

T.C.
YILDIZ TEKNİK ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

KAFEİK ASİT FENETİL ESTER YÜKLÜ KİTOSAN
NANOPARTİKÜL İÇEREN DOKU İSKELESİ ÜRETİMİ VE
KARAKTERİZASYONU

Ekin Bahar AYTUĞLU

YÜKSEK LİSANS TEZİ
Biyomühendislik Anabilim Dalı
Biyomühendislik Programı

Danışman
Doç. Dr. Serap DERMAN

Temmuz, 2021

T.C.
YILDIZ TEKNİK ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

**KAFEİK ASİT FENETİL ESTER YÜKLÜ KİTOSAN NANOPARTİKÜL
İÇEREN DOKU İSKELESİ ÜRETİMİ VE KARAKTERİZASYONU**

Ekin Bahar AYTUĞLU tarafından hazırlanan tez çalışması 12.07.2021 tarihinde aşağıdaki jüri tarafından Yıldız Teknik Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Biyomühendislik Anabilim Dalı Biyomühendislik Programı **YÜKSEK LİSANS TEZİ** olarak kabul edilmiştir.

Doç. Dr. Serap DERMAN
Yıldız Teknik Üniversitesi
Danışman

Jüri Üyeleri

Doç. Dr. Serap DERMAN, Danışman
Yıldız Teknik Üniversitesi

Doç. Dr. Emrah Şefik ABAMOR, Üye
Yıldız Teknik Üniversitesi

Dr. Öğr. Üyesi Sezen Canım ATEŞ, Üye
İstanbul Yeniüzyıl Üniversitesi

Danışmanım Doç. Dr. Serap DERMAN sorumluluğunda tarafımca hazırlanan Kafeik Asit Fenetil Ester Yüklü Kitosan Nanopartikül İçeren Doku İskelesi Üretimi ve Karakterizasyonu başlıklı çalışmada veri toplama ve veri kullanımında gerekli yasal izinleri aldığımı, diğer kaynaklardan aldığım bilgileri ana metin ve referanslarda eksiksiz gösterdiğimi, araştırma verilerine ve sonuçlarına ilişkin çarpıtma ve/veya sahtecilik yapmadığımı, çalışmam süresince bilimsel araştırma ve etik ilkelerine uygun davrandığımı beyan ederim. Beyanımın aksinin ispatı halinde her türlü yasal sonucu kabul ederim.

Ekin Bahar AYTUĞLU

İmza

*Emeği geçen herkese,
aileme ve
eşıme*



TEŞEKKÜR

Yüksek lisans eğitimimde tez danışmanlığımı üstlenen, bilgilerini ve tecrübelerini benimle paylaşan hocam sayın *Doç. Dr. Serap DERMAN*'a, lisans eğitimimden itibaren her daim yanımda olan ve desteğini her zaman üzerimde hissettiğim sayın *Araş. Gör. Dr. Sibel EKEN KORKUT*'a, biyomühendislik bilimine dair öğrendiğim her şeyde emeği olan sayın *Nilbeste BONCUKÇU*'ya, laboratuvara geldiğim ilk andan itibaren kendilerinden sürekli bir şeyler öğrenme şansını yakaladığım sayın *Dr. Burcu UÇAR ACAR* ve *Dr. Tayfun ACAR*'a, gece-gündüz, hafta içi-hafta sonu demeden tezime verdikleri destek için sayın *İrem ÇOKSU* ve *Melis IŞIK*'a, tez dönemim boyunca yardımlarını hiç eksik etmeyen sayın *Buşra AKGÜL*'e, tezim için gerekli kimyasalların temininden manevi desteklerine kadar her konuda minnettar olduğum başta sayın *Sinem DEMİRHAN* ve *Erhan KOÇ* olmak üzere tüm mesai arkadaşlarıma,

Bu süreçte yanımda olan ismini yazamadığım tüm meslektaşlarıma,

Ve emeklerinin karşılığını asla ödeyemeyeceğim *annem*, *babam* ve *eşime* sonsuz teşekkürlerimi sunarım.

Ekin Bahar AYTUĞLU

İÇİNDEKİLER

SİMGE LİSTESİ	viii
KISALTMA LİSTESİ	x
ŞEKİL LİSTESİ	xiii
TABLO LİSTESİ	xvi
ÖZET	xvii
ABSTRACT	xix
1 GİRİŞ	1
1.1 Literatür Özeti	1
1.2 Tezin Amacı	3
1.3 Hipotez	3
2 Genel Bilgiler	4
2.1 Kıkırdak Doku	4
2.1.1 Fibrokıkırdak	5
2.1.2 Elastik Kıkırdak	5
2.1.3 Hiyalin Kıkırdak	5
2.2 Osteoartrit (OA)	7
2.2.1 Osteoartritte Etkili Faktörler	8
2.2.2 Osteoartrit Tanı Yöntemleri	9
2.2.3 Osteoartrit Tedavi Yöntemleri	9
2.3 Doku Mühendisliği ve Doku İskeleleri	10
2.3.1 Sentetik Polimer Esaslı Doku İskeleleri	13
2.3.2 Doğal Polimer Esaslı Doku İskeleleri	13
2.4 Nanomateryaller	18
2.4.1 Karbon Allotropları	18
2.4.2 Nanopartiküller	19
2.5 Polimerik Nanopartiküller	20
2.5.1 Polimerik Nanopartikül Çeşitleri	21

2.6	Kitosan Nanopartiküller (ChNP)	22
2.6.1	ChNP Sentez Yöntemleri	23
2.7	Polimerik Nanopartiküllerin Biyolojik Sistemlerde Kullanılmasının Avantajları	26
2.8	Kontrollü İlaç Salım Sistemleri	27
2.8.1	Modüle Kontrollü Sistemler	28
2.8.2	Çözücü Aktif Sistemler	28
2.8.3	Kimyasal Kontrollü Sistemler	29
2.8.4	Difüzyon Kontrollü Sistemler	30
2.9	Nanopartiküler İlaç Taşıyıcı Sistemler ve Karakterizasyon	30
2.9.1	Partikül Boyutu	31
2.9.2	Partikül Yüzey Özellikleri	31
2.9.3	İlaç Yükleme Kapasitesi	31
2.9.4	İlaç Salımı	32
2.10	Kafeik Asit Fenetil Ester (CAPE)	32
3	DENEYSEL ÇALIŞMALAR	34
3.1	Kullanılan Kimyasal Maddeler	34
3.2	Kullanılan Cihazlar ve Ölçüm Yöntemleri	34
3.3	Deneysel Yöntem	37
3.3.1	Stok Çözeltilerin Hazırlanması	37
3.3.2	CAPE'nin Kalibrasyon Eğrisinin Oluşturulması	38
3.3.3	İyonik Jelasyon Yöntemiyle Boş ChNP'in Sentezi	38
3.3.4	İyonik Jelasyon Yöntemiyle CAPE Yüklü ChNP'in Sentezi	38
3.3.5	Doku İskeleleri Üretimi	39
3.3.6	Boyut ve Zeta Potansiyel Ölçümleri	39
3.3.7	Reaksiyon Veriminin Hesaplanması	40
3.3.8	Enkapsülasyon Etkinliğinin Hesaplanması	40
3.3.9	Yükleme Kapasitesinin Hesaplanması	40
3.3.10	FT-IR Ölçümleri	40
3.3.11	SEM Analizi	40
3.3.12	<i>In-vitro</i> Salım Çalışmaları	41
3.3.13	Şişme Testi	41
3.3.14	Biyouyumluluk Testi	42
3.3.15	Antioksidan Aktivite Testi	43
4	DENEY SONUÇLARI	44
4.1	CAPE'nin Kalibrasyon Eğrisi	44
4.2	İyonik Jelasyon Yöntemiyle Sentezlenen Boş ChNP'in Karakterizasyonu	45
4.2.1	Boş ChNP'in Boyut ve Zeta Potansiyel Analizi	45

4.2.2	Boş ChNP'in Reaksiyon Verimi Sonuçları	46
4.2.3	Boş ChNP'in FT-IR Analizi	46
4.3	İyonik Jelasyon Yöntemiyle Sentezlenen CAPE Yüklü ChNP'in Karakterizasyonu	47
4.3.1	CAPE Yüklü ChNP'in Boyut ve Zeta Potansiyel Analizi	47
4.3.2	CAPE Yüklü ChNP'in Reaksiyon Verimi Sonuçları	49
4.3.3	CAPE Yüklü ChNP'in Enkapsülasyon Etkinliği Sonuçları	49
4.3.4	CAPE Yüklü ChNP'in Yükleme Kapasitesi Sonuçları	49
4.3.5	CAPE Yüklü ChNP'in FT-IR Analizi	50
4.4	Doku İskelesi Karakterizasyonu	51
4.4.1	Doku İskelelerinin FT-IR Analizi	51
4.4.2	Doku İskelelerinin SEM Analizi	52
4.4.3	CAPE Yüklü ChNP İçeren Doku İskelesinin <i>In-vitro</i> Salım Çalışmaları	58
4.4.4	Doku İskelelerinin Şişme Testi Sonuçları	58
4.4.5	CAPE yüklü ChNP İçeren Doku İskelesinin Biyouyumluluk Testi Sonuçları	59
4.4.6	Antioksidan Aktivite Sonuçları	61
5	SONUÇ VE ÖNERİLER	63
	KAYNAKÇA	65
	TEZDEN ÜRETİLMİŞ YAYINLAR	76

SİMGE LİSTESİ

A	Absorbans
α	Alfa
β	Beta
k	Boltzman Sabiti
I	Çıkan Işın Şiddeti
η	Çözücü Viskozitesi
dk	Dakika
$^{\circ}C$	Derece Santigrat
U_E	Elektroforetik Hareketlilik
ϵ	Epsilon
T	Geçirgenlik
I_0	Giren Işın Şiddeti
g	Gram
pH	Hidrojen Gücü
$f(ka)$	Henry Fonskiyonu
kDa	KiloDalton
L	Litre
ml	Mililitre
mm	Milimetre
M	Molar
M_A	Molekül Ağırlığı
μm	Mikrometre
μM	Mikromolar

mV	Milivolt
nm	Nanometre
cm	Santimetre



KISALTMA LİSTESİ

AA	Antioksidan Aktivite
ADAMT	Trombospondin Motifli Disintegrin Ve Metaloproteinaz
BMPs	Kemik Morfogenetik Proteinleri
CAPE	Kafeik Asit Fenetil Ester
Ch	Kitosan
ChNP	Kitosan Nanopartiküller
COX	Siklooksigenaz
CS	Kondroitin Sülfat
CT	Bilgisayarlı Tomografi
CTX-II	C-Terminal Telopektidi Kollajen Tip II
DPPH	2,2-Difenil-1-Pikrilhidrazil
ECM	Hücre Dışı Matrisi
EE	Enkapsülasyon Etkinliği
FGF-2	Fibroblast Büyüme Faktörü
FT-IR	Fourier Dönüşümlü Kızılötesi Spektrofotometresi
GAG	Glikozaminoglikan
GalNac	N-Asetil-D-Galaktozamin
GF	Büyüme Faktörü
GlcA	D-Glukuronik Asit
HA	Hyaluronik Asit
HCl	Hidroklorik Asit
HDCA-PEGCA	Hegzadesilsiyanoakrilat-ko-poli(etilen glikol) siyanoakrilat
IGF-1	İnsülin benzeri büyüme faktörü 1

IL	İnterlökin
MKH	Mazenkimal Kök Hücre
MMP	Matriks Metalloproteinaz
MMWC	Orta Molekül Ağırlıklı Kitosan
MRI	Manyetik Rezonans Görüntüleme
MTT	3-(4,5-dimetiltiyazol2-yl)-2,5-difeniltetrazolyum-bromür
NF- κ B	Nükleer Faktör Kappa B
NOS	Nitrit Oksit Sentaz
NaCl	Sodyum Klorür
NaOH	Sodyum Hidroksit
$Na_2HPO_4 \cdot 7H_2O$	Disodyum Hidrojen Fosfat Heptahidrat
$NaH_2PO_4 \cdot 2H_2O$	Sodyum Dihidrojen Fosfat Dihidrat
NSAID	Non-Steroid Antienflamatuar İlaçlar
OA	Osteoartrit
PBCA	Poli(n-bütilsiyanoakrilat)
PBS	Fosfat Tamponu
PCL	Poli(ϵ -kaprolakton)
PCL-PEG	Poli(ϵ -kaprolakton)-poli(etilen glikol)
PDI	Polidispersite İndeksi
PGA	Poliglikolik Asit
PICBA	Poli(izobütilsiyanoakrilat)
PIHCA	Poli(izohegzilsiyanoakrilat)
pKa	Asitlik Sabiti
PLA	Polilaktik Asit
PLA-PEG	Poli(laktik)-poli(etilen glikol)
PLGA-PEG	Poli(laktik-ko-glikolik)-poli(etilen glikol)
PTFE	Politetrafloroetilen
rpm	Dakikadaki Dönüş Sayısı
RV	Reaksiyon Verimi

SEM	Taramalı Elektron Mikroskobu
TGF- β	Dönüştürücü Büyüme Faktörü Beta
TGF- α	Tümör Nekroz Faktör Alfa
TPP	Tripolifosfat
UV-VIS	Ultraviyole-Görünür Işık Spektrofotometresi
YK	Yükleme Kapasitesi
YŞ	Yüzde Şişme
Z-ave	Ortalama Parçacık Boyutu
Z-pot	Zeta Potansiyel



ŞEKİL LİSTESİ

Şekil 2.1	Kemik ve kıkırdığın şematik gösterimi [23]	5
Şekil 2.2	a) Fibrokıkırdak b) Elastik kıkırdak c) Hiyalin kıkırdığın yapısal gösterimi [31]	6
Şekil 2.3	Eklem kıkırdığının yapısal gösterimi [33]	7
Şekil 2.4	Sağlıklı ve osteoartritli eklem arasındaki yapısal farklılıklar [36] . . .	8
Şekil 2.5	Doku mühendisliği yaklaşımlarının genel şeması [44]	11
Şekil 2.6	Kondroitin 4-sülfat ve kondroitin 6-sülfat'ın molekül yapıları [50] . .	14
Şekil 2.7	CS sentezinin şematik gösterimi [52]	14
Şekil 2.8	Enflamasyon sonucu oluşan kıkırdak kaybı ve ilgili moleküllerin gösterimi [57]	15
Şekil 2.9	Kitinin deasetilasyonu sonucu elde edilen Ch [60]	16
Şekil 2.10	Ch'nin pH'a bağlı yük değişimi ve çözünürlük durumu [11]	17
Şekil 2.11	Fulleren, grafen ve karbon nanotüplerin şematik gösterimi [67] . . .	19
Şekil 2.12	Aşağıdan-yukarıya ve yukarıdan-aşağıya yöntemlerinin şematik gösterimi	20
Şekil 2.13	Dendrimer, misel, lipozom ve polimerik nanopartikül yapıları [70] .	20
Şekil 2.14	Nanokapsül ve nanoküre formlarının şematik gösterimi [72]	21
Şekil 2.15	Emülsiyon çapraz bağlama yönteminin şematik gösterimi	23
Şekil 2.16	Emülsiyon çözücü difüzyon yönteminin şematik gösterimi	24
Şekil 2.17	Ters misel oluşturma yönteminin şematik gösterimi	24
Şekil 2.18	Tekli emülsiyon-iyonik jelasyon ikili yönteminin şematik gösterimi .	25
Şekil 2.19	Ch ve TPP arasında gerçekleşen iyonik jelasyon reaksiyonu	26
Şekil 2.20	Kontrollü salım, sürekli salım ve konvensiyonel salım profilleri [93]	27
Şekil 2.21	Plazmadaki ilaç konsantrasyonunun doz uygulamasına göre değişimi [48]	28
Şekil 2.22	Osmotik kontrollü sistemlerin şematik gösterimi	29
Şekil 2.23	Şişme kontrollü sistemlerin şematik gösterimi	29
Şekil 2.24	Kimyasal kontrollü sistemlerin şematik gösterimi	29
Şekil 2.25	Rezervuar kontrollü sistemlerin şematik gösterimi	30
Şekil 2.26	Matriks kontrollü sistemlerin şematik gösterimi	30
Şekil 2.27	CAPE'nin moleküler yapısı [108]	32

Şekil 2.28 CAPE'nin sentez reaksiyonu [109]	33
Şekil 4.1 CAPE'nin kalibrasyon eğrisi grafiği	44
Şekil 4.2 Boş ChNP'e ait boyut dağılımı grafiği	45
Şekil 4.3 Boş ChNP'e ait zeta potansiyel grafiği	46
Şekil 4.4 Ch polimerinin ve boş ChNP'in karşılaştırmalı FT-IR spektrumu . . .	47
Şekil 4.5 CAPE yüklü ChNP'lerin boyut dağılımı grafiği	48
Şekil 4.6 CAPE yüklü ChNP'lerin zeta potansiyel grafiği	48
Şekil 4.7 Serbest CAPE ve CAPE yüklü ChNP'in karşılaştırmalı FT-IR analizi . .	50
Şekil 4.8 CAPE yüklü ChNP eklenmiş ve eklenmemiş doku iskelelerinin FT-IR analizi	51
Şekil 4.9 CAPE yüklü ChNP eklenmemiş doku iskelesinin 220x büyütmede alınan SEM görüntüsü	52
Şekil 4.10 CAPE yüklü ChNP eklenmemiş doku iskelesinin 300x büyütmede alınan SEM görüntüsü	53
Şekil 4.11 CAPE yüklü ChNP eklenmemiş doku iskelesinin 1000x büyütmede alınan SEM görüntüsü	53
Şekil 4.12 CAPE yüklü ChNP eklenmemiş doku iskelesinin 2400x büyütmede alınan SEM görüntüsü	54
Şekil 4.13 CAPE yüklü ChNP eklenmiş doku iskelesinin 1000x büyütmede alınan SEM görüntüsü	55
Şekil 4.14 CAPE yüklü ChNP doku eklenmiş doku iskelesinin 2000x büyütmede alınan SEM görüntüsü	55
Şekil 4.15 CAPE yüklü ChNP eklenmiş doku iskelesinin 5000x büyütmede alınan SEM görüntüsü	56
Şekil 4.16 CAPE yüklü ChNP eklenmiş doku iskelesinin 10000x büyütmede alınan SEM görüntüsü	56
Şekil 4.17 CAPE yüklü ChNP eklenmiş doku iskelesinin 40000x büyütmede alınan SEM görüntüsü	57
Şekil 4.18 CAPE yüklü ChNP eklenmiş doku iskelesinin 80000x büyütmede alınan SEM görüntüsü	57
Şekil 4.19 CAPE yüklü ChNP eklenmiş doku iskelesinin salım grafiği	58
Şekil 4.20 CAPE yüklü ChNP eklenmiş ve eklenmemiş doku iskelelerine uygulanan şişme testi grafiği	59
Şekil 4.21 48.saatte CAPE yüklü ChNP ve CAPE yüklü ChNP eklenmiş doku iskelesi örneklerinin tutulduğu besiyeri ortamlarının L929 hücre proliferasyonuna etkisinin MTT testi ile ölçülmesi sonucu elde edilen verilerin grafiği	60
Şekil 4.22 L929 fibroblast hücrelerin 24 saat inkübasyonu sonucu ortaya çıkan mikroskop görüntüsü	60

Şekil 4.23 CAPE yüklü ChNP eklenmiş ve eklenmemiş doku iskelelerinin karşılaştırmalı AA verileri	61
Şekil 4.24 DPPH serbest radikal süpürme reaksiyon mekanizması [144]	61



TABLO LİSTESİ

Tablo 2.1	Kıkırdak iyileşmesinde gerekli olan biyosinyal moleküller ve görevleri [8]	12
Tablo 2.2	İlaç taşıyıcı sistemlerde kullanılan polimerik yapılar [73]	22
Tablo 3.1	CAPE Konsantrasyon – absorbans verileri	38
Tablo 4.1	Boş ChNP'in ortalama boyut, PDI ve zeta potansiyel değerleri	45
Tablo 4.2	Boş ChNP'lerin reaksiyon verimi sonucu	46
Tablo 4.3	CAPE yüklü ChNP'lerin ortalama boyut, PDI ve zeta potansiyel değerleri	48
Tablo 4.4	CAPE yüklü ChNP'in reaksiyon verimi sonuçları	49
Tablo 4.5	CAPE yüklü ChNP'lerin enkapsülasyon etkinliği sonuçları	49
Tablo 4.6	CAPE yüklü ChNP'in yükleme kapasitesi sonuçları	50

Kafeik Asit Fenetil Ester Yüklü Kitosan Nanopartikül İçeren Doku İskelesi Üretimi ve Karakterizasyonu

Ekin Bahar AYTUĞLU

Biyomühendislik Anabilim Dalı
Yüksek Lisans Tezi

Danışman: Doç. Dr. Serap DERMAN

Doku mühendisliği, mevcut dokuyu korumak veya yeni doku oluşumunu desteklemek için alternatif seçenekler sunan multidisipliner bir çalışma alanıdır. Doku mühendisliğinin temel amaçlardan biri, mevcut ve yeniden yapılanma ihtiyacı duyulan doku ve organların onarılması ya da taklit edilmesi amacıyla doku iskelelerinin oluşturulmasıdır. Doku iskelelerinde hücrelerin doku onarımı için ihtiyaç duyduğu bileşen desteği, genellikle polimerik materyaller ile sağlanabilmektedir. Bu doğrultuda literatürde insan vücudunda doğal olarak bulunan polimerlerden olan kondroitin sülfat (CS) ve doğal bir polimer olan kitosan (Ch)'den faydalanarak oluşturulmuş birçok doku iskelesi çalışması mevcuttur.

Bu tez çalışmasında, kafeik asit fenetil ester (CAPE) yüklü kitosan nanopartiküllerinin (ChNP) eklendiği, Ch ve CS'den oluşan, osteoartrit (OA) tedavisinde kullanılabilecek ve literatürde daha önce çalışılmamış bir doku iskelesinin üretilmesi hedeflenerek bu doku iskelesinin fizikokimyasal ve morfolojik özellikleri ile beraber ilaç salımı, şişme testi, MTT (3-(4,5-dimetiltiyazol2-yl)-2,5-difeniltetrazolyum-bromür) ile biyoyumluluk ve 2,2-difenil-1-pikrilhidrazil (DPPH) ile serbest radikal temizleme metoduna göre antioksidan aktivite (AA) analizlerinin incelenmesi hedeflendi.

