu, R.M. (2009). In Vitro Release of Dexamethasone or bFGF from Chitosan/Hydroxyapatite Scaffolds. *Journal of Biomaterials Science, Polymer Edition*, 20(13), 1899-1914.
148. Tıǧlı, RS. ve Gümüşderelioǧlu, M. (2006). Dexamethasone releasing chitosan scaffold for cartilage development. *European Cells and Materials*, 12(1), 73.
149. Uzun, İ.H. ve Bayındır F. (2011). Dental Materyallerin Biyouyumluluk Test Yöntemleri. *Gazi Üniversitesi Diş Hekimliği Fakültesi Dergisi*, 28(2), 115-122.
150. Vallet-Regí M. ve Ruiz-Hernández, E. (2011). Bioceramics: From Bone Regeneration to Cancer Nanomedicine. *Advanced Materials*, 23, 5177–5218.
151. van der Pol, U., Mathieu, L., Zeiter, S., Bourban, P.E., Zambelli, P.Y., Pearce, S.G., Bource, L.P. ve Pioletti, D.P. (2010). Augmentation of bone defect healing using a new biocomposite scaffold: An *in vivo* study in sheep. *Acta Biomaterialia*, 6, 3755–3762.
152. Venkata, K. Rao, P., Bari, K., Motakatla, N.R. ve Penmatsa, T. (2014). Comparison of β -tricalcium phosphate and autogenous bone graft with bioabsorbable membrane and autogenous bone graft in the treatment of intrabony periodontal defects: A clinico-radiographic study. *Journal of Dr. NTR University of Health Sciences*, 3, 28-36.

153. Venkatesan, J, Bhatnagar, I. ve Kim, S-K. (2014). Chitosan-Alginate Biocomposite Containing Fucoidan for Bone Tissue Engineering. *Marine Drugs*, 12(1), 300–316.
154. Venkatesan, J., Pallela, R., Bhatnagar, I. ve Kim S.K. (2012). Chitosan-amylopectin/hydroxyapatite and chitosan-chondroitin sulphate/hydroxyapatite composite scaffolds for bone tissue engineering. *International Journal Of Biological Macromolecules*, 51(5), 1033-1042.
155. Vittekova, M., Dragunova, J. Kabat, P., Bozikova, M. Bakos, D. ve Koller, J. (2014). Cytotoxicity testing of scaffolds potentially suitable for the preparation of three-dimensional skin substitutes. *Cell Tissue Bank*, 15(3), 345-355.
156. Walsh, W.R., Vizesi, F., Michael, D., Auld, J., Langdown, A., Oliver, R., Yu, Y., Irie, H. ve Bruce, W. (2008). Beta-TCP bone graft substitutes in a bilateral rabbit tibial defect model. *Biomaterials*, 29, 266-271.
157. Wang, X. ve Ni, Q. (2003). Determination of cortical bone porosity and pore size distribution using a low field pulsed NMR approach. *Journal of Orthopaedic Research*, 21, 312-319.
158. Wang, Y., Kim, U.J., Blasioli, D.J., Kim, H.J. ve Kaplan, D.L. (2005). *In vitro* cartilage tissue engineering with 3D porous aqueous-derived silk scaffolds and mesenchymal stem cells. *Biomaterials*, 26(34), 7082-7094.
159. Whang, K., Thomas, C.H., Healy, K.E. ve Nuber, G. (1995). A novel method to fabricate bioabsorbable scaffolds. *Polymer*, 36, 837-842.
160. Xie, X., Zhang, C. ve Tuan, R.S. (2014). Biology of platelet-rich plasma and its clinical application in cartilage repair. *Arthritis Research & Therapy*, 16(1), 204.
161. Xing, L., Jiang, Y., Gui, J., Lu, Y., Gao, F., Xu, Y. ve ark. (2013). Microfracture combined with osteochondral paste implantation was more effective than microfracture alone for full-thickness cartilage repair. *Knee Surgery, Sports Traumatology, Arthroscopy*, 21, 1770–1776.
162. Yamanouchi, K., Gotoh, Y. ve Nagayama, M. (1997). Dexamethasone enhances differentiation of human osteoblastic cells *in vitro*. *Journal of Bone and Mineral Metabolism*, 15, 23-29.
163. Yen, H.J., Tseng, C.S., Hsu C.S. ve Tsai, C.T. (2009). Evaluation of chondrocyte growth in the highly porous scaffolds made by fused deposition