Bu hedef doğrultusunda Ch yalnızca lineer olarak kullanılmamakla birlikte nanopartiküler etken madde taşıyıcı olarak da kullanıldı. Etken madde olarak kullanılan CAPE; antiviral, antialerjik, antikanser, antimikrobiyal, antioksidan ve antienflamatuar özellikte bir moleküldür. Doku yıkımına sebebiyet veren ve eklem dokusunun bozulması sonucu açığa çıkan serbest radikallere hidrojen sağlayarak

antioksidan özellik, osteoartritte baş gösteren enflamasyona neden olan nükleer faktör kappa B (NF- κ B) transkripsiyon faktörünü inhibe ederek antienflamatuar özellik gösterir.

Sentezlenen nanopartiküllerin; boyut ve polidispersite indeksi (PDI) analizleri dinamik ışık saçılması (DLS) tekniği, zeta potansiyel değerleri ise elektroforetik ışık saçılması (ELS) tekniği ile yapıldı. Enkapsülasyonun gerçekleşip gerçekleşmediğinin tespiti için Fourier Dönüşümlü Kızılötesi (FT-IR) spektroskopisi, yükleme kapasiteleri ve enkapsülasyon etkinlikleri analizleri için Ultraviyole-Görünür Işık (UV-Vis) spektroskopisi kullanıldı.

Üretilen doku iskelesinin fizikokimyasal karakterizasyonu FT-IR spektroskopisi, morfolojik karakterizasyonu ise Taramalı Elektron Mikroskopisi (SEM) ile gerçekleştirilmiş olup, ilaç salımı, şişme testi, MTT ile biyoyumluluk ve DPPH ile AA analizleri yapıldı.

Bu çalışmayla literatürde ilk defa OA tedavisi için; Ch, CAPE yüklü ChNP ve CS'den oluşan 3 bileşenli doku iskelesi üretildi.

Anahtar Kelimeler: CAPE, kitosan nanopartikül, kondroitin sülfat

ABSTRACT

Preparation and Characterization of Caffeic Acid Phenethyl Ester Loaded Chitosan Nanoparticle Entegred Tissue Scaffold

Ekin Bahar AYTUĞLU

Department of Bioengineering
Master of Science Thesis

Advisor: Assoc. Prof. Dr. Serap DERMAN

Tissue engineering is a multidisciplinary field of study that offers alternative options to preserve existing tissue or support new tissue formation. One of the main purposes of tissue engineering is to generate tissue scaffolds to repair or imitate existing tissues and organs that need reconstruction. In tissue scaffolds, the components that are required by the cells for tissue repair can usually be provided by polymeric materials. In this direction, there are many tissue scaffold studies created by using chondroitin sulfate (CS), which are naturally found in the human body, and chitosan (Ch), a natural polymer that is found in the respective literature.

The goal of this thesis research is to produce an antimicrobial tissue scaffold that is to conjugate Caffeic acid phenethyl ester (CAPE) loaded with chitosan nanoparticles (ChNP) to the consisting of Ch and CS, which has the potential for treating of osteoarthritis (OA) and has not been studied in the literature before, and the physicochemical and morphological characteristics of this tissue scaffold, as well as drug release analysis, swelling test, biocompatibility with MTT ((3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide) and antioxidant activity analysis with 2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl (DPPH) were aimed to be assayed.

In line with this goal, chitosan is not only used linearly, but also as a nanoparticular active substance carrier. Using active substance carrier CAPE; is a molecule which manifests antiviral, antiallergic, anticancer, antimicrobial, antioxidant and anti-inflammatory molecule. It has antioxidant properties by providing hydrogen to

free radicals that cause tissue destruction and is released as a result of the deterioration of joint tissue, and it has anti-inflammatory properties by inhibiting the nuclear factor kappa B (NF- κ B) transcription factor, which causes inflammation in osteoarthritis.

Synthesized nanoparticle size and polydispersity index (PDI) analyzes were performed using dynamic light scattering (DLS) technique, and zeta potential values were performed using electrophoretic light scattering (ELS) technique. Fourier Transform Infrared (FT-IR) spectroscopy for the confirmation of the encapsulation and Ultraviolet–Visible (UV-VIS) spectroscopy to assay the encapsulation efficacy as well as for drug loading capacity.

Physicochemical characterization of the produced tissue scaffold was performed by FT-IR and morphological characterization by Scanning Electron Microscopy (SEM), swelling test and drug release analysis, drug release analysis, swelling test, biocompatibility with MTT and antioxidant activity with DDPH analyzes were performed.

With this study, three-component antimicrobial tissue scaffold, Ch, CAPE loaded ChNP and CS, was produced for the first time in the literature.

Keywords: CAPE, chitosan nanoparticle, chondroitin sulfate

1.1 Literatür Özeti

Eklem kıkırdağı, OA gibi dejeneratif eklem rahatsızlıkları nedeniyle sıklıkla hasar gören bir bağ dokusu olup, vaskülarizasyon yeteneğine sahip olmadığından kendi kendini onarma hızı düşüktür. Dünyadaki en yaygın eklem bozukluklarından olan OA; eklem kıkırdağının bozulması, kıkırdağın incilmesi veya aşınması gibi durumlarda ortaya çıkmaktadır [1]. Biyolojik veya mekanik sebepleri olmasının yanında çeşitli tedavi yöntemleri mevcuttur. Bunlar; farmakolojik olan ve olmayan tedaviler, cerrahi müdahaleler ve doku iskelelerinin kullanımıdır [2].

Farmakolojik tedavilerin hafif şiddette OA için etkili olup böbrek fonksiyon bozukluğu, kan basıncı yükselmesi ve kardiyovasküler riskler gibi yan etkilerinin söz konusu olduğu belirtilmiştir [3]. Farmakolojik olmayan tedaviler de düşük şiddette OA için etkili olup terapötik egzersizleri kapsar ve kısa vadede sonuçlar vermektedir [4]. Cerrahi müdahaleler ise bahsedilen tedavilere yanıt vermeyen durumlarda uygulanmaktadır. Ancak eklem replasmanını içeren bu müdahalelerde lezyonların oluşması ve maliyet faktörü sınırlayıcı etmenlerdir [5, 6].

Bu yöntemlerin sahip olduğu dezavantajlar, doku mühendisliği yaklaşımları ile çözüme kavuşabilmektedir.

Doku mühendisliğinin temel amacı, mevcut ve yeniden yapılanma ihtiyacı duyulan doku ve organları onarmak veya taklit etmektir. Bu amaca yönelik kullanılan matrikslere doku iskelesi adı verilir. Doku iskelelerinin ortak noktası, üzerinde hücrelerin tutunabildiği, çoğalabildiği, işlevlerini yerine getirebildiği ve hücre dışı matriksi (ECM) taklit edebilen yapılar olmaları gerektiğidir [7].

Doku iskeleleri oluşturulurken ECM'de salgılanan hücresel büyüme, çoğalma ve farklılaşmada uyarıcı etki yaratan biyosinyal moleküllerinin kullanılması ya da sentetik bileşenlerden benzer etkilerin alınması gerekir [8].

Bu amaç doğrultusunda ilgili tez çalışmasında kondroitin sülfat (CS) ve kitosan (Ch) bileşenli literatürde daha önce çalışılmamış bir doku iskelesi üretimi sağlandı.

CS; kıkırdak matriksinin yapısında doğal olarak bulunan polisakkarit yapılı bir biyosinyal moleküldür. Doku entegrasyonu için gerekli olan antienflamatuar aktivite, hücresel iyileştirme ve biyolojik aktivite gibi birçok avantajı vardır. Ancak CS, tek başına kullanıldığında yeterli biyosinyal etki yaratmayacağı ve mekanik özelliklerinin düşük olacağının öngörülmesi [9, 10] Ch gibi alternatif polimerle birleştirilerek kullanılması gerektiğini düşündürdü.

Ch; kitinin deasetillenmesi ile elde edilen ve vücudumuzda doğal olarak bulunmayan biyobozunur bir polimerdir. Son yıllarda Ch temelli malzemelere ve bunların doku mühendisliği alanındaki uygulamalarına sıklıkla rastlanmaktadır. Bunun sebebi canlı organizma tarafından minimum düzeyde yabancı madde şeklinde algılanması, antibakteriyel özellikleri, hücre büyümesi için uygun gözenekli yapıya sahip olması ve farklı formlarda kullanılabilmesidir. Bu formlarda dikkat çeken özellik lineer olarak kullanıldığında Ch'nin de tıpkı CS gibi mekanik dayanıklılık problemlerinin söz konusu olmasıdır [11, 12].

O nedenle bu tez çalışmasında Ch yalnızca lineer olarak değil, aynı zamanda kitosan nanopartikül (ChNP) formda etken madde taşıyıcı olarak kullanılmıştır.

Böylece mekanik olarak iyileştirilmiş olmanın yanı sıra nanopartiküller taşıyıcı sistemlerin sağladığı etken maddenin stabilitesini ve çözünürlüğünü artırma, fiziksel ve kimyasal olarak ECM'de eşit şekilde dağılma gibi özelliklerinden de faydalanılmak istendi [13].

OA tedavisi için kullanılması düşünülen CAPE, propolisin etken maddesi olup antiviral, antialerjik, antikanser, antimikrobiyal, güçlü antioksidan ve antienflamatuar özellikleri olan fenolik bir bileşendir. Antioksidan özelliği sahip olduğu -OH gruplarının DPPH radikaline sağladığı hidrojen transferinden, antienflamatuar özelliği sitokinlere, mekanik strese ve en önemlisi oksidatif strese tepki olarak aktive edilen nükleer faktör kappa B (NF- κ B) transkripsiyon faktörünü inhibe edici özelliğinden gelmektedir [14–18].

Tüm bu avantajlar göz önüne alındığında OA tedavisi için üretilen doku iskelesinin bir bileşeni olan ChNP'lere, CAPE molekülünün enkapsüle edilmesine karar verildi. Böylece CAPE molekülünün kontrollü salımını sağlayan literatürde daha önce çalışılmamış biyoaktif doku iskelesi üretildi.

1.2 Tezin Amacı

Bu tez çalışmasının amacı; Ch, CAPE yüklü ChNP ve CS'den oluşan, OA tedavisinde kullanılabilecek ve literatürde daha önce çalışılmamış bir doku iskelesinin üretilmesi ve bu doku iskelesinin fizikokimyasal ve morfolojik özellikleri ile beraber ilaç salımı, şişme testi, biyouyumluluk ve AA açısından incelenmesidir.

1.3 Hipotez

İlgili tez çalışmasında literatürde ilk defa üretilen 3 bileşenli bu doku iskelesinin CAPE yüklü ChNP'i içermesinin;

- o Doku iskelesinin gözenek çapını arttırma,
- o Doku iskelesine kontrol altına alınabilen şişme özelliği sağlama,
- o Güçlü antioksidan özellikteki CAPE molekülünün kontrollü salımının yapılması sayesinde OA tedavisi için serbest radikalleri elimine edebilmesi hipotezlendi.

Böylece bu doku iskelesinin OA tedavisinde kullanılabilecek potansiyel bir doku iskelesinden istenen özellikleri karşılaması beklenmektedir.

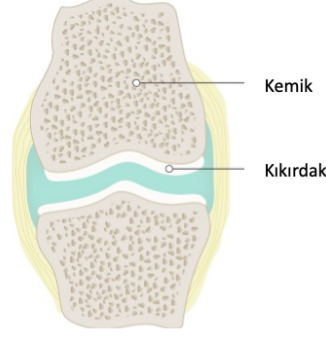
2.1 Kıkırdak Doku

ECM, hücrelere fizyolojik bariyer sağlayan, doku ve organların arasını dolduran üç boyutlu makromoleküler ağıdır. Hücre adezyonu ve doku gelişiminde önemli rol oynayan kollajenler, elastin, proteoglikanlar ve kollajenöz olmayan glikoproteinlerden oluşan kompleks bir yapıya sahiptir. Bu çok bileşenli ağ, hücresel yapışma, büyüme, çoğalma, göç ve hayatta kalma gibi biyokimyasal ve mekanik olaylarda aktif rol oynar [19, 20]. En önemli görevi; hücresel büyüme ve gelişme için gerekli olan büyüme faktörleri (GF) başta olmak üzere, tüm biyosinyal moleküllerin mekanizmasını düzenlemektir [21].

Bağ doku ise erişkin mezenkimal kök hücrelerden (MKH) oluşan ve dokulara destek sağlayan yapıdır. Bağ dokunun hücresel içeriğini fibroblastlar, mast hücreleri, yağ hücreleri, osteoblastlar ve osteositler, kondroblastlar ve kondrositler ile kan hücreleri oluşturur. ECM'sini proteoglikanlar, glikozamioglikanlar (GAG), fibronektin ve fibrinojen oluştururken kollajen lifler, elastik lifler ve ağsı lifler de içermektedir. MKH gelişim süreçlerinde bölündükten sonra göç ederek yağ, kemik, kan ve kıkırdak gibi farklı bağ doku yapılarını oluşturur [22].

Bağ dokudan farklılaşarak oluşan kıkırdak doku, kemiklere uygulanan kuvvete karşı direnç göstermesini sağlayan, kemiklere esneklik ve dayanıklılık katan yapıdır. Kondrosit hücreleri ile ECM'sinde bulunan çeşitli proteoglikanlar, GAG'lar ve kollajenlerden oluşan kıkırdağın fibrokıkırdak, elastik kıkırdak ve hiyalin kıkırdak olarak 3 tipi bulunur [23].

Kemik ve kıkırdağın şematik gösterimi Şekil 2.1'de verildi.



Şekil 2.1 Kemik ve kıkırdığın şematik gösterimi [23]

2.1.1 Fibrokıkırdak

Fibrokıkırdak; intervertebral disklerde, kostokondral eklemlerde ve menisküs gibi özelleşmiş yapılarda bulunur. Fiziksel ve fonksiyonel olarak yoğun lifli bağ doku ile hiyalin kıkırdak arasında bir karakteri vardır. Diğer kıkırdak yapılarından farklı olarak lifli perikondrium içermez. Bol miktarda tip I ve tip II kollajen içeriği ile karakterize edilir [24].

2.1.2 Elastik Kıkırdak

Elastik kıkırdak, kulaktaki pinna ve östaki yapıları ile gırtlak ve epiglotta bulunarak bu bölgelere yapısal destek ve esneklik sağlar. Fibrokıkırdığın aksine perikondrium zar ile çevrilidir. Su, kollajen, GAG ve elastik liflerden oluşur. Fiziksel olarak hiyalin kıkırdağa benzer ancak tip II kollajenin yanında sahip olduğu elastik lifler ile hiyalin kıkırdaktan ayrılır [25].

2.1.3 Hiyalin Kıkırdak

İnsan vücudunda en çok bulunan kıkırdak türü olan hiyalin kıkırdak, başta eklemler olmak üzere burunda, kaburgalarda ve trakeal halkalarda bulunur. Perikondrium zar ile kaplı olan bu kıkırdak türü temel olarak su, kondrositler, kollajen lifler ile proteoglikanlardan oluşur ve bulunduğu bölgeye mekanik dayanıklılık sağlar [26].

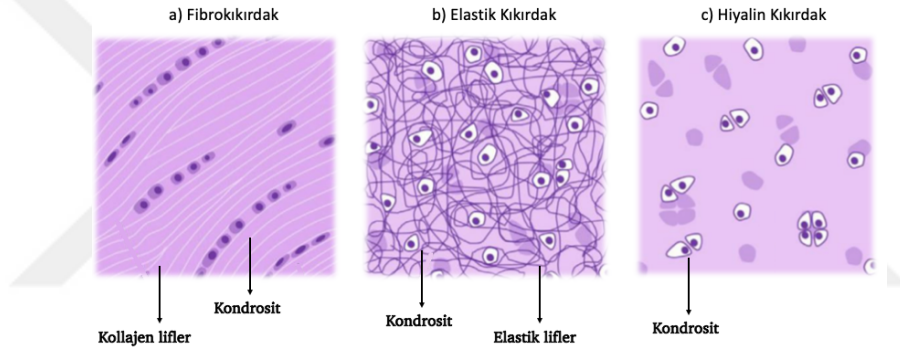
Hiyalin kıkırdağın içeriği detaylandırılacak olursa; kondrositler hiyalin kıkırdağın hacminin %1-5'ini oluşturur. Tip II kollajen ve proteoglikan gibi temel matriks bileşenlerinin sentezinden sorumludur [27]. Farklı tipleri bulunan kollajen lifler ise eklem kıkırdağının hacimce %10-20'sini oluşturur. Tip II kollajen eklem kıkırdağında en çok bulunan kollajen tipidir ve kıkırdağa gerilme direnci sağlar. Tip VI kollajen elastik liflerin oluşumundan, tip IX kollajen ise lifler arasındaki bağlantılardan sorumludur. Tip XI kollajen kıkırdağa yapısal destek sağlar ve kıkırdak

mineralizasyonuna yardımcı olur. Tip X kollajen ise çekirdekli lif oluşumunda görev alır [28].

GAG'lar lineer ve anyonik, tekrarlı disakkarit birimlerinden oluşan yapılardır ve heparan sülfat, keratan sülfat, hyaluronik asit ve kondroitin sülfat gibi çeşitleri vardır [29].

Proteoglikanlar, GAG zincirlerine kovalent olarak bağlanmış ve bir çekirdek proteinine sahip hidrofilik makromoleküllerdir. Dokunun mekanik dayanımı ile sıvı-elektrolit dengesinden sorumludur. İçerdiği negatif yüklü sülfat ve karboksil grupları sayesinde pozitif yüklü iyonları çekerek ECM'deki inorganik iyon konsantrasyonunu ve osmolariteyi artırır [30].

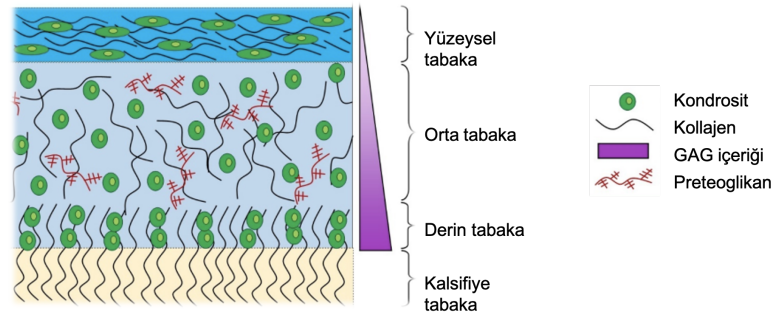
Hiyalin kıkırdak, elastik kıkırdak ve fibrokıkırdağın yapısal gösterimi Şekil 2.2'de verildi.



Şekil 2.2 a) Fibrokıkırdak b) Elastik kıkırdak c) Hiyalin kıkırdağın yapısal gösterimi [31]

Hiyalin kıkırdağın en fazla bulunduğu yapı olan hareketli eklem dokusu; kemiklerin uçlarında bulunur ve eklemlere kayganlık sağlayarak hareket kabiliyetlerini doğrudan etkiler. Su, proteoglikan, kollajenöz ve kollajenöz olmayan proteinlerden oluşan yoğun ECM ile çevrelenmiş kondrosit ağıyla örülmüştür [32]. Eklem kıkırdağı GAG içeriğine göre yüzeysel, orta, derin ve kalsifiye olmak üzere 4 tabakaya ayrılır. GAG içeriği yüzeysel tabakadan kalsifiye tabaya doğru inildikçe artmaktadır. Yüzeysel tabakada kollajen lifleri eklem yüzeyine paralel ve yoğun şekilde konumlanırken orta tabakada kollajen lifleri rasgele dizilmiştir. Derin/kalsifiye tabakada ise kollajen lifleri eklem yüzeyine dik şekilde yerleşmiş durumdadır [33].

Eklem kıkırdağının yapısal gösterimi Şekil 2.3'de gösterildi.



Şekil 2.3 Eklem kıkırdağının yapısal gösterimi [33]

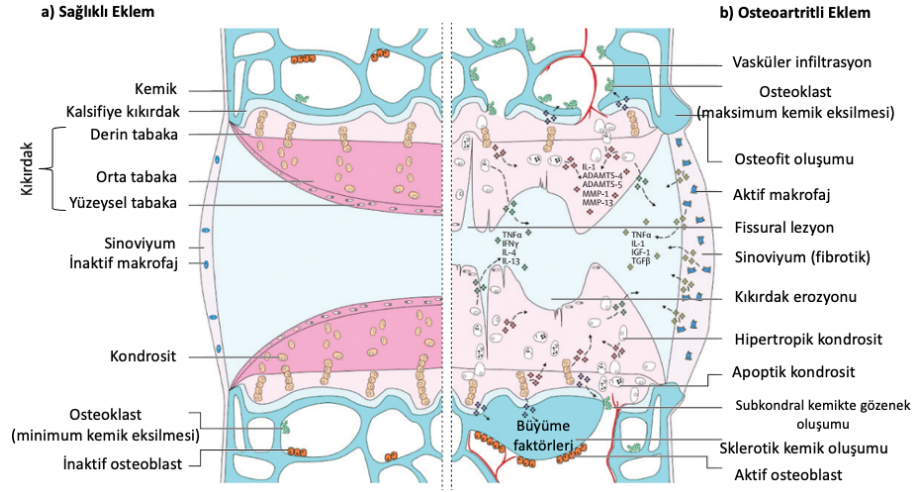
Eklem kıkırdağının esas görevi eklemlerin, sürtünme hareketinin kolaylaşmasını sağlamak ve mekanik direncini arttırmaktır. Bu görevlerin sağlıklı şekilde yerine getirilebilmesi, eklem kıkırdağının ve ECM'nin uyum içerisinde çalışmasına bağlıdır. Ancak kimi zaman bu uyum çeşitli travmalar sonucu bozulabilir ve eklem kıkırdağı hasar görebilir [34]. Hasar gören bu kıkırdak dokunun neden olduğu ve bu tez çalışmasına konu olan OA hastalığına dair bilgiler bir sonraki başlıkta verildi.

2.2 Osteoartrit (OA)

Osteoartrit (OA), eklem kıkırdağında ve subkondral kemikte doku yıkımına neden olan, özellikle enflamatuvar belirtiler ile ayırt edilebilen dejeneratif bir eklem rahatsızlığıdır. Dünya çapında en sık görülen eklem hastalığı olan OA, 60 yaş üstü erkeklerin yaklaşık %10'unda, kadınların ise %18'inde görülmektedir [1].

OA biyokimyasal olarak, enflamatuvar süreç başladıktan sonra diğer doku bileşenleri tarafından üretilen interlökin (IL)-1, IL-6, tümör nekroz faktör alfa (TNF- α), matriks metalloproteinaz (MMP), trombospondin motifli disintegrin ve metalloproteinaz (ADAMT) ve dönüştürücü büyüme faktörü beta (TGF- β) gibi enzimlerin kontrolsüz salımı ile ECM'de meydana gelen eklem yıkımı durumunu ifade eder [35, 36].

Sağlıklı ve osteoartritli eklem arasındaki yapısal farklılıklar Şekil 2.4'te verildi.



Şekil 2.4 Sağlıklı ve osteoartritli eklem arasındaki yapısal farklılıklar [36]

OA; eklem semptomları, patolojik semptomlar veya ikisinin bir arada olması ile karakterize edilir. Eklem semptomları eklem ağrısı veya eklem sertliği gibi değişiklikleri kapsarken, patolojik semptomlar bağ dokular ile kaslarda zayıflama, fokal hasar, eklem kıkırdağı kaybı, kemiğin osteofit yapısının anormal olarak yeniden şekillenmesi, tendon dokusu ve sinoviyum enflamasyonu ile subkondral kemikte meydana gelen değişiklikleri kapsar [36].

2.2.1 Osteoartritte Etkili Faktörler

Sinoviyal Enflamasyon: Eklemlerin destek dolgusu olan sinoviyal sıvıda enflamasyon meydana geldiğinde çeşitli biyokimyasal olaylar birbirini tetikler. Kondrosit hücreleri mekanik stres ve enflamatuvar sitokin sinyalleri nedeniyle normalden daha fazla aktifleşir. Bu fiziksel ve enflamatuvar temelli sinyallerin artması fenotipik bozukluklara, apoptoza ve enflamasyonla alakalı nitrit oksit sentaz (NOS), siklooksigenaz (COX) ve metalloproteinaz (MMP) gibi katabolik genlerin yanlış transkripsiyonuna ve salımına neden olur. Bu salım, doku yıkımının artmasını dolayısıyla osteoartriti tetikler [37].

Subkondral Kemikteki Bozulmalar: Subkondral kemik, eklem homeostazı için hayati önem taşımasının yanında eklem kıkırdağını örterek korur ve mekanik hareketlerde eklemlere binen yükün eşit şekilde dağılmasında görev alır. Subkondral kemikte meydana gelen aksamalarda eklemler faaliyetlerini sağlıklı şekilde yerine getiremez [38]. Literatürde, subkondral kemikte meydana gelen değişimlerin OA ile yakından ilişkili olduğu düşünülmektedir [38–40].

Bahsedilen OA'da etkili faktörlerin yanında beslenme, obezite, yaş, genetik, cinsiyet hormonları ve etnik köken gibi faktörler de etkilidir [36].

2.2.2 Osteoartrit Tanı Yöntemleri

OA'nın doğru teşhis edilmesi, hastalığın ilerleyişini görmek ve tedavi yöntemini doğru seçebilmek adına yapılması gereken önemli bir faktördür.

Görüntüleme: OA'nın tanı ve tedavisinde radyografik görüntüleme, bilgisayarlı tomografi (CT) ve manyetik rezonans görüntüleme (MRI) gibi görüntüleme yöntemleri kullanılmaktadır.

Radyografik görüntülemede ancak osteofit oluşumlar, subkondral kemik deformasyonları ve subkondral kistler gibi ileri evre OA semptomları görüntülenebilir. Dolayısıyla erken tanı için kullanılması uygun olmayan görüntüleme yöntemidir [41].

CT, eklem morfolojisini gösteren üç boyutlu görüntü sunması sebebiyle hastalığın gidişatına dair önemli bilgiler edinilmesinde kullanılır. Ancak MRI gibi eklemdaki tüm bileşenlerin durumları hakkında detaylı bilgi sağlayamadığı için OA tanı ve tedavisinde yetersiz kalabilir [42].

Kıkırdak morfolojisini yüksek çözünürlükte görüntülemesi sayesinde kıkırdığın biyokimyasal bileşiminin değerlendirilmesi ve eklem içindeki tüm yapıların detaylı şekilde tespit edilmesini sağlayan MRI, OA tanı ve tedavisinde kilit rol oynar. Hatta radyografik görüntülemede hiçbir belirti vermeyen hastaların kıkırdak kaybının MRI'da tespit edildiği literatürde bildirilmiştir [41].

Biyokimyasal İşaretleme: Bu tanı yönteminde ECM bileşenleri, kollajen veya pretoeglikanların bozunma ürünleri OA için belirteç olarak kullanılmaktadır. Bu bozunma ürünleri kan, idrar veya sinoviyal sıvıdaki konsantrasyonlarına göre tespit edilebilir. C-terminal telopeptidi kollajen tip II (CTX-II) en net tespit edilen biyokimyasal belirteçtir. Ancak çoğu biyokimyasal belirteç klinik olarak doğrulanamamıştır ve bu konudaki çalışmalar hala devam etmektedir [43].

2.2.3 Osteoartrit Tedavi Yöntemleri

Farmakolojik olan ve olmayan tedaviler, cerrahi müdahaleler ve doku mühendisliği uygulamaları OA'da kullanılan tedavi yöntemlerindendir [2].

2.2.3.1 Farmakolojik Tedaviler

İlaç kullanımını içeren tedavileri kapsar. Asetaminofenin gibi hafif şiddette OA'da etkili ilaçlar kullanılabildiği gibi orta şiddetli belirtiler için ibuprofen, naproksen, diklofenak ve celebrex gibi non-steroid antienflamatuar ilaçlar (NSAID) da kullanılabilmektedir. Ancak bu ilaçların mide, böbrek ve kalp sağlığı üzerine olan olumsuz etkileri OA'da

farmakolojik tedaviler için sınırlandırmalar oluşturmaktadır [3].

2.2.3.2 Farmakolojik Olmayan Tedaviler

Farmakolojik olmayan tedaviler, terapötik egzersizler gibi kas gücüne, fiziksel dayanıma ve genel vücut sağlığına katkısı olan fiziksel aktiviteleri kapsar. Egzersiz yapan OA hastalarının, yapmayanlara göre daha az ağrı çektiği ve daha fazla fiziksel iyileşme gösterdiği belirtilmiştir [4]. Ancak terapötik egzersizlerin kısa vadede sonuç sağlaması OA tedavisi için sınırlayıcı etmendir.

2.2.3.3 Cerrahi Tedaviler

Farmakolojik olan ve olmayan tedavilere yanıt vermeyen hastalar için kullanılan bu tedavi çeşidinde total eklem raplasmanı, kondroplasti, mikro kırık tedavi ve spongializasyon gibi yöntemler uygulanır. Ancak bu yöntemlerde ise maliyetin yüksek olması sınırlayıcı etmendir [5, 6]. Yukarıda bahsi geçen tedavi yöntemlerinin sınırlamalarından ötürü biyomalzeme ve doku mühendisliği yaklaşımlarıyla oluşturulan doku iskeleleri OA tedavisinde gelecek vaad etmektedir.

2.3 Doku Mühendisliği ve Doku İskeleleri

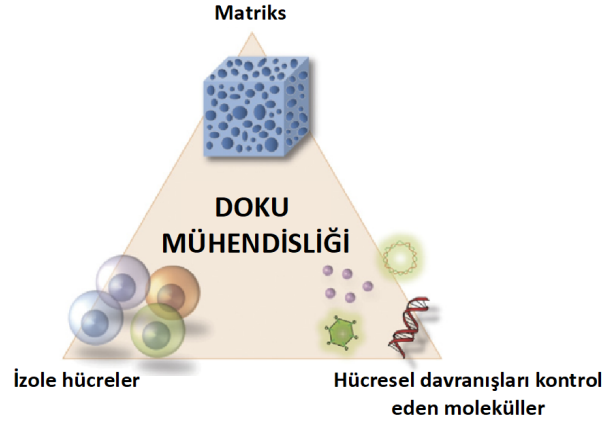
Doku mühendisliği kaybedilmiş veya hasarlı dokuların işlevlerini yerine getirebilen, sürdürebilen ve yeniden yapılandırmayı hedefleyen multidisipliner bir uygulama alanıdır. İlk kez 1993 yılında Langer ve Vacanti tarafından yayınlanan makale ile adını dünyaya duyurmuştur [7]. Bu makaleye göre bir yapı iskelesi üretilirken dikkat edilmesi gereken hususlar şu şekildedir;

o Hedef tedaviye yönelik kullanıma elverişli ve 3 boyutlu kültür ortamını sağlayabilen biyomalzemelerden oluşan yapı iskeleleri (matriks) üretilir,

o Hasar gören veya yeri doldurulmak istenen dokunun fonksiyonlarını yeniden yerine getirebilmesi için bu yapı iskelesine, izole edilmiş kök hücreler eklenir,

o Hücresel destek sağlanan yapı iskelesine büyüme faktörleri gibi hayati önem taşıyan biyosinyal moleküllerinin eklenerek hedef bölgenin doku iskelesi ortamındaki hücresel davranışları kontrol edilmiş olur [7].

Doku mühendisliği yaklaşımlarının genel şeması Şekil 2.5’de verildi.



Şekil 2.5 Doku mühendisliği yaklaşımlarının genel şeması [44]

OA tedavisinde kullanılan doku mühendisliği yaklaşımlarında kırıkdağın iyileşmesi ve yeniden modellenmesi; ECM'de bulunan bileşenlerin (kollajen, glikoprotein, proteoglikan, biyosinyal molekülleri vb.) birlikte salgıladıkları hücresel büyüme, çoğalma ve farklılaşmada uyarıcı etki yaratan sinyallerin taklit edilebilmesine bağlıdır.

Bu amaç doğrultusunda ECM'de salgılanan ve kırıkdağın iyileşmesinde gerekli olan biyosinyal molekülleri ve görevleri Tablo 2.1'de verildi.

Tablo 2.1 Kıkırdak iyileşmesinde gerekli olan biyosinyal moleküller ve görevleri [8]

Uyarıcı Faktörler	Görevi
Dönüştürücü büyüme faktörü beta (Transforming growth factor beta) TGF- β	Kıkırdak onarımında önemli rol oynar, Kıkırdak ECM sentezini ve kondrojenezi artırır.
Fibroblast büyüme faktörü (Fibroblast growth factor, FGF-2)	Yara iyileşmesinde rol oynar, Hücre çoğalmasını dolayısıyla ECM sentezinin artmasını sağlar.
Kemik morfojenetik proteinleri (Bone morphogenetic proteins, BMPs)	Kondrojenez ve osteogenezi sağlar, Kondrositlerin farklılaşma durumlarını ve ECM bileşenlerini düzenler.
İnsülin benzeri büyüme faktörü 1 (Insulin-like growth factor 1, IGF-1)	Proteoglikan ve tip II kollajen sentezini artırır.
İnsülin	IGF-1'e bağlanarak kıkırdak onarımı için önemli yanıtlar oluşturur.
Hyaluronik asit (Hyaluronic acid, HA)	Hücre çoğalmasını sağlar, ECM ve gerekli matriks proteinlerinin sentezini sağlar, Kıkırdak oluşumunu hızlandırır.
Kondroitin sülfat (Chondroitin sulfate, CS)	Hücre büyümesini ve doku oluşumunu destekler.

Doku mühendisliğinin bir ürünü olan doku iskeleleri, dokuya mekanik destek sağlamasının yanında hücreyel sağ kalımın, çoğalmanın ve farklılaşmanın gerçekleşebildiği sentetik esaslı polimer veya doğal esaslı polimer yapısında olabilen 3 boyutlu matrikslerdir ve;

- o Hücreyel yapışma ve göçü kolaylaştıran aynı zamanda anjiyogenez ve metabolik değişim için gerekli gözenekli yapıya sahip olmalıdırlar,
- o Şekil ve mekanik olarak stabil kalmalıdırlar,
- o Biyoyumlu ve biyobozunur olmalıdırlar,
- o Düşük immunojeniteye sahip olmalıdırlar,
- o Hücre fenotipini etkileyen, hücreyel büyümeyi ve iyileşmeyi sağlayan destek yapılarını içermelidirler [45].

2.3.1 Sentetik Polimer Esaslı Doku İskeleleri

Sentetik polimer esaslı doku iskelelerine polilaktik asit (PLA), poliglolikolik asit (PGA), politetrafloroetilen (PTFE) örnek verilebilir [44].

Tekrarlanabilir ve esnek yapıları sayesinde mekanik olarak kolayca işlenebilir ve şekil alabilirler. Ancak hücresel yapışmanın ve çoğalmanın zayıf olması, buna bağlı olarak ECM'nin yetersiz sentezlenmesi, tromboz oluşumuna neden olması ve gözenekliliğin yetersiz olması gibi sınırlamaları vardır [46].

2.3.2 Doğal Polimer Esaslı Doku İskeleleri

Doğal polimer esaslı doku iskeleleri, insan veya hayvansal kaynaklardan türetilmiş ECM ve doku bileşenlerinden oluşan yapılardır. Doğal ECM ve doku elemanlarının hücresel büyüme ve iyileşme için salgıladığı biyosinyalleri modifiye ederek taklit etmek için kullanılırlar [44].

Kollajen, hidroksiapatit, fibrin, CS ve Ch gibi doğal polimerler doku iskelelerinde sıklıkla kullanılan yapılardır. Doğal polimer esaslı doku iskelelerinin tercih edilmelerindeki en büyük etmen biyobozunur ve biyouyumlu olmalarıdır. Ancak tek başlarına herhangi bir yapı iskelesi bileşeni olarak kullanıldıklarında zayıf mekanik özellikler gösterirler [46].

Doku iskeleleri oluşturulurken hücresel büyüme, çoğalma ve farklılaşmada uyarıcı etki yaratan biyosinyal moleküllerinin kullanılması esastır. Hasar gören dokuların iyileşmesi veya bu dokulara gerekli desteğin sağlanması için gerekli olan iyileşme basamakları, birçok moleküler sinyalin kombinasyonunu içerir. Bu nedenle doku iskeleleri oluşturulurken tek bir bileşen değil, bu sinyalleri taklit eden çoklu sistemler kullanılmasına dikkat edilmelidir [47].

Hücre sağ kalımı ve dokunun devamlılığının sağlanmasında en önemli biyosinyal, ECM'nin kendisidir. Bu nedenle, doku iskelelerinde ECM'nin doğal bileşenlerinin kullanılması ya da sentetik bileşenlerden de benzer etkilerin alınması arzu edilir. Bu tez çalışmasında üretilen doku iskelesinde, doğal ECM bileşenlerinden olan CS'ın yanında, ECM'de bulunmayan ama doğal bir polimer olan lineer Ch ve ChNP kullanılmıştır.

2.3.2.1 Kondroitin Sülfat (CS)

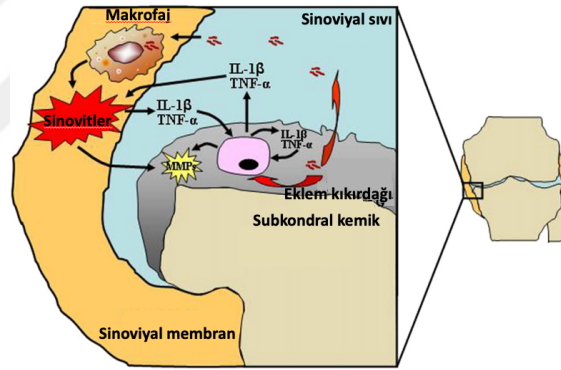
CS, 4- veya 6- pozisyonlarında sülfatlanmış ve tekrarlayan D-glukuronik asit (GlcA) ile N-asetil-D-galaktozamin (GalNac) disakkarit birimlerinden oluşan lineer bir GAG'dır.

o CS'nin eklemlerde bulunan negatif yüklü GAG sınıfından olması, dokular arasında bulunan iyonik sıvıyla etkileşerek şişme basıncı üretmesini sağlar. Böylece hem doku basınçlara karşı direnç kazanmış olur, hem de tip II kollajen ağının çekme gerilmesini azaltarak dokuya koruma sağlar [53].

o Yara iyileşmesi sürecinde meydana gelen hücresel yapışma, çoğalma, göç ve migrasyon gibi OA'da önem arz eden basamakların gerçekleşmesini sağlayarak kırık dokunun iyileşip yapısal bütünlüğünün korunmasında rol oynar [54, 55].

o OA'daki doku hasarı ve ECM kaybı sonucu ortaya çıkan NF- κ B molekülü; IL-1 β , IL-6, TNF α gibi proenflamatuar ve antienflamatuar sitokinler ile NOS-2, COX-2, MMP'ler gibi enzimlerin anormal artışına neden olarak enflamatuar süreci dolayısıyla da OA'yı tetiklediği bilinmektedir. CS'nin kondrositlerde ve sinoviyal membranda enflamasyona neden olan bu NF- κ B molekülünün aktivasyonunu engelleyici özelliği vardır [56].

Enflamasyon sonucu meydana gelen kırık dokunun kaybı ve ilgili moleküllerin gösterimi Şekil 2.8'de verildi.



Şekil 2.8 Enflamasyon sonucu oluşan kırık dokunun kaybı ve ilgili moleküllerin gösterimi [57]

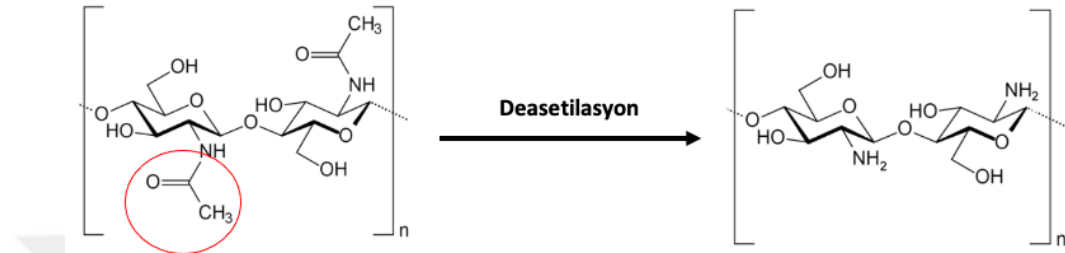
Özetle OA; hücresel, moleküler ve matriks düzeyde meydana gelen, enflamasyon veya oksidatif stres gibi durumlarda aktive edilen yıkıcı moleküllerin neden olduğu anormal doku kaybını ifade eden bir hastalıktır. CS'nin, yukarıda bahsedilen doku onarımı ve antienflamatuar özelliğine OA tedavisinde ihtiyaç duyulmaktadır.

Ancak tek başına kullanımda yeterli biyosinyal etki yaratmayacağı ve mekanik özelliklerinin düşük olacağının düşünülmesi nedeniyle doku iskelesi üretilirken CS'nin tek başına değil kombine halde ve alternatif polimerler ile kullanımı uygun görülmüştür [9, 10].

2.3.2.2 Kitosan (Ch)

Kitin molekülünün deasetilasyonu ile elde edilen Ch, 1959 yılında Rouget tarafından keşfedilmiştir [58]. Eklem bacaklılar, böcekler, yumuşakçalar ile mantar ve bitki patojenlerinin hücre duvarlarında bulunan doğal bir polisakkarittir [59].

Kitinin deasetilasyonu sonucu elde edilen Ch'nin molekül yapısı Şekil 2.9'da verilmiştir.



Şekil 2.9 Kitinin deasetilasyonu sonucu elde edilen Ch [60]

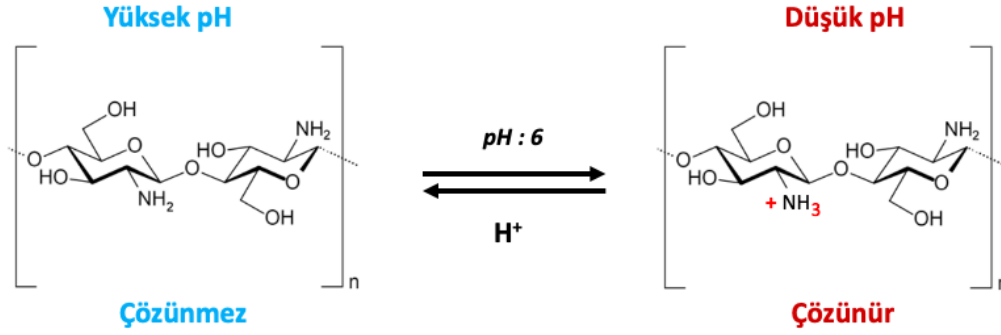
Ch, kitinin deasetilasyonu sonucu elde edildiği için farklı oran ve sayıda D-glukozamin ve GalNac moleküllerinin $\beta(1,4)$ bağı ile bağlanması sonucu oluşan düz zincirli lineer bir kopolimerdir [60].

Ch'nin içerdiği fonksiyonelleştirilebilen $-NH_2$ grupları ve aşağıda belirtilen avantajları, OA tedavisi için üretilen doku iskelesi uygulamalarında tercih edilmesini sağlamıştır;

- o Kaynağı bol ve ucuzdur,
- o Biyouyumlu, biyobozunur ve toksik olmayan polimerdir,
- o Antimikrobiyal aktivite gösterir;

Ch birincil amino gruplarından ötürü 6,3'lük bir pKa değerine sahip zayıf bazdır ve pH 6'nın altındaki seyreltik asitlerde kolaylıkla çözünebilir ancak suda çözünmez. Deasetilasyon ile elde edilen Ch'nin, düşük pH değerlerinde aminleri protonlanır ve pozitif yüklü hale geçer böylece suda çözünür katyonik polielektrolite dönüşmüş olur. pH 6'nın üzerine çıkıldıkça amin grupları deprotonlanır ve polimer yükünü kaybederek çözünmez hale gelir [11].

Ch'nin pH'a bağlı yük değişimi ve çözünürlük durumu Şekil 2.10'da verildi.