- manufacturing (FDM) filled with type II collagen. *Biomedical Microdevices*, 11, 615–624.
164. Yılmaz, C. (2012). Patellofemoral eklem: Kondral ve osteokondral lezyonlar ve osteokondritis dissekans. *TOTBİD Dergisi*, 11(4), 339-345.
 165. Zaki, M.A.J., Patil, S.K., Baviskar, D.T. ve Jain, D.K. (2012). Implantable Drug Delivery System: A Review. *International Journal of PharmTech Research*, 4(1), 280-292.
 166. Zhang, X., Gozukara, Y., Sangwan, P., Gao, D. ve Bateman, S. (2010). Biodegradation of chemically modified wheat gluten-based natural polymer materials. *Polymer Degradation and Stability*, 95, 2309-2317.
 167. Zhao, J., Hu, J., Wang, S., Sun, X., Xia, L., Zhang, X., Zhang, Z., ve Jiang, X. (2010). Combination of beta-TCP and BMP-2 gene-modified bMSCs to heal critical size mandibular defects in rats. *Oral Diseases*, 16, 46-54.
 168. Zhu, N. ve Chen, X. (2013). Biofabrication of Tissue Scaffolds. İçinde R. Pignatello (Ed.), *Advances in Biomaterials Science and Biomedical Applications*, 315-328.
 169. Zhu, Y. ve Kaskel, S. (2009). Comparison of the *in vitro* bioactivity and drug release property of mesoporous bioactive glasses (MBGs) and bioactive glasses (BGs) scaffolds. *Microporous and Mesoporous Materials*, 118,176–182.
 170. Zou, C., Weng, W., Deng, X., Cheng, K., Liu, X., Du, P., Shen, G ve Han, G.(2005). Preparation and characterization of porous beta-tricalcium phosphate/collagen composites with an integrated structure. *Biomaterials*, 26(26), 5276-5284.

ETİK KURUL KARARI



T.C. YEDİTEPE ÜNİVERSİTESİ, DENEY HAYVANLARI ETİK KURULU (YÜDHEK)

ETİK KURUL KARARI

Toplantı Tarihi	Karar No	İlgi	Proje Yürütücüsü
13.12.2013	367	10.12.2013 tarihli yazı	Prof. Dr. Fatma Gülgün Yener

‘Biyopolimer ve Biyoseramik Kompozitlerin Hazırlanışı, Karakterizasyonu ve *In vivo* Değerlendirilmesi’ adlı bilimsel çalışma etik kurulumuzda görüşülmüş olup, çalışmanın etik kurallara uygun olduğuna oy birliğiyle karar verilmiştir.

Etik Onay Geçerlilik Süresi: 1 Yıl

GÖREVİ	ADI SOYADI	İMZA
Başkan	Prof. Dr. M. Ece GENÇ	
Başkan Yardımcısı	Prof. Dr. Erdem YEŞİLADA	KATILMADI
Raportör	Prof. Dr. Işıl Aksan KURNAZ	
Üye	Prof. Dr. Bayram YILMAZ	
Üye	Prof. Dr. Başar ATALAY	KATILMADI
Üye	Yard.Doç.Dr.Soner DOĞAN	
Üye	Yard. Doç. Dr. Ediz DENİZ	
Üye	Doç. Dr. C. Narter YEŞİLDAĞLAR	
Üye	Sumru KİRAZCI	

ÖZGEÇMİŞ

Kişisel Bilgiler

Adı	Derya	Soyadı:	Algül Kurçeren
Doğ. Yeri	Kayseri	Doğ. Tar.	02.02.1985
Uyruğu	T.C.	Tel	05376740437
Email	deryaalgul@gmail.com		

Eğitim Düzeyi

	Mezun Old. Kurum	Mezuniyet Yılı
Doktora		
Yüksek Lisans	Yeditepe Üniversitesi, Kozmetoloji Yüksek Lisansı	2011
Lisans	Yeditepe Üniversitesi, Eczacılık Fakültesi	2008
Lise	Özel Erciyes Lisesi	2002

İş Deneyimi

Görevi	Kurum	Süre (Yıl-Yıl)
Araştırma görevlisi	Yeditepe Üniversitesi, Eczacılık Fakültesi	2008-