Şekil 2.10 Ch'nin pH'a bağlı yük değişimi ve çözünürlük durumu [11]

Ch'nin bu katyonik olabilen karakteri farklı mikroorganizmalara karşı asidik ortamda (hidroklorik asit, glutamik asit, laktik asit ve asetik asit gibi) antimikrobiyal etki göstermesini sağlamıştır [12].

o Ch, başta GAG'lar olmak üzere pretoglikanlar ve negatif yüklü diğer ECM molekülleriyle elektrostatik etkileşim kurar. Çok sayıda sitokin ve GF de GAG ile kompleks oluşturur. Doku iskelesi oluşturulurken faydalanan Ch-GAG etkileşimi, büyüme faktörüyle çevrelenmiş hücrelerin sayısının artmasında dolayısıyla doku onarımının artmasında önemlidir. Ayrıca canlı organizmada minimum düzeyde yabancı madde şeklinde algılanması ve hücre büyümesi için uygun gözenekli yapıya sahip olması nedeniyle doku iskelesi çalışmalarında tercih edilmektedir [61].

o İlaç molekülleri gibi etken maddelerle özel bağlanma bölgeleri oluşturup, farklı formlarda ilaç taşıyıcı olarak biyomedikal ve farmasötik alanlarında kullanılır;

Ch, polimerik nanopartikül formunda kontrollü salım sistemlerinde ilaç taşıyıcı olarak kullanılabilir. Bu nanopartiküler ilaç taşıma sistemlerinin biyolojik sıvılarda kararsız olan ve mukozal bariyerde dağılamayan ilaçları etkili şekilde taşıdığı bilinmektedir. Ayrıca bu sistemlerin biyoyararlanımının yüksek olması, hedeflenebilirlik ve biyolojik yapışmanın iyileştirilmiş nitelikte olması kontrollü salım sistemlerinde kullanılmasına olanak sağlamıştır [13].

Doku iskelesi çalışmalarında kullanılan lineer formdaki Ch'nin de mekanik dayanıklılık ve stabilite ile ilgili problemlerin oluşacağı düşüncesi ve nanopartiküler ilaç taşıyıcı sistemlerin avantajlarından faydalanılmak istenmesi bu tez çalışmasında Ch'nin yalnızca lineer olarak değil etken madde yüklü nanopartiküler taşıyıcı olarak da tercih edilmesini sağladı.

Bu nanopartiküler sisteme OA tedavisi için etken madde yüklenmesi ile; etken maddenin stabilitesini ve çözünürlüğünü artırma, fiziksel ve kimyasal olarak ECM'de

eşit şekilde dağılma ve mekanik olarak iyileştirilmiş özelliklerinden faydalanılması istendi. [62].

2.4 Nanomateriyaller

Nanoteknoloji, Ulusal Nanoteknoloji Girişimi'nin tanımlamasına göre 1-100 nanometre (nm) arasında boyutlara sahip maddelerin anlaşılmasına ve kontrolüne olanak sağlayan uygulamaların geneline verilen isimdir [63].

Modern nanoteknoloji kavramı ilk kez 1959 yılında Amerikan Fizik Derneği toplantısında Richard Feynman tarafından maddelerin atomik düzeyde kontrol edilebileceği hipoteziyle dile getirilmiştir. Feynman'ın konuşmasından 15 yıl sonra, nanoteknoloji kavramı Japon bilim insanı Norio Taniguchi tarafından yarı iletken prosesini tanımlamada kullanılmıştır. Nanoteknolojinin asıl yükselişi ise 1980'lerde Kroto, Smalley ve Curl'in fullerenleri keşfetmesiyle başlamıştır [64].

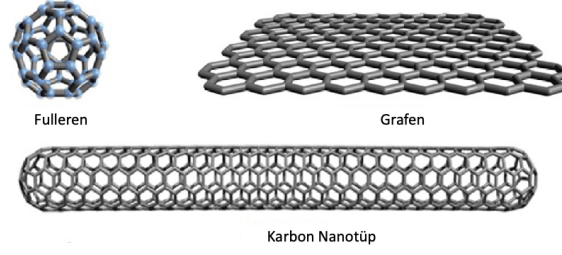
Terim olarak boyutları 1-100 nm arasında olan nanoteknoloji temelli malzemeler olarak tanımlanan nanomateriyaller, üstün malzeme özellikleri ve performansları sayesinde son yıllarda bilimsel çalışmalardan ticari faaliyetlere kadar geniş kullanım alanlarına sahiptirler [65].

Nanomateriyaller genel olarak bileşim/yapı veya boyut özelliklerine göre iki sınıfta toplanabilirler. Bileşim özelliklerine göre karbon allotropları, boyut özelliklerine göre ise nanopartiküller karşımıza çıkmaktadır [63].

2.4.1 Karbon Allotropları

Karbon allotroplarına fullerenler, karbon nanotüpler ve grafen örnek verilebilir. C-60 olarak da bilinen fullerenler küresel yapıda ve sp^2 hibridizasyonu ile bir arada tutulan çok sayıda karbondan oluşurlar. Ağırlıklı olarak güneş pilleri üretiminde kullanılırlar. Karbon nanotüpler; grafenin yuvarlatılarak petek kafesi motifli bir yapı halini aldığı şeklidir. Kullanılan grafen tabaka sayısına göre tek katmanlı veya çok katmanlı olabilir. Yarı iletken malzeme üretiminde kullanılmaktadır. Grafen; altıgen şekilli ağ örgüsü ile peteği andıran sp^2 hibritli bir karbon allotroptur. Son dönemlerde ısı değiştiricilerindeki kullanımı öne çıkmaktadır [66, 67].

Fulleren, grafen ve karbon nanotüplerin şematik gösterimi Şekil 2.11'de verildi.



Şekil 2.11 Fulleren, grafen ve karbon nanotüplerin şematik gösterimi [67]

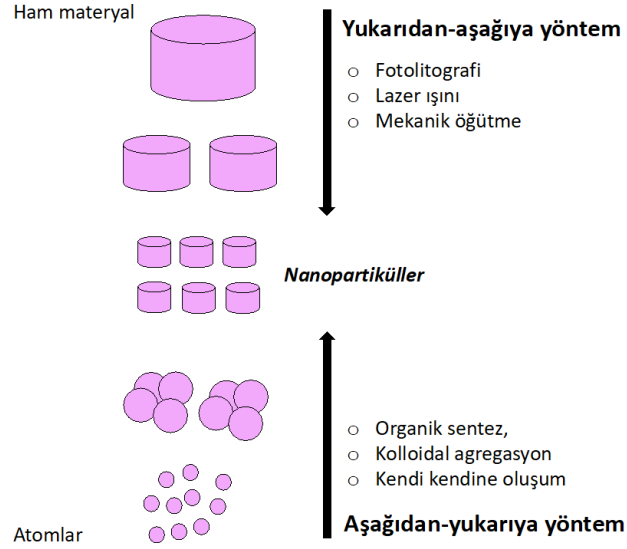
2.4.2 Nanopartiküller

Nanomateriyallerde en yaygın kullanıma sahip olan nanopartiküller, boyutları 1-100 nm arasında değişen parçacıklardır. Nanopartiküller materyallerin erime noktasına, elektriksel ve termal iletkenliğine, katalitik aktivitelerine, ışık emilimlerine ve saçılmalarına üstün özellikler kazandırması nedeniyle birçok araştırmaya katkı sağlamıştır [68].

2.4.2.1 Nanopartikül Üretim Yöntemleri

Nanopartiküller aşağıdan-yukarıya yöntem ve yukarıdan-aşağıya yöntem olarak 2 şekilde üretilir. Yaş kimya metotlarından olan organik sentez, kolloidal agregasyon ve kendi kendine oluşum metotları kullanılarak moleküler boyutta yapılardan daha büyük ve karmaşık yapıların elde edildiği yöntem aşağıdan-yukarıya yöntemi adı verilir. Fotolitografi, lazer ışını ve mekanik öğütme gibi metotlar kullanılarak ham ve büyük yapıları bir materyalden atomik düzeyde yapıların izole edilmesine dayanan yöntem ise yukarıdan-aşağıya yöntemi adı verilir [68].

Aşağıdan-yukarıya ve yukarıdan-aşağıya yöntemlerinin şematik gösterimi Şekil 2.12'de verildi.

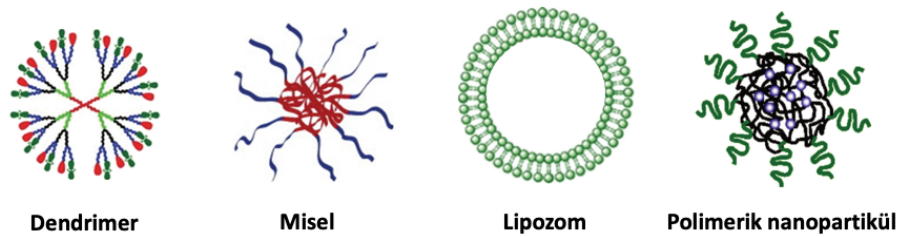


Şekil 2.12 Aşağıdan-yukarıya ve yukarıdan-aşağıya yöntemlerinin şematik gösterimi

2.4.2.2 Nanopartiküllerin Sınıflandırılması

Bileşimlerine göre inorganik esaslı ve organik esaslı olarak 2 grupta toplanabilir. İnorganik esaslı nanopartiküller altın ve gümüş gibi metallerden veya titanyum dioksit ve çinko oksit gibi metal oksitlerden sentezlenir. Organik esaslı nanopartiküller çoğunlukla organik maddelerden türetilen ve kovalent olmayan zayıf etkileşimleri içeren yapılardır. Dendrimerler, miseller, lipozomlar ve polimerik nanopartiküller örnektir [69].

Dendrimer, misel, lipozom ve polimerik nanopartikül yapıları Şekil 2.13’de verildi.



Şekil 2.13 Dendrimer, misel, lipozom ve polimerik nanopartikül yapıları [70]

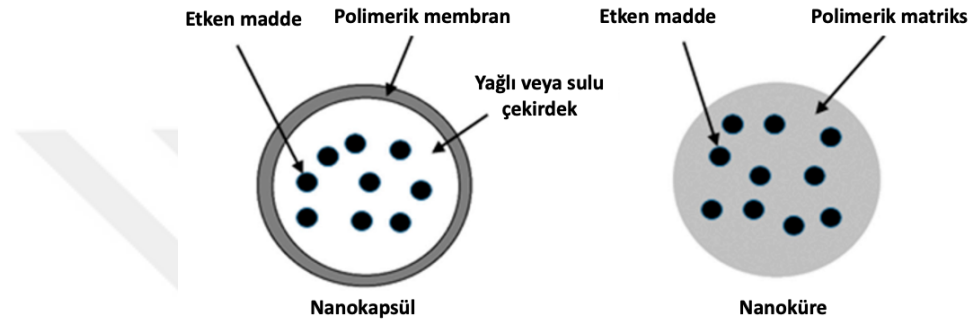
2.5 Polimerik Nanopartiküller

Polimerik nanopartiküller, boyutları 10-1000 nm arasında değişen kolloidal malzemelerdir. Biyouyumlu, biyobozunur, immunojenik ve toksik olmamaları gibi avantajları sayesinde başta ilaç taşıyıcı sistemler olmak üzere doku mühendisliği

uygulamaları gibi biyolojik sistemlerle direkt temas halinde olan uygulamalarda rahatlıkla kullanılmasını sağlamıştır [71].

Polimerik nanopartiküller veziküler sistem ya da matriks sistem denilen 2 formdan meydana gelebilir. Veziküler sistem nanokapsül formunda olan, etken maddenin yağlı veya sulu bir çekirdek yapı içerisinde depolandığı ve polimerik membranla çevrili sistemdir. Matriks sistem ise nanoküre formunda olan, etken maddenin polimer matriksinde eşit olarak dağıldığı sistemdir [72].

Nanokapsül ve nanoküre formlarının şematik gösterimi Şekil 2.14'te verildi.



Şekil 2.14 Nanokapsül ve nanoküre formlarının şematik gösterimi [72]

2.5.1 Polimerik Nanopartikül Çeşitleri

Bu tez çalışmasında olduğu gibi ilaç taşıyıcı sistemlerde kullanılan polimerik nanopartiküller, sentetik esaslı veya doğal esaslı polimerler kullanılarak üretilmektedir.

İlaç taşıyıcı sistemlerde kullanılan polimerik yapılar Tablo 2.2'de verildi.

Tablo 2.2 İlaç taşıyıcı sistemlerde kullanılan polimerik yapılar [73]

Materyal	Tam İsmi	Kısaltılmış İsmi
Sentetik homopolimerler	Poli(laktik) Poli(laktik-ko-glikolik) Poli(epsilon-kaprolakton) Poli(izobütilsiyanoakrilat) Poli(izohegzilsiyanoakrilat) Poli(n-bütilsiyanoakrilat) Poli(akrilat) Poli(metakrilat)	PLA PLGA PCL PICBA PIHCA PBCA Eudragit Eudragit
Kopolimerler	Poli(laktik)-poli(etilen glikol) Poli(laktik-ko-glikolik)-poli(etilen glikol) Poli(epsilon-kaprolakton)-poli(etilen glikol) Poli(hegzadesilsiyanoakrilat-ko-poli(etilen glikol) siyanoakrilat)	PLA-PEG PLGA-PEG PCL-PEG Poli(HDCA-PEGCA)
Kolloidal stabilizanlar	Dekstran Pluronik F68 Poli(vinil alkol) Kopolimerler Tween® 20 veya Tween® 80	
Doğal polimerler	Aljinat Jelatin Albumin Kitosan	

2.6 Kitosan Nanopartiküller (ChNP)

Ch-jel nanokapsülleri ilk kez Ohyo ve arkadaşları tarafından anti kanser ilaç olarak kullanılan 5-floroaçil'i taşımak amacıyla sentezlenmiştir [74].

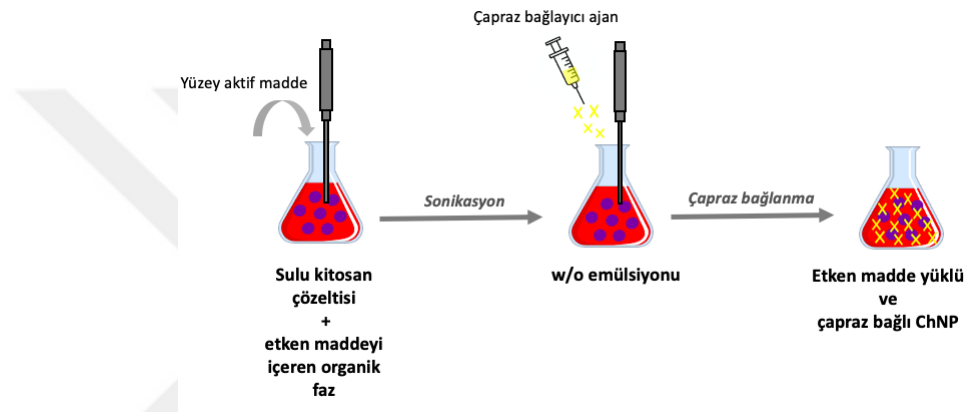
Bu çalışmanın ardından bilim dünyasında Ch temelli nanopartiküllerin ilaç taşıyıcı özellikleri kapsamlı şekilde araştırılmış ve farklı bileşenlerle beraber farklı yöntemler kullanılarak ChNP sentezlenmiştir [75].

2.6.1 ChNP Sentez Yöntemleri

2.6.1.1 Emülsiyon Çapraz Bağlama Yöntemi

Bu yöntem, sulu Ch çözeltisinin etken madde içeren bir yağ (organik) fazında emülsifiye edilerek su fazı/organik faz (w/o) emülsiyonu hazırlanmasına dayanır. İlk olarak etken madde içeren sulu Ch çözeltisine, oluşan polisakkarit damlacıklarını stabilize etmek adına yüzey aktif madde eklenir. Elde edilen w/o emülsiyonuna, sonikasyon ile Ch'nin reaktif $-NH_2$ gruplarıyla reaksiyona girecek gluteraldehit gibi bir çapraz bağlayıcı ajan eklenerek ChNP elde edilir [76].

Emülsiyon çapraz bağlama yönteminin şematik gösterimi Şekil 2.15'te verildi.



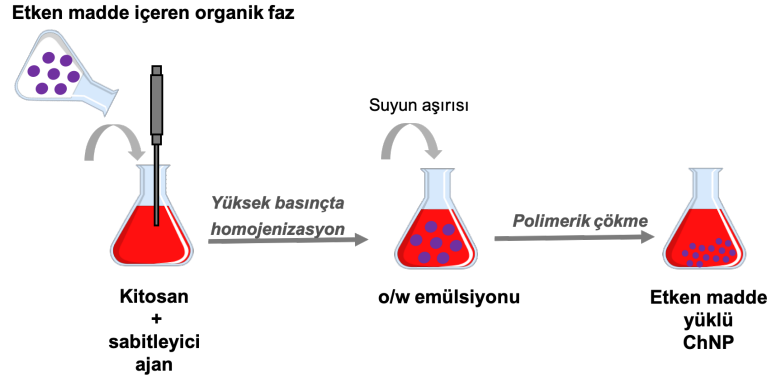
Şekil 2.15 Emülsiyon çapraz bağlama yönteminin şematik gösterimi

Bu yöntemde partikül büyüklüğü, çapraz bağlayıcı miktarına ve karıştırma hızına bağlıdır. Ancak bu yöntemin organik çözücü ve toksik çapraz bağlayıcı ajan kullanılması gibi dezavantajları vardır. Bu bileşenler proteinler ve hücre canlılığına olumsuz etki ettiği gibi reaksiyona girmemiş çapraz bağlayıcının uzaklaştırılması da zordur [76].

2.6.1.2 Emülsiyon Çözücü Difüzyon Yöntemi

Bu yöntem organik bir çözücünün su ile kısmi olarak karışması esasına dayanır. Etken maddeyi içeren organik faz, Ch çözeltisi ve sabitleyici ajan içeren sulu faza yüksek basınçta homojenizasyon altında eklenerek organik faz/su fazı (o/w) emülsiyonu elde edilir. Oluşan bu emülsiyona fazla miktarda su eklenerek organik fazın su fazına daha fazla difüze olması sağlanır. Böylece Ch'nin çözünürlüğü azalır ve polimerik çökelti şeklinde nanopartiküller elde edilir [77].

Emülsiyon çözücü difüzyon yönteminin şematik gösterimi Şekil 2.16'da verildi.



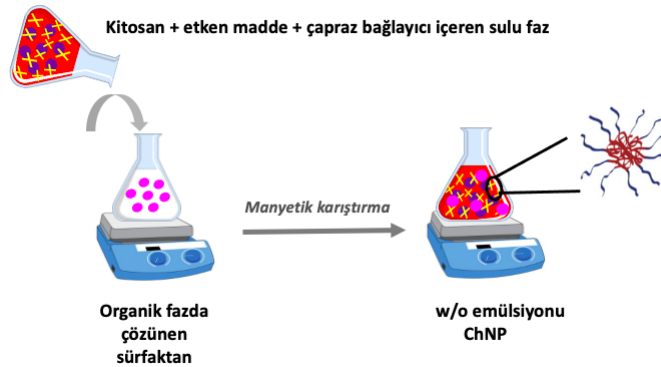
Şekil 2.16 Emülsiyon çözücü difüzyon yönteminin şematik gösterimi

Organik fazın difüzyon hızı ve süresi ile homojenizasyon süresi nanopartikül boyutunu etkileyen parametrelerdir. Organik çözücü kullanımı ve yüksek basınçta homojenizasyon gibi ağır fiziksel koşulların kullanılması bu yöntemin dezavantajlarındandır [77].

2.6.1.3 Ters Misel Oluşturma Yöntemi

Ters misel oluşturma yönteminde; organik fazda çözünen sürfaktan emülsiyonuna etken madde, Ch ve çapraz bağlayıcı içeren sulu faz manyetik karıştırma altında eklenerek su fazı/organik faz (w/o) emülsiyonu oluşturulur ve ters miseller elde edilir [78]. Bu yöntem ile diğer yöntemlere kıyasla çok daha dar ve küçük boyut dağılımına sahip nanopartiküller üretilmektedir. Ancak bu yöntemde partikül boyutunun çok küçük olması partiküllerin toplanamamasına sebep olmaktadır. Bununla birlikte fazla miktarda çözücü gereksinimi bu yöntemin dezavantajlarındandır [79].

Ters misel oluşturma yönteminin şematik gösterimi Şekil 2.17’de verildi.

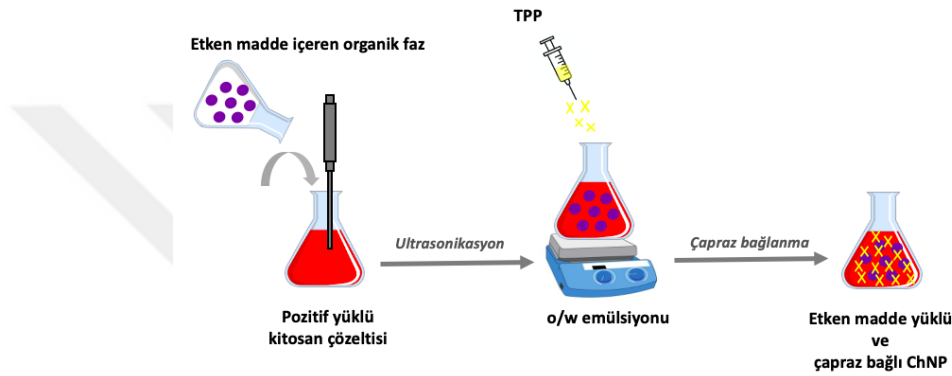


Şekil 2.17 Ters misel oluşturma yönteminin şematik gösterimi

2.6.1.4 Tekli Emülsiyon-İyonik Jelasyon İkili Yöntemi

Bu yöntemde öncelikle organik faz/su fazı (o/w) tekli emülsiyonu ardından iyonik jelasyon ile çapraz bağlama işlemi uygulanır. Etken maddeyi içeren organik faz, pozitif yüklenmiş Ch çözeltisi içeren sulu faza ultrasonikasyon altında damla damla eklenir ve o/w emülsiyonu oluşturulur. Elde edilen bu emülsiyona eklenir ve çapraz bağlı ChNP elde edilmiş olur. Reaksiyona girmeyen Ch polimerleri ve çapraz bağlayıcı anyonik grupların uzaklaştırılması için santrifüj ve yıkama işlemi yapılır [80, 81].

Tekli emülsiyon-iyonik jelasyon ikili yönteminin şematik gösterimi Şekil 2.18’de verildi.