Yabancı Diller	Okuduğunu Anlama	Konuşma	Yazma	KPDS/ÜDS Puanı
İngilizce	Çok iyi	İyi	İyi	66

	Sayısal	Eşit Ağırlık	Sözel
Ales Puanı	80,807	80,266	78,667

Bilgisayar Bilgisi

Program	Kullanma becerisi
MS Ofis Programı (World, Excel, Power Point)	Çok iyi
SPSS	İyi derece

Uluslararası ve Ulusal Bildiriler

- 1- S.Gümrü, Z.B. Tekiner, E. Abay, Ş. Makaracı, **D. Algul**, M.E. Kartal. Phytovigilance.1. National Phytovigilance Congress, Antakya, 4-6 Haziran 2008. (Poster bildirisi)
- 2- **D. Algül**, Y.Y. Uzuner, F. Özkan, E. Kılıç. Studies for scarless wound healing with new cream formulations. 1st Cosmetology and Cosmetic Gynecology Congress, İstanbul, Nisan 28-30, 2011. (Poster bildirisi)
- 3- **D. Algül**, Y. Y.Uzuner. TIME as a useful wound healing guidelines. 1st Cosmetology and Cosmetic Gynecology Congress, İstanbul, Nisan 28-30, 2011. (Poster bildirisi)
- 4- **D. Algül**, Y.Y. Uzuner. Ürünlerin İçerdiği Bitkisel Ekstrelerin Analizlerinin Yapılmasında Yaşanan Güçlükler. 2. Kozmetik Kongresi, Antalya, 17-19 Şubat, 2012. (Poster bildirisi)

- 5- Y. Y.Uzuner, **D. Algül**, F. Özkan, E. Kılıç. New Wound Healing Creams. Skin & Formulation, 4th Symposium, Lyon, Fransa, 4-5 Haziran, 2012. (Poster bildirisi)
- 6- **D. Algül**, Y.Y. Uzuner . Deterination Of Escin in Cream By HPLC. Skin & Formulation, 4th Symposium, Lyon, Fransa, 4-5 Haziran, 2012. (Poster bildirisi)
- 7- **D. Algül**, Y.Y. Uzuner. Yara Bakım Ürünü Projesi. 2. Kimya Ar-Ge Proje Pazarı, İstanbul, 18-19 Eylül 2012. (Poster bildirisi)
- 8- **D. Algül**, Y.Y. Uzuner. Determination of Hyperoside in a Cream Formulation by High Performance Liquid Chromatography. AAPS Annual Meeting and Exposition, Şikago, USA, Ekim 14-18, 2012. (Poster bildirisi)
- 9- **D. Algül**, Y.Y. Uzuner, F. Özkan, E. Kılıç. Design of new cream formulations with natural products and assessing their effectiveness on wound healing by using *in vivo* animal model. European Academy of Dermatology and Venereology, Dermatology Medical Congress, İstanbul, 2-6 Ekim, 2013. (Poster bildirisi)
- 10- **D. Algül**, Y.Y. Uzuner, F. Özkan, E. Kılıç. Design of new cream formulations with natural products and assessing their effectiveness on wound healing by using *in vivo* animal model. 4th International Conference on Clinical & Experimental Dermatology, Teksas, USA, 14-16 Nisan, 2014. (Sözlü Bildiri)
- 11- **D. Algül**, F. Kelleci², S. Ozdatlı², H. Sipahi², F.G. Yener³. Development and Biocompatibility Evaluation Of Novel Multilayered Alginate-Chitosan/Tricalcium Phosphate For Cartilage Tissue Engineering. 17th International Pharmaceutical Technology Symposium, 8-10 Eylül, 2014. (Poster bildirisi)

ISI İndeksine Kayıtlı Dergilerde Yayımlanan Bildiriler

- 1- **D. Algül**, Y.Y. Uzuner, F. Özkan, E. Kılıç. Wound Healing Effects of New Cream Formulations. PLANTA MEDICA, Volume: 77 Issue: 12 Pages: 1436-1436 Published: AUG 2011.

Ödüller

2007-2008 Dönemi Yeditepe Üniversitesi Eczacılık Fakültesi Mezunları 2. lik Ödülü

Özel İlgi Alanları (Hobileri)

Tennis, jimlastik, müzik dinlemek, dans etmek ve yemek yapmak.