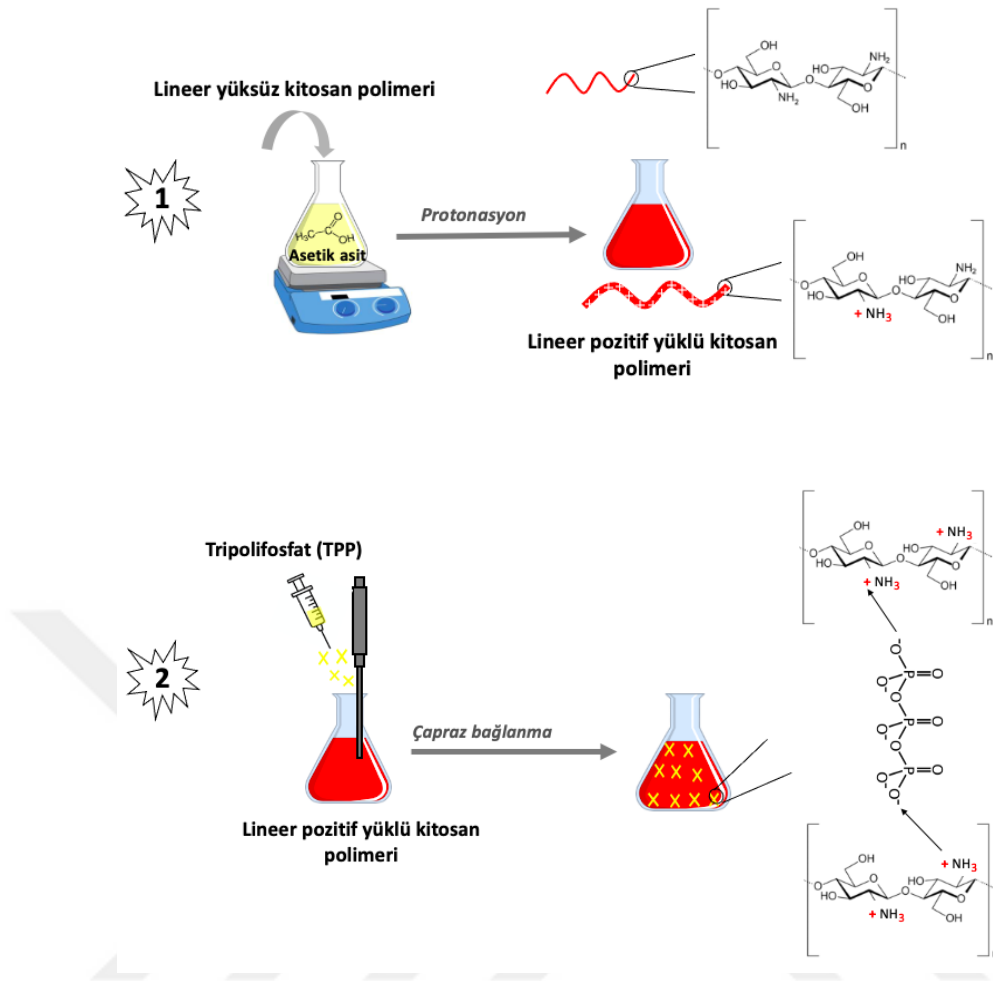
Şekil 2.18 Tekli emülsiyon-iyonik jelasyon ikili yönteminin şematik gösterimi

2.6.1.5 İyonik Jelasyon Yöntemi

İyonik jelasyon yöntemi ile ChNP üretimi ilk kez Calvo ve arkadaşları tarafından 1997 yılında gerçekleştirilmiştir [82, 83]. Bu yöntemin mekanizması, Ch’nin pozitif yüklü birincil amin grupları ile negatif yüklü bir polianyon grubun elektrostatik etkileşimine dayanır. Sodyum tripolifosfat (TPP) gibi anyonik gruplara sahip moleküller, pozitif amin gruplarıyla etkileşime girerek molekül içi veya moleküller arası çapraz bağlanmayı sağlar. Fiziksel olarak gerçekleşen bu bağlanmada, kimyasal bağlanmalarda meydana gelen olası yan etkiler ve toksisite minimize edilir [84].

Öncelikle lineer yüksüz Ch’nin; asetik asit, malik asit, tartarik asit veya sitrik asitte çözündürülerek pozitif yüklenmesi sağlanır. Pozitif yüklenen bu lineer Ch polimerine, anyonik gruplara sahip TPP gibi çapraz bağlayıcı molekül karıştırma altında damla damla eklenir ve çapraz bağlı ChNP elde edilmiş olur. Reaksiyona girmeyen Ch polimerleri ve çapraz bağlayıcı anyonik grupların uzaklaştırılması için santrifüj ve yıkama işlemi yapılır [85].

Ch ve TPP arasında gerçekleşen iyonik jelasyon reaksiyonu Şekil 2.19’da verildi.



Şekil 2.19 Ch ve TPP arasında gerçekleşen iyonik jelasyon reaksiyonu

Bu yöntemde nanopartikül boyutlarını; Ch'nin molekül ağırlığı ve konsantrasyonu, TPP konsantrasyonu, çözelti pH'ı ile karıştırma hızı ve süresi etkilemektedir [79].

2.7 Polimerik Nanopartiküllerin Biyolojik Sistemlerde Kullanılmasının Avantajları

Polimerik nanopartiküllerin bozunma ürünlerinin toksik ve immunojenik olmaması vücutta meydana gelebilecek kontrolsüz birikmenin neden olacağı risklerin en aza indirilmesinde avantaj sağlar [73].

Polimerik nanopartiküllerin nanoküre veya nanokapsül gibi hedef bölgeye uygun formda dizayn edilebilmesi, hedef hücre ve dokulara ulaşabilmek adına vücutta yer alan biyolojik bariyerlerden geçişini kolaylaştırmaktadır [86].

Polimerik nanopartiküller proteinlerin ve aşılarda sistematik dolaşımına ve bağışıklık sistemine katılmasına yardımcı olmakla beraber [87] gen terapisinde ve genlerin

taşınmada da kullanılmaktadır [88].

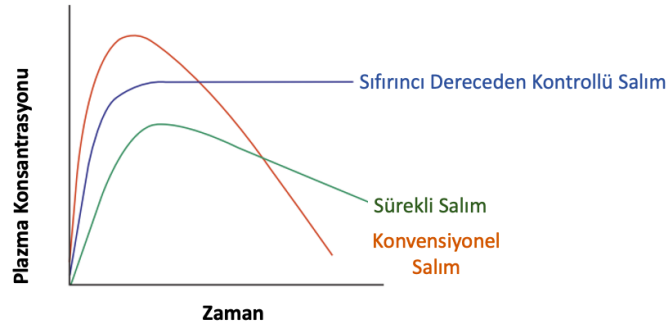
Polimerik nanopartiküller biyolojik sistemde kullanılan ilaç, protein, peptid gibi etken maddelerin enzimatik bozunmasını engeller [89].

Biyobozunur polimerik nanopartiküllere etken madde enkapsüle edilerek, bu nanopartiküllerin biyobozunur özellikleri sayesinde kontrollü/sürekli salım özelliği gösterdiği, hücreler ve dokularla biyouyumlu etkileşimler gerçekleştirdiği belirtilmiştir [90].

2.8 Kontrollü İlaç Salım Sistemleri

Kontrollü salım sistemlerinde etken madde polimerik bir malzemeye enkapsüle edilir ve bu etken maddenin salım profili, polimerin özelliklerine ve çevresiyle olan etkileşimlerine bağlıdır [91]. Kontrollü salım sistemleri, konvensiyonel salım sistemlere göre etkinliği arttırılmış düşük dozaj formları, daha az toksisite ve hastanın daha uyumlu ve rahat bir tedavi süreci geçirmesi gibi çeşitli avantajlar sunmaktadır [92].

Kontrollü salım, sürekli salım ve konvensiyonel salım profilleri Şekil 2.20’de verildi.

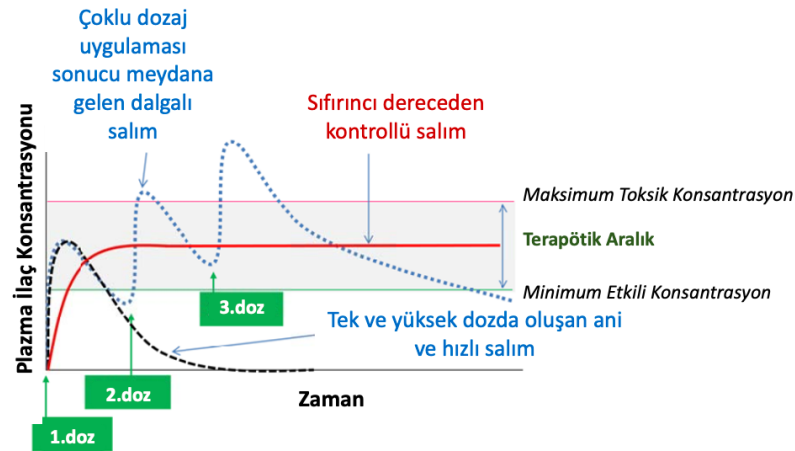


Şekil 2.20 Kontrollü salım, sürekli salım ve konvensiyonel salım profilleri [93]

Kontrollü salım sistemlerinin asıl amacı, kandaki veya hedef dokudaki ilaç konsantrasyonunu istenilen değerde tutarak salım hızı ve süresini dengede tutmayı sağlamaktır. Bu denge, plazmadaki ilacın, maksimum toksik konsantrasyon ve minimum etkili konsantrasyon arasındaki terapötik aralıkta istenen süre boyunca sabit ve sürekli olarak salınması anlamını taşır [94].

Bir ilaç tek ve yüksek dozda uygulandığında ilaç konsantrasyonu toksik olacak düzeyde maksimuma ulaştıktan sonra aniden minimuma düşer ve bu durumda tedavi için çoklu dozaj uygulanması gerekebilir. Bu amaçla sabit ilaç salım hızına sahip, sıfırıncı dereceden kontrollü salım sistemleri kullanılır [95].

Plazmadaki ilaç konsantrasyonunun doz uygulamasına göre değişimi Şekil 2.21’de verildi.



Şekil 2.21 Plazmadaki ilaç konsantrasyonunun doz uygulamasına göre değişimi [48]

Kontrollü ilaç salım sistemleri; modüle salım sistemleri, çözücü aktif sistemler, kimyasal kontrollü sistemler ve difüzyon kontrollü sistemler olarak dört grupta toplanır [96].

2.8.1 Modüle Kontrollü Sistemler

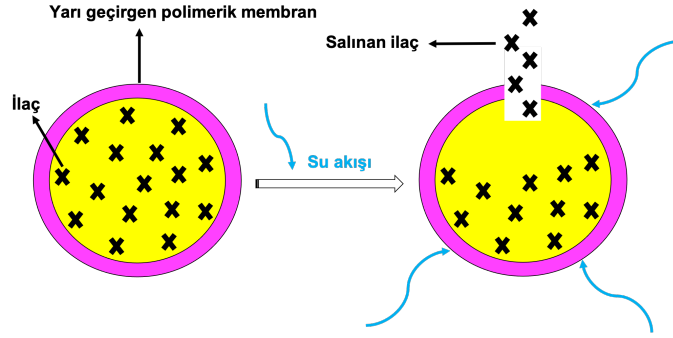
Bu salım sistemleri; pH, elektrik ve manyetik alan, ultrason, sıcaklık, ışık, mekanik güç gibi dış etmenlere bağlı olarak kontrol edilir. Bu sistemler plazma konsantrasyonunda sabit olmayan terapötiklerin salınması için uygundur. Diyabet tedavisinde bu sistemlerin faydalı olması beklenmektedir [97].

2.8.2 Çözücü Aktif Sistemler

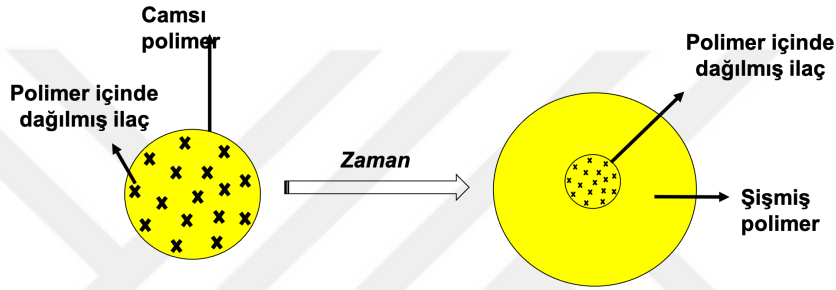
İlaç taşıyıcısına çözücü akışı sağlanarak salımın kontrol edildiği sistemlerdir. Osmotik kontrollü sistemler ve şişme kontrollü sistemler olmak üzere iki çeşittir. Osmotik kontrollü sistemlerde çözücü olarak kullanılan suyun akışını kontrol etmek için yarı geçirgen polimerik bir zar kullanılır. Su, düşük ilaç konsantrasyonuna sahip dış kısımdan, yüksek ilaç konsantrasyonuna sahip iç kısma doğru geçiş yapar. Bu sistemler zamandan bağımsız bir salım profili oluşturmayı sağlar ve suyun akış hızı ilaç salımında etkili en önemli faktördür. Şişme kontrollü sistemlerde ise temel prensip, camsı polimerlerin biyolojik sıvı gibi sulu bir çözeltiyle teması halinde suyu emip şişmeye başlamasıdır. Böylece ilaç, dış ortama difüze olur ve ilaç salım hızı polimerin şişme oranıyla kontrol edilir [98].

Osmotik kontrollü sistemlerin şematik gösterimi Şekil 2.22’de, şişme kontrollü

sistemlerin şematik gösterimi Şekil 2.23’de verildi.



Şekil 2.22 Osmotik kontrollü sistemlerin şematik gösterimi

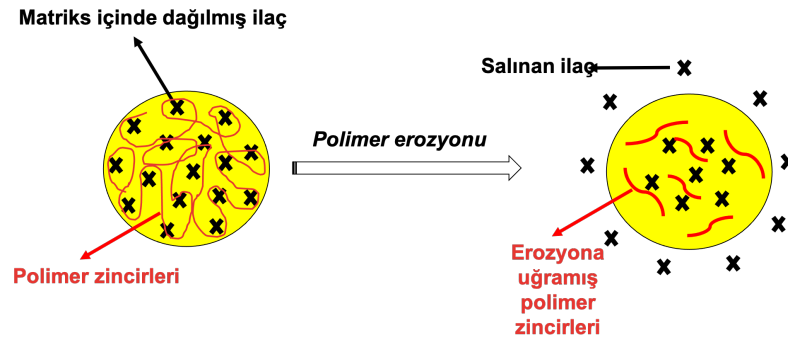


Şekil 2.23 Şişme kontrollü sistemlerin şematik gösterimi

2.8.3 Kimyasal Kontrollü Sistemler

Bu sistemler kimyasal erozyon sebepli bozunma sonucu gerçekleşen salım sistemlerini kapsar. Çapraz bağlı polimerlerin enzimatik ya da hidrolitik bozunma ile çapraz bağları kırılabilir, suda çözünmeyen polimerler hidroliz yoluyla parçalanabilir veya polimer omurgasının bölümleri rasgele kırılabilir. Böylece ilacın serbest bırakılarak salımı gerçekleştirilir [99].

Kimyasal kontrollü sistemlerin şematik gösterimi Şekil 2.24’te verildi.

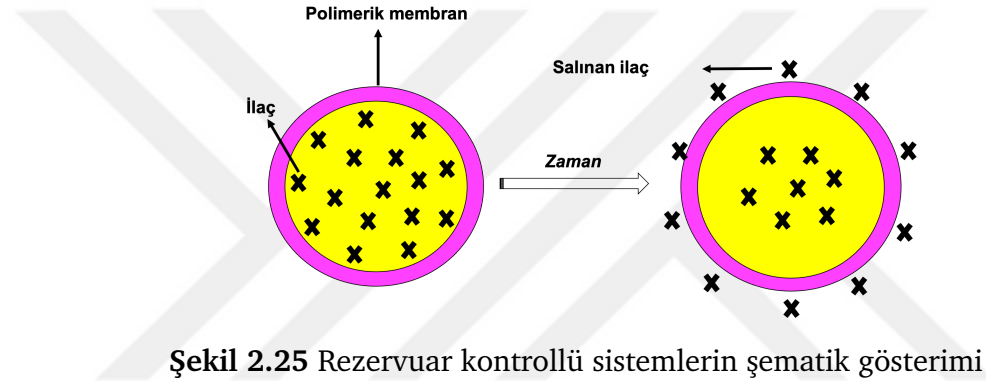


Şekil 2.24 Kimyasal kontrollü sistemlerin şematik gösterimi

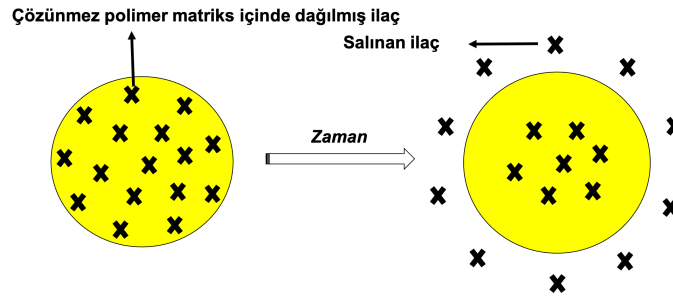
2.8.4 Difüzyon Kontrollü Sistemler

Temeli, salım ortamı ile ilacın bulunduğu ortam arasındaki konsantrasyon farkı nedeniyle oluşan difüzyon olayıdır. Rezervuar sistemleri ve matriks sistemleri olarak iki çeşittir. Rezervuar sistemlerinde ilacın bulunduğu bir çekirdek ve bu çekirdeği kaplayan polimerik bir membran söz konusudur. İlaç önce çekirdekte çözünür, ardından membranda difüze olur ve vücut ortamına salımı gerçekleşir. Bu sistemde ilaç salımını etkileyen en önemli faktör polimerik membrandır. Matriks sistemlerinde ilaç çözünmez polimer matriksi boyunca dağılır. Rezervuar sistemlerinde olduğu gibi membran kullanılmaması, difüzyon hızını kontrol edememeye neden olur [100].

Rezervuar kontrollü sistemlerin şematik gösterimi Şekil 2.25’de, matriks kontrollü sistemlerin şematik gösterimi Şekil 2.26’da verildi.



Şekil 2.25 Rezervuar kontrollü sistemlerin şematik gösterimi



Şekil 2.26 Matriks kontrollü sistemlerin şematik gösterimi

2.9 Nanopartiküler İlaç Taşıyıcı Sistemler ve Karakterizasyon

İlaç taşıyıcı sistemler, terapötik bir maddenin spesifik bir yer için taşınması ve buradaki salım karakteristiğini inceleyen bir çalışma alanıdır. Başarı oranının oldukça yüksek olduğu bilinen bu sistemler, küçük ilaç moleküllerin yanı sıra suda çözünmeyen terapötik ajanlar, nükleik asitler, peptitler ve polimerler gibi daha büyük moleküllerin taşınması için de kullanılmaktadır. Farklı türlerde taşıyıcıyı sistemler olduğu bilinmekle birlikte polimerik nanopartiküller biyouyumlu,

biyobozunur ve fonksiyonelleştirilebilir olması nedeniyle ilaç taşıyıcı sistemlerde sıklıkla kullanılmaktadır [101]. Polimerik nanopartiküllerin ayrıca vücutta uzun dolaşıma sahip olması, ilaç çözünürlüğü ile stabilitesinin yüksek olması ve yüksek oranda ilaç enkapsüle edilebilmesi gibi avantajları da ilaç taşıyıcı sistemlerde kullanılmasının nedenlerindendir [102].

Bu taşıyıcı sistemler; partikül boyutu, partikül yüzeyi, ilaç yükleme kapasitesi ve ilaç salımı özellikleriyle karakterize edilir [103].

2.9.1 Partikül Boyutu

Nanopartiküllerin boyut özellikleri, biyolojik sistemdeki hücrelerin onları nasıl algıladığını, dolayısıyla toksisite, hedefleme ve dağılım özelliklerini belirler. Nanopartikül boyutu özellikle toksisite ile ilişkili olmakla beraber büyük boyutlu parçacıkların hücre zarına zarar verdiği belirtilmiştir [104].

Lenfatik dolaşımına giren nanopartiküllerin, sistemi tetikleyerek vücuttan hızlı şekilde uzaklaştırılma ihtimalleri vardır. Literatüre göre 200 nm ve üzeri boyuta sahip nanopartiküllerin lenfatik sistemi aktive ederek vücuttan uzaklaştırıldığı ancak 100 nm civarı olan nanopartiküllerin kan-beyin bariyerini aşarak problem yaratmadığını üstelik yeterli miktarda ilaç salımı yapabileceğini belirtilmiştir. Ancak düşük boyutlu nanopartikül daha büyük yüzey alanı/hacim demek olduğundan bu durumun yaratabileceği toksisite ihtimali mutlaka değerlendirilmelidir [105].

2.9.2 Partikül Yüzey Özellikleri

Nanopartiküllerin yüzey hidrofobikliğinin fazla olması sistemden atılımının hızlanmasına neden olur. Bu nedenle nanopartiküller hidrofilik polimerlerle/bileşenlerle birlikte farklı formülasyonlarda kullanılmalıdır. Böylece nanopartiküllerin *in-vivo* dolaşımı uzatılmış olur [103].

Bir nanopartikülün yüzey özellikleri hakkında bilgi veren bir diğer özellik olan zeta potansiyel değeridir. Nanopartiküllerin (-/+) 30 mV dışındaki değerlerde stabil olduğu belirtilmiştir. Ayrıca zeta potansiyel değeri ile, etken maddenin nanopartikül yüzeyine adsorbe edilip edilemediği bilgisi de edinilebilir [88].

2.9.3 İlaç Yükleme Kapasitesi

Bir ilaç, nanopartiküler sisteme nanopartiküllerin sentezlendiği sırada ilaç entegrasyonu (içe alma yöntemi) ve nanopartikül sentezinden sonra ilaç adsorpsiyonu (adsorpsiyon yöntemi) ile iki şekilde yüklenebilir. İlaç yükleme kapasitesi,

ilacın matriks materyaldeki çözünürlüğüne, polimerin katı hal çözünürlüğü ile uç fonksiyonel gruplarına bağlıdır [103].

2.9.4 İlaç Salımı

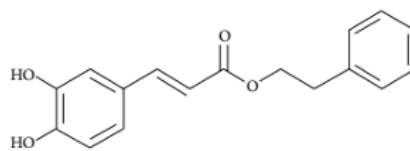
İlacın nanopartikülden serbest bırakılmasında; pH, sıcaklık, ilaç çözünürlüğü, ilacın desorpsiyon veya adsorpsiyon özellikleri, ilacın difüzyon yeteneği ile nanopartikülün şişme ve erozyon özellikleri etkilidir. Nanoküre formundaki yapılarda ilaç, homojen olarak dağıtılır ve matriks bozunmasıyla veya difüzyonuyla salım yapar. Nanokapsül formunda ise ilacın serbest bırakılması membran yüzeyi boyunca difüzyon ile kontrol edilir. Dolayısıyla ilacın polimerik membrandaki çözünürlüğü ve difüzyonu salım profilini etkiler [106].

2.10 Kafeik Asit Fenetil Ester (CAPE)

Propolis, bal arıları tarafından bitkilerden toplanan bir çeşit reçineli kovan ürünüdür ve kullanımının M.Ö 300 yılına kadar uzandığı düşünülmektedir. Hoş aromatik kokusu ve sarı-yeşil ila kahverengi arasında değişen renge sahiptir. Antikanser, antibiyotik, antifungal, antioksidan ve antienflamatuar etki gibi geniş biyolojik aktivite spektrumuna sahip olduğu için geleneksel ve modern tıpta sıklıkla kullanılmaktadır [107].

CAPE ise propoliste bulunan flavonoid benzeri biyoaktif bir bileşendir. Antikanser, antialerjik, antitümör, antiülser, antimutajenik, kalp koruyucu, immünomodülatör, antimikrobiyal, antioksidan ve antienflamatuar özellikler gibi benzersiz biyolojik ve farmakolojik etkilere sahiptir [108].

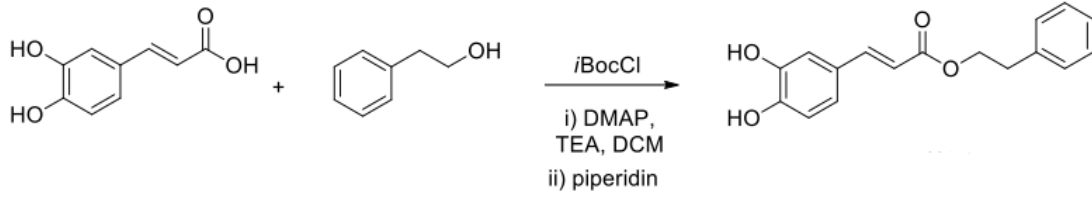
CAPE'nin moleküler yapısı Şekil 2.27'de gösterildi.



Şekil 2.27 CAPE'nin moleküler yapısı [108]

CAPE, propoliste doğal olarak bulunabildiği gibi Nakamura ve arkadaşlarının yaptığı çalışmaya göre [109] laboratuvar ortamında sentetik şekilde de sentezlenebilir.

CAPE'nin sentez reaksiyonu Şekil 2.28'de verildi.



Şekil 2.28 CAPE'nin sentez reaksiyonu [109]

CAPE'nin antioksidan özelliği, sahip olduğu -OH gruplarının, DPPH'taki serbest radikallere hidrojen kaynağı olabilmesinden gelir [14–17]. Doku yıkımına sebebiyet veren ve eklem dokusunun bozulması sonucu açığa çıkan serbest radikallerinin ortamdan uzaklaştırılması, OA tedavisinde doku yıkımını yavaşlatmak veya engellemek için önem arz etmektedir.

CAPE'nin antienflamatuar özelliği, NF- κ B'yi inhibe edebilme özelliğine dayanır. NF- κ B transkripsiyon faktörü, vücutta enflamasyona sebep olan protein yapılı bileşiktir. Bu transkripsiyon faktörü, konakçıda gerçekleşen biyokimyasal olaylara yanıt oluşturmada merkezi rol oynayıp, gen ekspresyonunun hızlı indüksiyonu ile konakçı savunmasını sağlar. NF- κ B sitokinlere ve serbest radikal oksidatif strese karşı tepki olarak aktive edilir. NF- κ B düzensizliği sonucunda toksik/septik şok, akut faz yanıtı, viral replikasyon, radyasyon hasarı, kanser ve en önemlisi akut enflamasyon oluşur [18].

CAPE gibi biyoaktif bir bileşenin birçok biyolojik aktivitede önemli bir yeri olsa da, bazı çalışmalar CAPE molekülünün biyolojik sistemde dozajdan bağımsız olarak yarılanma ömrünün düşük göstermektedir. Bu durum *in-vivo* ve *in-vitro* tekrarlanabilirlik için yüksek miktarda CAPE gerektiği anlamına gelmektedir. Ayrıca CAPE'nin sudaki çözünürlüğünün düşük olması nedeniyle biyoyararlanımı da düşüktür. Sudaki çözünürlüğü düşük etken moleküllerin çözünürlüğünü arttırmak, polimerlerle konjuge ederek veya nanopartiküllere enkapsüle edilerek mümkün olmaktadır [110].

Bu tez çalışmasında CAPE'nin nanopartiküler sisteme enkapsüle edilerek kullanılmasının nedeni; çözünürlüğünün dolayısıyla biyoyararlanımının artırılması istenmesidir. Ayrıca yüksek AA göstermesi, NF- κ B inhibe edici antienflamatuar özellikte olması ve kontrollü salım sistemlerinde kullanılabilmesi sayesinde OA gibi kronik eklem iltihabı sonucu oluşan kıkırdak kaybının engelleneceğinin düşünülmektedir.

3

DENEYSEL ÇALIŞMALAR

3.1 Kullanılan Kimyasal Maddeler

Orta molekül ağırlıklı kitosan, sodyum tripolifosfat, kafeik asit fenetil ester, disodyum hidrojen fosfat heptahidrat, sodyum dihidrojen fosfat dihidrat, sodyum klorür, sodyum azid ve 2,2-difenil-1-pikrilhidrazil, tripsin-EDTA, dimetil sülfoksit Sigma Aldrich'ten; etanol ve asetik asit Merck'ten; kondroitin sülfat ise bir ilaç firmasından; MTT tuzu Biomatik'ten; Fetal Sığır Serumı, DMEM besiyeri ve penisilin-streptomisin Capricorn'dan; L929 hücre hattı YTÜ, Biyomühendislik ABD, Hücre Kültürü ve Doku Mühendisliği Laboratuvarı'ndan temin edildi.

3.2 Kullanılan Cihazlar ve Ölçüm Yöntemleri

Hassas Terazi

Deneyisel çalışmalarda kullanılan katı ürünlerin ağırlıklarını ölçmek için Sartorius marka CP22D model hassas terazi kullanıldı.

Vorteks Cihazı

Heidolph marka Reax Control model vorteks cihazı çözeltilerin homojenizasyonu için kullanıldı.

Ultrasonik Homojenizatör

Homojenizasyon ve ultrasonikasyon için Bandelin Sonopuls marka HD2200 model ultrasonik homojenizatör kullanıldı.

pH-metre

Çözeltilerin pH ölçümleri Hanna marka pH-metre ve pH elektrodu kullanılarak yapıldı.

Isıtıcılı Manyetik Karıştırıcı

Karıştırma işlemleri için Heidolph marka ısıtıcılı manyetik karıştırıcı kullanıldı.

Santrifüj Cihazı

Santrifüj işlemleri için Nuova marka soğutmalı santrifüj kullanıldı.

Liyofilizatör

Üretilen nanopartiküllerin liyofilizasyonu için Heto marka liyofilizatör kullanıldı.

Ultraviyole Görünür (UV-Vis) Spektrofotometre Cihazı

ChNP'e yüklenen ve nanopartiküler sistemden salınan CAPE miktarının belirlenebilmesi için Shimadzu marka PharmaSpec UV-1700 model çift ışık yollu UV-Vis spektrofotometre kullanıldı. CAPE'nin absorbanı 323 nm'de okundu [111].

UV-Vis spektroskopisi, UV (ultraviyole) veya Vis (görünür) bölgelerde ışığın absorplanması prensibine dayanır ve Beer-Lambert eşitliği ile açıklanır. Bu eşitliğe göre, bir örneğin I_0 yoğunluklu monokromatik ışın örnek küvetinde bulunan moleküller tarafından absorplandığında küveti I şiddetiyle terk eder [112].

I_0 ; giren ışının şiddeti,

I ; absorplandıktan sonra çıkan ışının şiddeti,

ϵ ; molar absorpsiyon katsayısı (L/mol.cm),

b ; küvet kalınlığı (cm)

c ; konsantrasyon (mol/L),

T ; transmitans (geçirgenlik),

A ; absorbanı

$$\log(I_0/I) = \epsilon.b.c = A \quad (3.1)$$

$$T=I/I_0 \quad (3.2)$$

Eşitlikleriyle hesaplanır ve absorbanı ile derişim arasındaki ilişkiden yararlanılır [112].

Bu tez çalışmasında UV-Vis spektrofotometresi, (3.1)'den yararlanılarak konsantrasyon tayini için kullanılmıştır.

Zeta-Sizer Cihazı

Sentezlenen nanopartiküllerin boyut analizi ve yük dağılımları Malvern marka zeta-sizer cihazı kullanılarak yapıldı.

Boyut ve PDI analizleri için dinamik ışık saçılması (DLS) tekniği, zeta potansiyel değerleri ise elektroforetik ışık saçılması (ELS) tekniği ile yapılmaktadır. DLS, süspanse haldeki çözeltide bulunan, Brown hareketi yapan her bir partikülden saçılan ışıktan elde edilen verileri kapsar. Bu hareketli partiküllerin neden olduğu Doppler kayması sonucu partiküllerin zeta potansiyellerinin ölçülmesi ise ELS tekniği ile mümkün olmaktadır [113].

Cihaz; boyut değerlerinin hesaplanmasında Stokes-Einstein denkleminde (3.3), zeta potansiyel değerlerinin hesaplanmasında ise Henry denkleminde (3.4) yararlanılmaktadır: [108].

$$D = \frac{k.T}{3.\pi.\mu.R} \quad (3.3)$$

(k=Boltzman sabiti, T=Mutlak sıcaklık, μ = Çözücü viskozitesi)

$$U_E = \frac{2.\epsilon.Z.f(k.\alpha)}{3.\mu} \quad (3.4)$$

(U_E = Elektroforetik hareketlilik, ϵ = Ortam dielektrik sabiti, $f(k.\alpha)$ = Henry fonksiyonu, μ = Ortam viskozitesi)

Fourier Dönüşümlü Kızılötesi (FT-IR) Spektrofotometre Cihazı

Sentezlenen kurutulmuş nanopartiküllerin ve doku iskelelerinin karakterizasyonu için Jasco marka FT-IR cihazı kullanıldı ve 400-4000 cm^{-1} frekans aralığında ölçümler alındı.

FT-IR, kızılötesi (IR) radyasyonunun absorpsiyonu ile bir moleküldeki bağların titreşim veya dönme hareketleri sonucu elde edilen verilerin bant şeklinde ortaya çıktığı metottur. Her molekülün yaptığı titreşim ve dönme hareketleri kendine has olduğundan moleküle dair karakteristik bilgilerin edinilmesini sağlar [114].

Taramalı Elektron Mikroskobu (SEM)

Üretilen doku iskelelerinin yüzey morfolojisinin incelenmesi için FEI QUANTA 450 FEG ESEM SEM model taramalı elektron mikroskobu kullanıldı.

SEM, numunenin morfolojisini yani yapısal karakteristikliğini yüksek çözünürlüklü görüntüleme sayesinde en kompleks numunelerin bile en ince detayına kadar analiz edilmesine olanak sağlayan bir metottur [115].

3.3 Deneysel Yöntem

3.3.1 Stok Çözeltilerin Hazırlanması

Deneysel çalışmalarda Ch çözeltisine, TPP çözeltisine, PBS tampon çözeltisine, CS çözeltisine, CAPE çözeltisine ve DPPH çözeltisine ait stoklar hazırlandı.

3.3.1.1 Ch Çözeltisinin Hazırlanması

2 mg/ml'lik ve 30 mg/ml'lik Ch çözeltileri hazırlandı. 2 mg/ml'lik Ch çözeltisi nanopartikül üretiminde kullanıldı ve bunun için 60°C'deki %1'lik asetik asit içeren saf su çözeltisine Ch, yavaş yavaş karıştırma altında eklendi. Homojen bir karışım oluşuncaya dek karıştırmaya bırakıldı ve 0,45 µm'lik filtreden geçirilerek süzüldü. Doku iskelesi üretimi için 30 mg/ml'lik Ch çözeltisi kullanıldı bunun için ise 60°C'deki %1'lik asetik asit içeren saf su çözeltisine Ch, yavaş yavaş karıştırma altında eklendi. Homojen bir karışım oluşuncaya dek karıştırmaya bırakıldı.

3.3.1.2 TPP Çözeltisinin Hazırlanması

Ch:TPP kütlece oranı 3:1 olacak şekilde 2 mg/ml'lik TPP çözeltisi hazırlandı. TPP, saf suda çözülerek homojen karışım elde edilene kadar karıştırıldı ve 0,45 µm'lik filtreden geçirilerek süzüldü.

3.3.1.3 0,01 M'lık PBS Tamponu Hazırlanması

0,01 M'lık PBS tamponu hazırlandı. Bunun için 2,6807 g $Na_2HPO_4 \cdot 7H_2O$ ($M_A=268,07$ g/mol) tartılarak 1 L'lik balon joje içerisindeki 450 ml ultrasaf suda çözüldü. Aynı zamanda 1,56 g $NaH_2PO_4 \cdot 2H_2O$ ($M_A=156,01$ g/mol) tartılarak 450 ml ultrasaf suda çözüldü. Hazırlanan NaH_2PO_4 çözeltisi balon jojedeki Na_2HPO_4 çözeltisinin üzerine eklendi ve tekrar karıştırıldı. Bu karışıma son olarak 8,766 g NaCl eklendi ve tekrar karıştırıldı. Karışımın pH'ı ölçüldü ve 1 M NaOH veya 1 M HCl ile pH 7,4'e ayarlandı. Ultrasaf su eklenerek çözeltinin son hacmi 1 L'ye tamamlandı. Daha sonra çözelti 0,45 µm'lik filtreden geçirilerek süzüldü.

3.3.1.4 CS Çözeltisinin Hazırlanması

2 mg/ml'lik CS çözeltisi hazırlandı. Bu çözelti doku iskelesi üretimi için kullanıldı. CS, saf suda oda sıcaklığında homojen bir karışım elde edilene kadar karıştırıldı.

3.3.1.5 CAPE Çözeltilisinin Hazırlanması

2 mg/ml'lik CAPE çözeltisi hazırlandı. CAPE, etanol içerisinde homojen bir karışım elde edilene kadar karıştırıldı.

3.3.1.6 DPPH Çözeltilisinin Hazırlanması

100 μ M DPPH çözeltisi hazırlandı. DPPH, etanol içerisinde homojen bir karışım elde edilene kadar karıştırıldı.

3.3.2 CAPE'nin Kalibrasyon Eğrisinin Oluşturulması

Kalibrasyon eğrisi için 0.5 mg/ml'lik stok CAPE çözeltisi hazırlandı.

UV-Vis spektrofotometrede ölçüm yapıldı ve sonuçlar Tablo 3.1'de verildi.

Tablo 3.1 CAPE Konsantrasyon – absorbans verileri

Konsantrasyon (mg/ml)	A ₃₂₃
0	0
0,006	0,471
0,008	0,468
0,01	0,748
0,03	1,560

3.3.3 İyonik Jelasyon Yöntemiyle Boş ChNP'in Sentezi

Boş ChNP, literatürde tanımlanan iyonik jelasyon yöntemi ile sentezlendi [84].

Bunun için hazırlanan 2 mg/ml'lik stok Ch çözeltisinin pH'ı 4,8-5 olacak şekilde ayarlandı. Daha sonra çapraz bağlayıcı olarak kullanılan 2 mg/ml'lik stok TPP çözeltisinden buz banyosunda ultrasonikasyon cihazı altında damla damla Ch çözeltisine eklendi. Elde edilen bulanık süspansiyon 9000 rpm'de +4°C'de 30 dk boyunca 3 defa santrifüj edildi. Her santrifüj sonrası süpernatant uzaklaştırılarak ultrasaf su ile yıkama yapıldı. Santrifüj ve yıkama işlemleri sonunda çöken nanopartiküller ultrasaf su ile süspanse edilerek donduruldu ve liyofilize edildi. Liyofilize edilen nanopartiküller ileri analizlerde kullanılmak üzere -20°C'de muhafaza edildi.

3.3.4 İyonik Jelasyon Yöntemiyle CAPE Yüklü ChNP'in Sentezi

CAPE yüklü ChNP literatürde tanımlanan iyonik jelasyon yöntemi ile sentezlendi [84].

Bunun için hazırlanan 2 mg/ml'lik stok Ch çözeltisinin pH'ı 4,8-5 olacak şekilde ayarlandı. Önce 2 mg/ml'lik CAPE çözeltisinden buz banyosunda ultrasonikasyon cihazı altında damla damla Ch çözeltisine eklendi. Daha sonra çapraz bağlayıcı olarak kullanılan 2 mg/ml'lik stok TPP çözeltisi ultrasonikasyon cihazı altında damla damla Ch-CAPE çözeltisine eklendi. Elde edilen bulanık süspansiyon 9000 rpm'de +4°C'de 30 dk boyunca 3 defa santrifüj edildi. Her santrifüj sonrası süpernatant uzaklaştırılarak ultrasaf su ile yıkama yapıldı. Santrifüj ve yıkama işlemleri sonunda çöken nanopartiküller ultrasaf su ile süspanse edilerek donduruldu ve 24 saat boyunca liyofilize edildi. Liyofilize edilen nanopartiküller ileri analizlerde kullanılmak üzere -20°C'de muhafaza edildi.

3.3.5 Doku İskeleleri Üretimi

Doku iskeleleri, literatürde tanımlanan sentez yönteminden yola çıkılarak üretildi [116–118].

3.3.5.1 CAPE Yüklü ChNP Eklenmemiş Doku İskelesi Üretimi

Bunun için 30 mg/ml'lik Ch çözeltisine ile 2 mg/ml'lik CS çözeltisi oda sıcaklığında eklenerek homojen bir karışım elde edilebilmesi için 1 gün boyunca karıştırmaya bırakıldı. 1 gün sonunda elde edilen jelimsi doku iskelesi, -80°C'de donduruldu ve liyofilize edildi.

3.3.5.2 CAPE Yüklü ChNP Eklenmiş Doku İskelesi Üretimi

30 mg/ml'lik Ch çözeltisine, 2 mg/ml'lik CS çözeltisi ve CAPE yüklü ChNP içeren homojen süspansiyon eklenerek oda sıcaklığında homojen bir karışım elde edilebilmesi için 1 gün boyunca karıştırıldı. 1 gün sonunda elde edilen jelimsi doku iskelesi, -80°C'de donduruldu ve liyofilize edildi.

3.3.6 Boyut ve Zeta Potansiyel Ölçümleri

Sentezlenen tüm nanopartiküllerin boyut, PDI ve zeta potansiyel ölçümleri Zeta Sizer cihazı kullanılarak gerçekleştirildi. Boyut ve PDI ölçümü için homojenizasyon sonrası elde edilen süspansiyon cihaza özgü kuvvet içerisine konularak DLS yöntemi ile ölçüldü. Zeta potansiyel ölçümü için yine özel bir kuvvet kullanıldı ve ELS yöntemi ile ölçümler gerçekleştirildi. Ölçümler 3 tekrarlı şekilde yapıldı ve ortalamaları alındı.

3.3.7 Reaksiyon Veriminin Hesaplanması

Liyofilizatörde kurutulup dondurucuda saklanan kuru nanopartiküllerin ağırlıkları hassas terazi yardımıyla ölçüldü ve nanopartiküler sistemi oluşturan maddelerin toplam miktarı Eşitlik 3.5'te yerine konularak RV hesaplandı.

$$RV(\%) = \frac{\text{Nanopartikül ağırlığı(mg)}}{\text{Toplam Madde Miktarı(mg)}} \times 100 \quad (3.5)$$

3.3.8 Enkapsülasyon Etkinliğinin Hesaplanması

Sentezlenen tüm nanopartiküllerin santrifüj işlemi sırasında uzaklaştırılan süpernatantları toplanarak nanopartiküler sisteme yüklenmeyen serbest CAPE konsantrasyonunun tayininde kullanıldı. Süpernatanttan alınan örneklerin 323 nm'de UV-Vis spektrofotometresi kullanılarak absorbans değerleri kaydedildi. Hazırlanmış olan kalibrasyon eğrisinde, okunan absorbans değeri yerine konularak serbest CAPE miktarı tayin edildi ve Eşitlik 3.6'da yerine konularak her bir örnek için EE hesaplandı.

$$EE(\%) = \frac{\text{Toplam CAPE miktarı(mg)} - \text{Serbest CAPE miktarı (mg)}}{\text{Toplam CAPE miktarı(mg)}} \times 100 \quad (3.6)$$

3.3.9 Yükleme Kapasitesinin Hesaplanması

Liyofilizatörde kurutulup dondurucuda saklanan nanopartiküllerin ağırlıkları hassas terazi kullanılarak ölçüldü. Nanopartikül ağırlığı ve 3.2.7'de anlatıldığı gibi hesaplanan serbest CAPE miktarı Eşitlik 3.7'de yerine konularak her bir örnek için YK hesaplandı.

$$YK(\%) = \frac{\text{Toplam CAPE miktarı(mg)} - \text{Serbest CAPE miktarı (mg)}}{\text{Nanopartikül ağırlığı(mg)}} \times 100 \quad (3.7)$$

3.3.10 FT-IR Ölçümleri

Ch, boş ChNP, CAPE, CAPE yüklü ChNP, ChNP eklenmiş ve eklenmemiş doku iskelelerinin moleküler karakterizasyonu için FT-IR spektrofotometresi kullanıldı. Liyofilize kuru örneklerin FT-IR spektrumu, ATR ekipmanı kullanılarak 600-4000 cm⁻¹ frekans aralığında alındı.

3.3.11 SEM Analizi

ChNP eklenmiş ve eklenmemiş doku iskelelerinin morfolojik analizi için SEM cihazı kullanıldı. Sentezlenen doku iskelelerinden alınan örnekler numune yerine

damlatılarak kurutuldu. Doku iskelelerinin üzeri altın ile kaplanarak farklı enerji ve farklı büyütme oranlarında görüntüleme yapıldı.

3.3.12 *In-vitro* Salım Çalışmaları

Salım çalışmalarında CAPE yüklü ChNP içeren doku iskelesinin kümülatif salım davranışları incelendi. Doku iskelesi, PBS içine fizyolojik pH'ı simüle etmek için kondu ve çalkalamalı inkübatörde 37°C'de 150 rpm'de inkübe edildi. Salım ortamı belirli zaman aralıklarında belirli sürelerde analiz edildi. Ardından üst faz toplanarak, pellet yeniden süspanse edildi. Salım analizi doku iskelesinden CAPE salımı durana kadar devam ettirildi. Üst fazdaki CAPE konsantrasyonu 323 nm'de UV-Vis spektrofotometre ile tayin edildi. Salım değerleri zamana bağlı kütle hesabı eşitliği kullanılarak kümülatif olarak hesaplandı.

M_t , t zamanındaki etken madde miktarı (mg); C_t , t zamanındaki etken madde konsantrasyonu (mg/L); V , salım ortamı hacmi (L); V_s , belirli zamanlarda ölçüm için alınan salım ortamı hacmi (L) olarak ifade edilmektedir.

$$M_t = C_t \times V + \sum C_{t-1} \times V_s \quad (3.8)$$

M_t , t anındaki etken madde miktarı (mg); M_0 , başlangıçta nanopartiküllere yüklenen ilaç miktarı (mg) olarak ifade edilmektedir.

$$M = \frac{M_t}{M_0} \times 100 \quad (3.9)$$

3.3.13 Şişme Testi

Literatürde tanımlanmış yöntemle göre, üretilen doku iskelelerine şişme testi uygulandı [119–122]. Doku iskeleleri, şişme testinden önce %96'luk etanol içerisinde 1 gece bekletildi. Ertesi gün etanolden çıkarılıp kurutuldu ve kuru tartımı alındıktan sonra 37°C pH 7.4'teki PBS çözeltisine daldırıldı. Ardından iskeleler belirli zaman aralıklarıyla, çözeltiden çıkarılıp fazla sıvısı kurutma kağıdıyla alındıktan sonra ıslak kütle ölçüldü. Kuru ve ıslak kütleler karşılaştırılarak Eşitlik 3.10'da YŞ oranı hesaplandı.

W_0 , ıslak haldeki doku iskelesinin ağırlığını; W_1 kuru haldeki doku iskelesinin ağırlığını ifade etmektedir.

$$\%YŞ = \frac{W_0 - W_1}{W_1} \times 100 \quad (3.10)$$

3.3.14 Biyouyumluluk Testi

Literatürde tanımlanmış yöntemle göre üretilen doku iskelesine, MTT analizi ile biyouyumluluk testi uygulandı. MTT testi metabolik olarak aktif hücrelerin mitokondrilerinden salgılanan dehidrojenaz enzimlerinin, sarı tetrazolyum tuzunun mor formazan kristallerine indirgenmesine dayanır. Oluşan mor formazan kristalleri miktarı canlı hücre sayısı ile doğru orantılıdır [123–125].

Bu test için öncelikle CAPE yüklü ChNP eklenmiş doku iskelesi ve CAPE yüklü ChNP UV ışık ile steril edildi ve her biri DMEM-F12 besiyeri içeren falkonlara alınarak 37°C, 130 rpm'de inkübe edildi. Her bir örneğin falkonundan steril koşullarda numune alındı. Falkonlara alınan numune miktarı kadar taze besiyeri eklenerek 37°C'de 130 rpm'de tekrar inkübe edildi. Numune alma işlemi 1., 2., 3. ve 7. günlerde gerçekleştirildi. Numuneler MTT testi için +4°C'de muhafaza edildi.

Hücre Kültürü Çalışmaları: Steril bir ortam gerektiren hücre kültürü çalışmaları laminar akış kabinde gerçekleştirildi. Hücreler 37°C, %95 nem, %5 CO₂ koşullarında tutuldu. Biyouyumluluk çalışmalarında kullanılan L929 fibroblast hücreleri %10 FBS ve %1'lik penisilin-streptomisin içeren DMEM-F12 besiyeri ortamında çoğaltıldı. Hücreler flaskta %80 konfluente ulaştıktan sonra steril PBS ile yıkandı. Daha sonra bu hücreler, %0,25'lik tripsin-EDTA ile enzimatik olarak toplandı. FBS içeren besiyeri ile ortamdaki tripsin inhibe edildi. Elde edilen hücre süspansiyonu 1000 rpm, 25°C'de 5 dk boyunca santrifüjlendi. Süpernatant atılıp hücre pelleti üzerine 1 ml besiyeri eklenerek Thoma lamında hücre sayımı gerçekleştirildi.

Hücreler, CAPE yüklü ChNP içeren doku iskelesi ve CAPE yüklü ChNP'in biyouyumluluk çalışmalarında kullanılmak üzere ELISA 96 kuyulu plaklarda kuyu başına 10x100000 hücre/ml olacak şekilde hücre ekimi gerçekleştirildi. Hücrelerin ekildiği 96 kuyulu plaklar 24 saat inkübasyona bırakıldı

MTT Analizleri: Numunelerin L929 hücre canlılığına etkisi MTT ile analiz edildi. Canlı hücrelerin mitokondrisi tetrazolyum bileşenini indirgeyip formazan kristallerine dönüştürülmesini sağlamaktadır [123–125].

Hücrelerin ekildiği 96 kuyulu plaklar 24 saatlik inkübasyondan sonra kontrol grupları taze besiyeri, diğer gruplar da 1., 2., 3. ve 7. gün numuneleri ile değiştirildi. 48 saatlik inkübasyon süresinden sonra tüm kuyulara 10 µl MTT solüsyonu eklendi ve plaklar inkübasyon şartlarında (karanlık ortamda) 3 saat bekletildi. Daha sonra tüm kuyulara 100 µl DMSO eklendi ve 96 kuyulu plak karanlık ortamda 30 dk bekletildi. Plaklardaki optik yoğunluk Elisa Reader ile 570 nm'de ölçülerek hücre canlılığı analizi gerçekleştirildi. Her deney grubu için 3 tekrarlı çalışıldı ve ortalamaları

alındı. Denklem 3.11 kullanılarak hücre canlılığı hesaplandı.

A_s , örnek absorbansını; A_c kontrol absorbansını ifade etmektedir.

$$\% \text{Hücre Canlılığı} = \frac{A_s}{A_c} \times 100 \quad (3.11)$$

3.3.15 Antioksidan Aktivite Testi

AA testi; antioksidan bir molekülün DPPH'ın sahip olduğu serbest radikale hidrojen transferi yaparak absorbansta meydana gelen azalmanın hesaplanması prensibine dayanır. Bu çalışmada doku iskelelerinin AA'sı, literatürde tanımlanan DPPH serbest radikal süpürme yöntemi modifiye edilerek analiz edildi. DPPH 517 nm'de en yüksek absorbansı veren, koyu mor renkli serbest bir radikaldir. Antioksidan molekül varlığında rengi koyu mordan açık sarı renge doğru değişim gösterir [16, 126].

Etanol kullanılarak 100 μM konsantrasyonunda DPPH kontrol çözeltisi hazırlandı. CAPE yüklü ChNP eklenmiş ve eklenmemiş doku iskeleleri 1.5 ml DPPH çözeltisine eklenerek oda sıcaklığında karanlıkta 1 saat bekletildi. 1 saat sonunda UV-Vis spektrofotometre ile 517 nm'de DPPH, CAPE yüklü ChNP eklenmiş ve eklenmemiş doku iskelelerinin absorbansı ölçüldü. Eşitlik 3.12 yardımıyla yüzde AA hesaplandı.

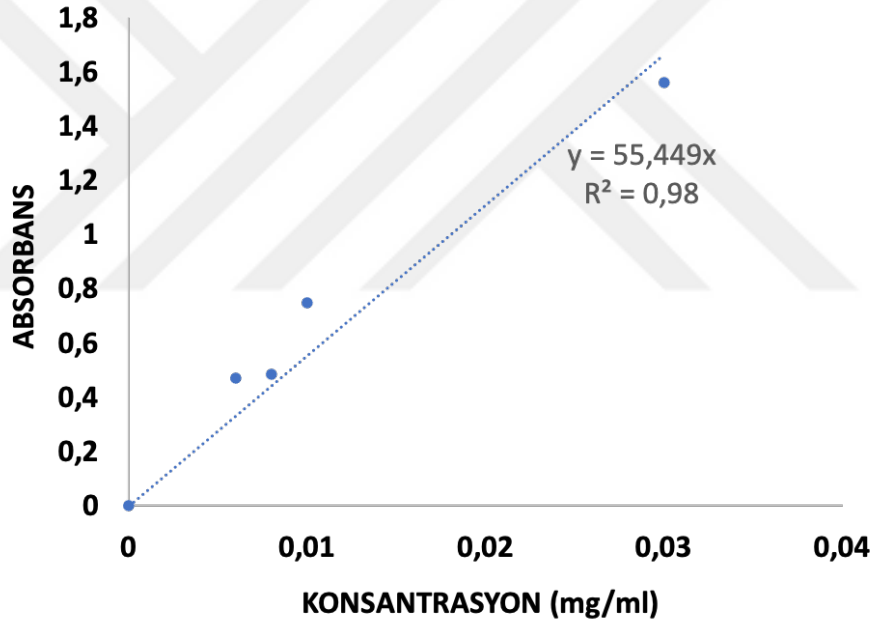
A_c , 517 nm'de ölçülen kontrol DPPH çözeltisinin absorbansını; A_s doku iskelesinin absorbansını ifade etmektedir.

$$\%AA = \frac{A_c - A_s}{A_c} \times 100 \quad (3.12)$$

4 DENEY SONUÇLARI

4.1 CAPE'nin Kalibrasyon Eğrisi

CAPE'nin 323 nm dalga boyunda UV-Vis spektrofotometre kullanılarak çizilen kalibrasyon eğrisi Şekil 4.1'de verildi.



Şekil 4.1 CAPE'nin kalibrasyon eğrisi grafiği

UV-Vis spektrofotometre kullanılarak elde edilen absorbans değerleri ile çizilen kalibrasyon eğrisinde eğim değeri 55,449 olup regresyon katsayısı 0,98'dir.

Nanopartiküler sistemin enkapsülasyon etkinliği ve yükleme kapasitesi hesaplamaları ile doku iskelesi salım çalışmalarındaki serbest CAPE miktarının tayininde bu kalibrasyon eğrisinden yararlanıldı.

4.2 İyonik Jelasyon Yöntemiyle Sentezlenen Boş ChNP'in Karakterizasyonu

4.2.1 Boş ChNP'in Boyut ve Zeta Potansiyel Analizi

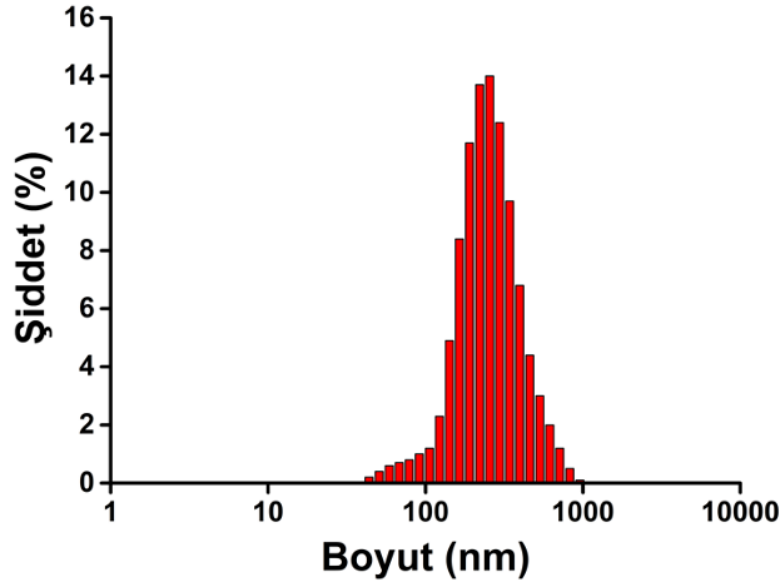
Optimum koşullarda sentezlenen boş ChNP'in oda sıcaklığında Zeta Sizer cihazı ile boyut analizleri, partikül büyüklüğü dağılımını ifade eden PDI değeri ile yüzey yükünü ifade eden zeta potansiyel değerleri tespit edildi.

Boş ChNP'in ortalama boyut, PDI ve zeta potansiyel değerleri Tablo 4.1'de verildi.

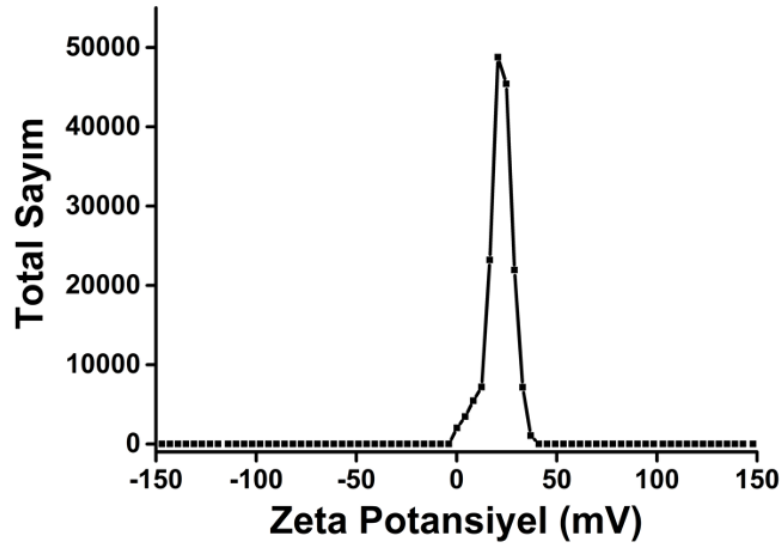
Tablo 4.1 Boş ChNP'in ortalama boyut, PDI ve zeta potansiyel değerleri

	Z-ave (d.nm)	PDI	Z-pot (mV)
Boş ChNP	215,2 ±9,6	0,207 ±0,1	+23,3 ±1,6

Boş ChNP'in boyut dağılımı grafiği Şekil 4.2'de, zeta potansiyel grafiği ise Şekil 4.3'de verildi.



Şekil 4.2 Boş ChNP'e ait boyut dağılımı grafiği



Şekil 4.3 Boş ChNP'e ait zeta potansiyel grafiği

Elde edilen sonuçlar literatür ile benzerlik göstermektedir [127, 128].

4.2.2 Boş ChNP'in Reaksiyon Verimi Sonuçları

Boş ChNP'in reaksiyon verimi Bölüm 3.3.7'de verilen Eşitlik 3.5 ile hesaplandı ve Tablo 4.2'de verildi.

Toplam madde miktarı, nanopartikül sentezi yapılırken kullanılan başlangıç madde miktarını, nanopartikül miktarı ise liyofilizasyon sonunda elde edilen kuru nanopartiküllerin kütlesini ifade etmektedir.

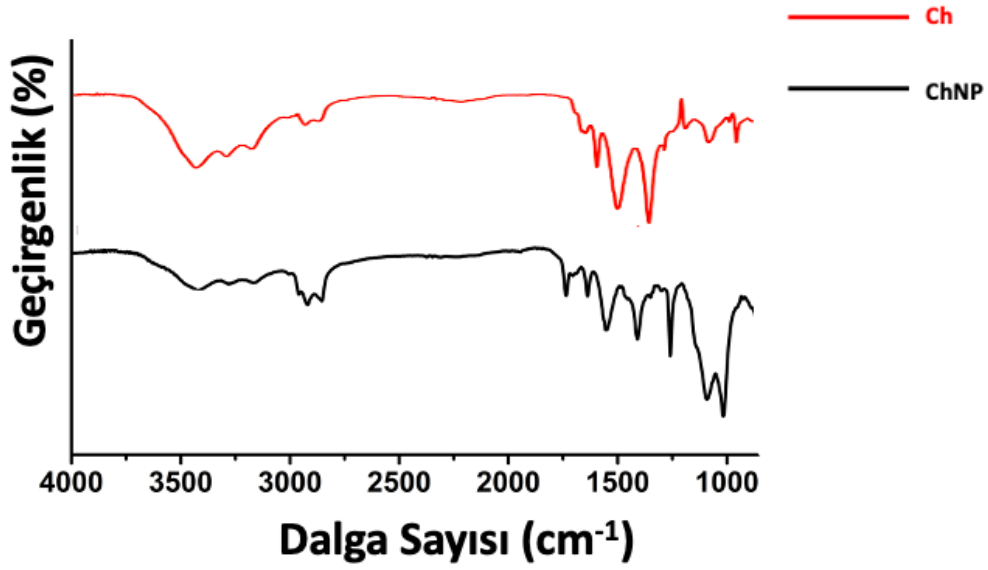
Tablo 4.2 Boş ChNP'lerin reaksiyon verimi sonucu

	Toplam madde miktarı (mg)	Nanopartikül miktarı (mg)	Reaksiyon verimi (%)
Boş ChNP	28	12,7	45,36

Boş ChNP'lerin reaksiyon verimi %45,36 olarak hesaplandı.

4.2.3 Boş ChNP'in FT-IR Analizi

Ch'den ChNP oluşumunu ve bu oluşumun sebep olduğu değişiklikleri gösterebilmek amacıyla Ch ve boş ChNP'in karşılaştırmalı FT-IR spektrumları Şekil 4.4'de verildi.



Şekil 4.4 Ch polimerinin ve boş ChNP'in karşılaştırmalı FT-IR spektrumu

Ch polimerinin sahip olduğu karakteristik $-NH_2$ bandı 3426 cm^{-1} 'de ve $-OH$ bandı 3253 cm^{-1} 'de görülmektedir. Simetrik gerilmeden kaynaklı $-CH$ bantı 2947 cm^{-1} 'de, asimetrik gerilmeden kaynaklı $-CH$ bantı ise 2856 cm^{-1} 'de görülmektedir. Ch polimerinin yapısındaki N-asetil gruplarından kaynaklanan 1628 cm^{-1} bandı amid $C=O$ gerilmesine ve 1541 cm^{-1} 'de bandı ise amid $-NH$ gerilmesine aittir. 1418 cm^{-1} 'de bandı CH_2 eğilmesi, 1140 cm^{-1} bandı $C-O-C$ asimetrik gerilmesi ve 1013 cm^{-1} bandı ise $C-O$ gerilmesinden kaynaklanmaktadır. Ch için elde edilen bantlar literatür ile uyumludur [129].

Ch polimerinde bulunan $-NH_2$ ve $-OH$ gerilmelerinin oluşturduğu bantların boş ChNP'de 3400 cm^{-1} 'de genişlemiş bant şeklinde karşımıza çıkmaktadır. Bu durum, nanopartikül oluşumunda meydana gelen yeni hidrojen bağları ile açıklanabilir. 1250 cm^{-1} 'de $P=O$ bağından kaynaklanan yeni bant oluşumunun gözlenmesi ise TPP'de bulunan fosfat gruplarıyla Ch'de bulunan amin gruplarının elektrostatik etkileşimini göstermektedir. Elde edilen sonuçlar literatür ile uyumludur [81, 129–131].

4.3 İyonik Jelasyon Yöntemiyle Sentezlenen CAPE Yüklü ChNP'in Karakterizasyonu

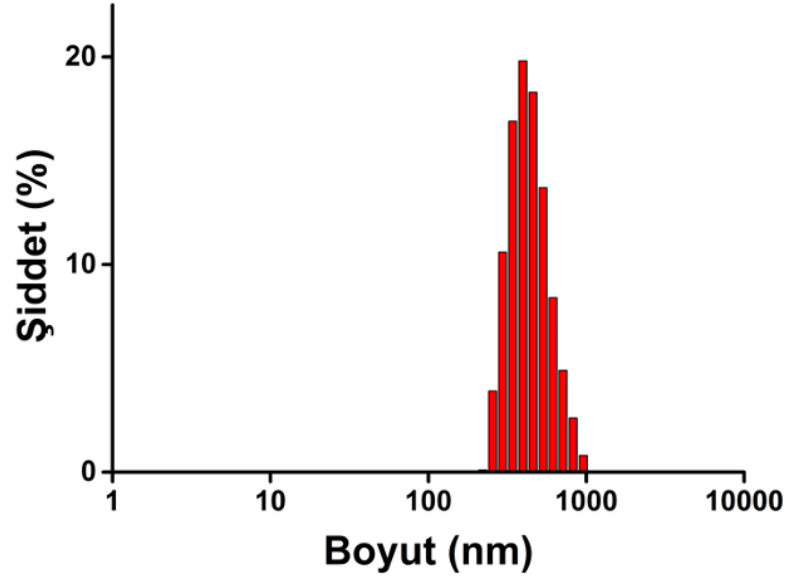
4.3.1 CAPE Yüklü ChNP'in Boyut ve Zeta Potansiyel Analizi

Optimum koşullarda sentezlenen CAPE yüklü ChNP'in oda sıcaklığında Zeta Sizer cihazı ile boyut analizleri, partikül büyüklüğü dağılımını ifade eden PDI değeri ile yüzey yükünü ifade eden zeta potansiyel değerleri tespit edildi ve Tablo 4.3'de verildi.

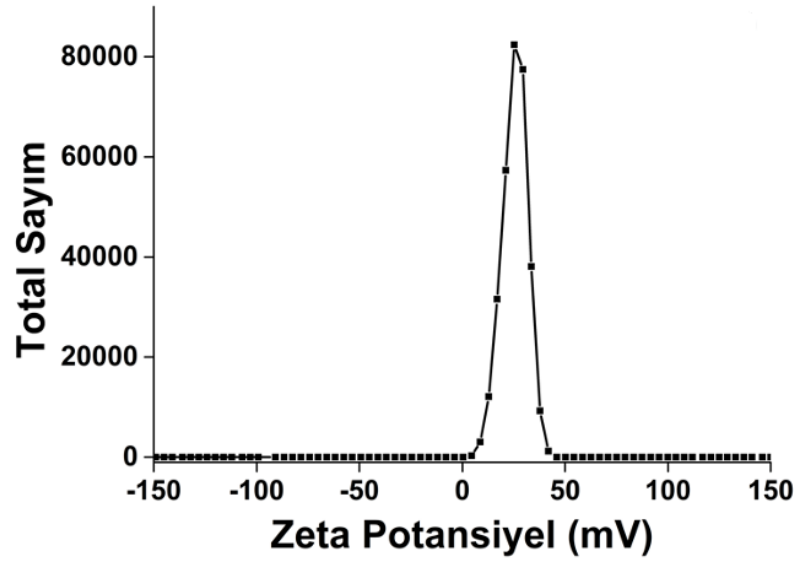
Tablo 4.3 CAPE yüklü ChNP'lerin ortalama boyut, PDI ve zeta potansiyel değerleri

	Z-ave (d.nm)	PDI	Z-pot (mV)
CAPE Yüklü ChNP	397,2 ±12,5	0,189 ±0,041	+24,3 ±2,2

CAPE yüklü ChNP'in boyut dağılımı grafiği Şekil 4.5'de, zeta potansiyel dağılım grafiği ise Şekil 4.6'da verildi.



Şekil 4.5 CAPE yüklü ChNP'lerin boyut dağılımı grafiği



Şekil 4.6 CAPE yüklü ChNP'lerin zeta potansiyel grafiği

CAPE yüklü ChNP'in boyutları, boş ChNP'e göre daha büyük çıkmıştır. Bu durum CAPE

enkapsülasyonunun başarıyla gerçekleştiğini göstermektedir [108].

4.3.2 CAPE Yüklü ChNP'in Reaksiyon Verimi Sonuçları

CAPE yüklü ChNP'in reaksiyon verimi (RV) Bölüm 3.2.7'de verilen Eşitlik 3.5 ile hesaplandı ve sonuç Tablo 4.4'de verildi. Toplam madde miktarı, nanopartikül sentezi yapılırken kullanılan başlangıç madde miktarını, nanopartikül miktarı ise liyofilizasyon sonunda elde edilen kuru nanopartiküllerin kütlesini ifade etmektedir.

Tablo 4.4 CAPE yüklü ChNP'in reaksiyon verimi sonuçları

	Toplam madde miktarı (mg)	Nanopartikül miktarı (mg)	Reaksiyon verimi (%)
CAPE Yüklü ChNP	76	35,38	46,55

CAPE yüklü ChNP'lerin reaksiyon verimi %46,55 olarak hesaplanmıştır.

4.3.3 CAPE Yüklü ChNP'in Enkapsülasyon Etkinliği Sonuçları

CAPE yüklü ChNP'in enkapsülasyon etkinliği (EE) Bölüm 3.3.8'de verilen Eşitlik 3.6 ile hesaplandı ve sonuç Tablo 4.5'te verildi. Toplam madde miktarı nanopartiküller sentezlenirken kullanılan başlangıçtaki toplam CAPE miktarını, serbest CAPE miktarı ise santrifüj sonrası süpernatantta kalan yani yüklenmeyen CAPE miktarını ifade etmektedir.

Tablo 4.5 CAPE yüklü ChNP'lerin enkapsülasyon etkinliği sonuçları

	Toplam madde miktarı (mg)	Serbest CAPE miktarı (mg)	Enkapsülasyon Etkinliği (%)
CAPE Yüklü ChNP	20	0,454	97,73

CAPE yüklü ChNP'in enkapsülasyon etkinliği %97,73 olarak hesaplanmıştır.

4.3.4 CAPE Yüklü ChNP'in Yükleme Kapasitesi Sonuçları

CAPE yüklü ChNP'in yükleme kapasitesi (YK) Bölüm 3.3.9'da verilen Eşitlik 3.7 ile hesaplandı ve sonuç Tablo 4.6'da verildi. Toplam madde miktarı nanopartiküller sentezlenirken kullanılan başlangıçtaki toplam CAPE miktarını, serbest CAPE miktarı santrifüj sonrası süpernatantta kalan yani yüklenmeyen CAPE miktarını, nanopartikül

miktarı ise liyofilizasyon işlemi sonucu elde edilen toplam kuru katının kütlesini ifade etmektedir.

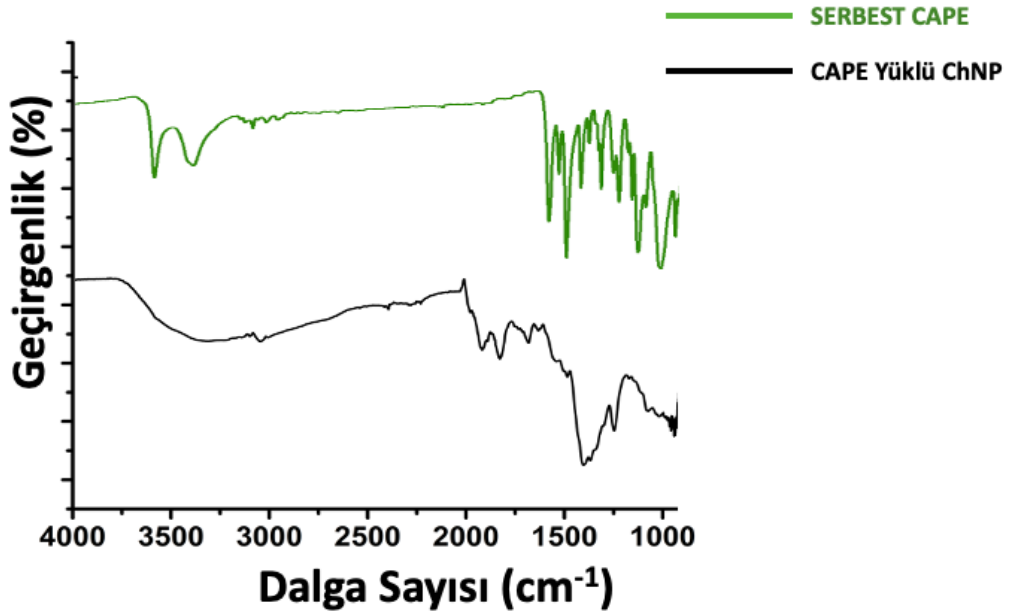
Tablo 4.6 CAPE yüklü ChNP'in yükleme kapasitesi sonuçları

	Toplam CAPE miktarı (mg)	Serbest CAPE miktarı (mg)	Nanopartikül miktarı (mg)	Yükleme Kapasitesi (%)
CAPE Yüklü ChNP	20	0,454	35,38	55,25

CAPE yüklü ChNP'lerin yükleme kapasitesi %55,25 olarak hesaplanmıştır.

4.3.5 CAPE Yüklü ChNP'in FT-IR Analizi

Etken maddenin nanopartikül yüzeyine adsorbe mi yoksa nanopartiküle enkapsüle mi olduğunun tespit edilmesi amacıyla FT-IR analizi yapılmıştır. Eğer üretilen nanopartiküllerin enkapsülasyonu başarılı şekilde gerçekleştiyse, CAPE yüklü ChNP'in FT-IR spektrumunun Ch polimeri karakteristiğinde olup CAPE'ye ait karakteristik bantların görülmemesi beklenir. Bu ayrımın rahat görülmesi adına serbest CAPE ve CAPE yüklü ChNP'in karşılaştırmalı olarak yer aldığı FT-IR spektrumu Şekil 4.7'de verildi.



Şekil 4.7 Serbest CAPE ve CAPE yüklü ChNP'in karşılaştırmalı FT-IR analizi

Serbest CAPE molekülüne karakteristik spektrumda 3551 cm^{-1} ve 3320 cm^{-1} 'de görülen bantlar -OH bantlarını, 1633 cm^{-1} 'de görülen bant -C=O bandını, 1533

cm^{-1} 'de görülen bant C=C bandını ve 1062 cm^{-1} 'de görülen bant C-O bandını temsil etmektedir. Elde edilen sonuçlar literatür ile uyumludur [132, 133].

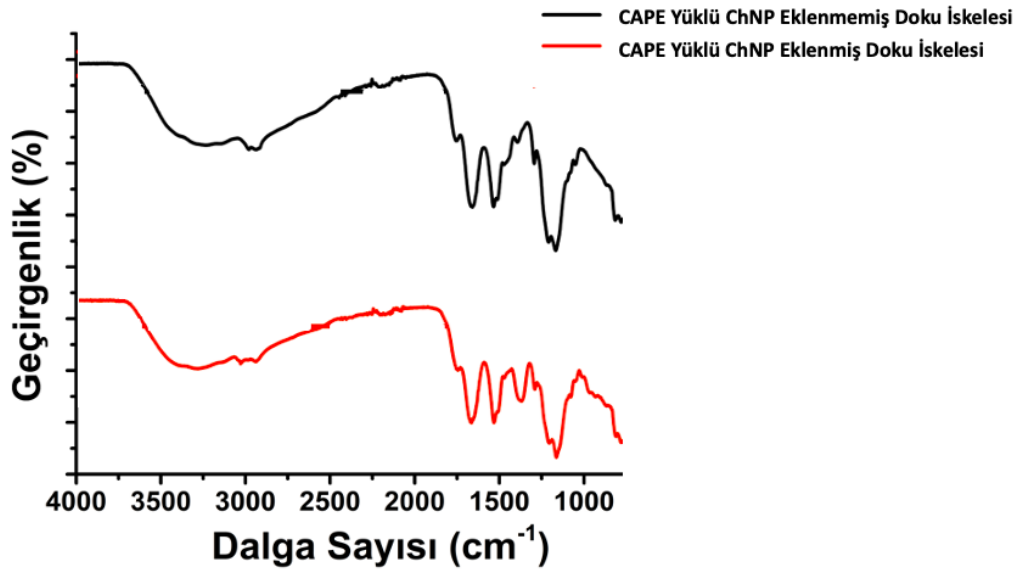
CAPE yüklü ChNP'e ait spektrumun Ch karakteristiğinde olduğu, CAPE'ye ait karakteristik bantların gözlemlenmemesi enkapsülasyonun başarılı bir şekilde gerçekleştiğini göstermektedir.

4.4 Doku İskelesi Karakterizasyonu

Doku iskelesi karakterizasyonunda karşılaştırma yapabilmek için CAPE yüklü ChNP eklenmiş ve eklenmemiş iskelelerin FT-IR ve SEM ile karakterizasyonu yapılarak, şişme testi uygulandı. CAPE yüklü ChNP eklenmiş doku iskelesine ise salım çalışmaları, biyoyuyumluluk ve AA analizleri yapıldı.

4.4.1 Doku İskelelerinin FT-IR Analizi

Karşılaştırma yapabilmek amacıyla CAPE yüklü ChNP eklenmiş ve eklenmemiş doku iskelelerinin FT-IR spektrumu Şekil 4.8'de verildi.



Şekil 4.8 CAPE yüklü ChNP eklenmiş ve eklenmemiş doku iskelelerinin FT-IR analizi

CS-Ch polielektrolit kompleksinin sahip olduğu karakteristik 1636 cm^{-1} ve 1536 cm^{-1} bantları sırasıyla CONH_2 ve NH_3^+ etkileşimlerini göstermektedir. 1402 cm^{-1} 'de görülen bu bant polielektrolit komplekste yer alan $\text{NH}_3 + \text{COO}^-$ etkileşimini ifade etmektedir. Bunlara ek olarak polielektrolit komplekste oluşan bir başka etkileşim grubu olan $\text{NH}_3 + \text{SO}_4^-$ kompleksi 1151 cm^{-1} bandında görülmektedir. Elde edilen sonuçlar literatür ile uyumludur [134–136].

CAPE yüklü ChNP içeren doku iskelesine ait spektrumun, CAPE yüklü ChNP içermeyen doku iskelesi karakteristiğinde olması, nanopartikül enkapsülasyonun başarılı bir şekilde gerçekleştiğini göstermektedir. Elde edilen sonuçlar literatür ile uyumludur [135]

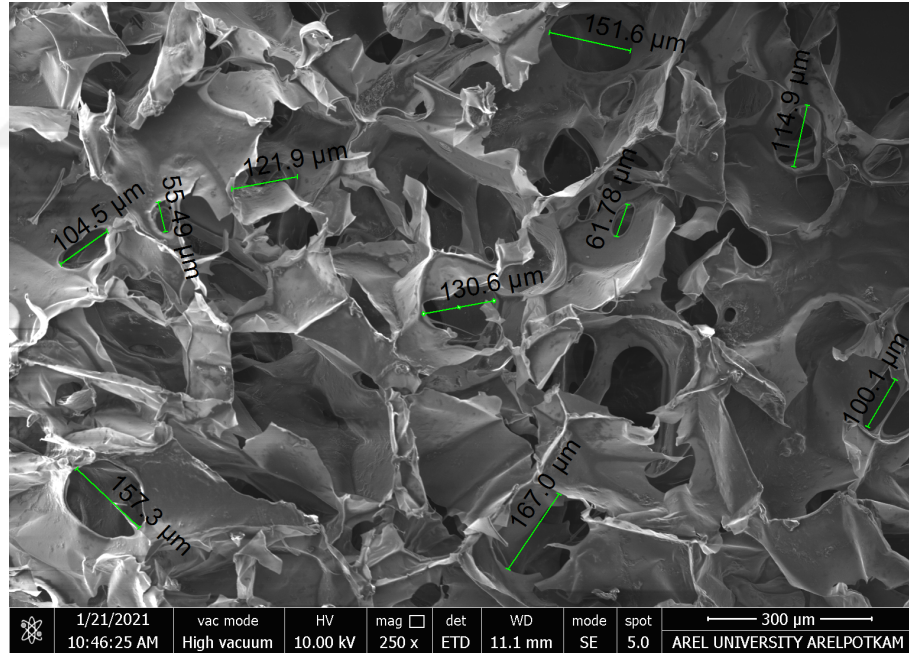
4.4.2 Doku İskelelerinin SEM Analizi

Üretilen doku iskelelerinin morfolojik analizleri SEM cihazı ile farklı büyütme oranlarında gerçekleştirildi.

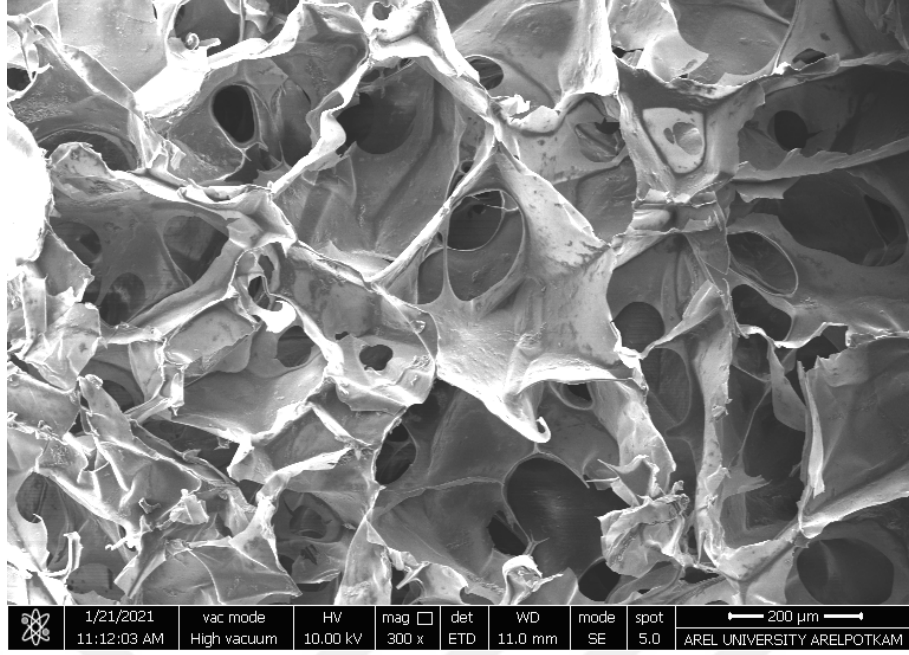
SEM görüntüleri incelendiğinde doku iskelelerinin oldukça homojen ve gözenekli bir yapıya sahip olduğu görülmektedir.

CAPE yüklü ChNP eklenmiş doku iskelesinin gözenek çaplarının 62-115 μm arasında değiştiği tespit edildi.

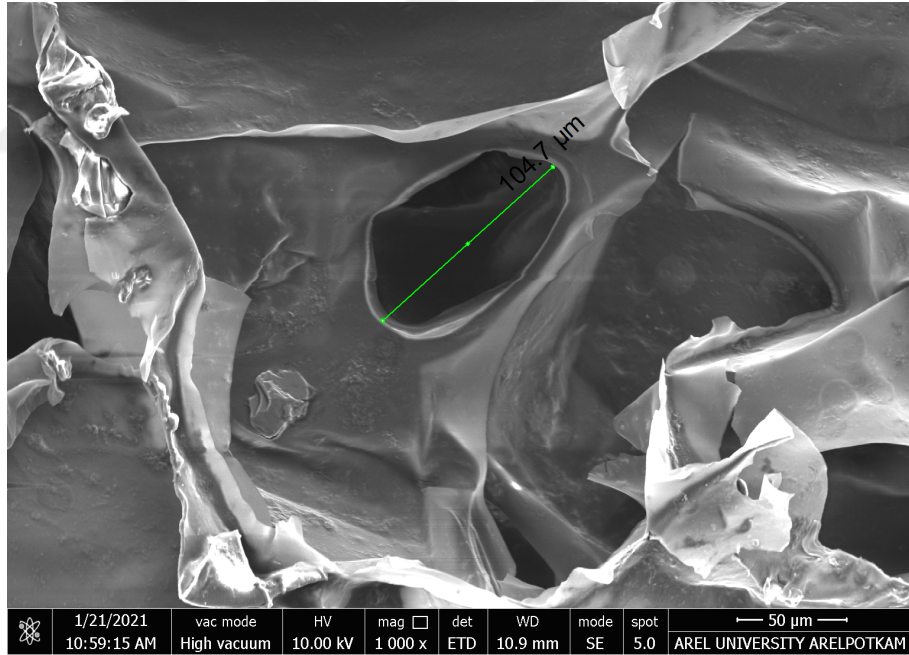
CAPE yüklü ChNP eklenmemiş doku iskelesinin farklı büyütme oranlarındaki SEM görüntüleri verildi.



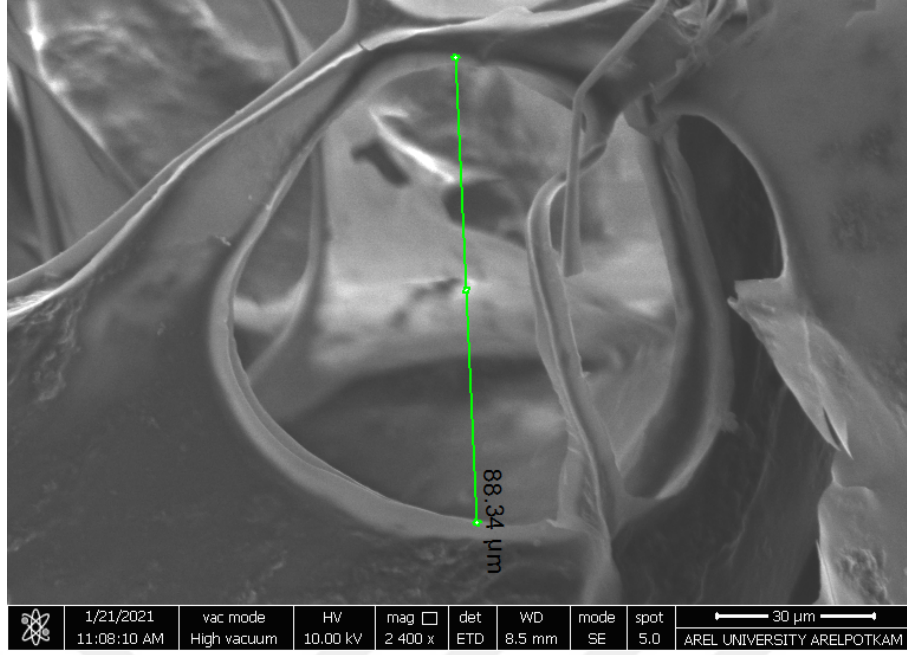
Şekil 4.9 CAPE yüklü ChNP eklenmemiş doku iskelesinin 220x büyütmede alınan SEM görüntüsü



Şekil 4.10 CAPE yüklü ChNP eklenmemiş doku iskelesinin 300x büyütmede alınan SEM görüntüsü



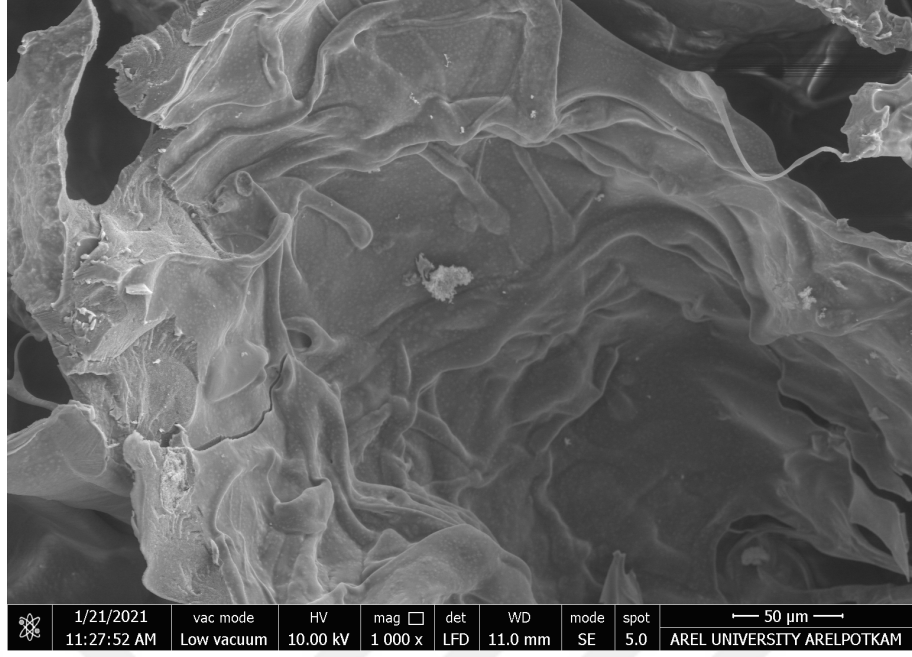
Şekil 4.11 CAPE yüklü ChNP eklenmemiş doku iskelesinin 1000x büyütmede alınan SEM görüntüsü



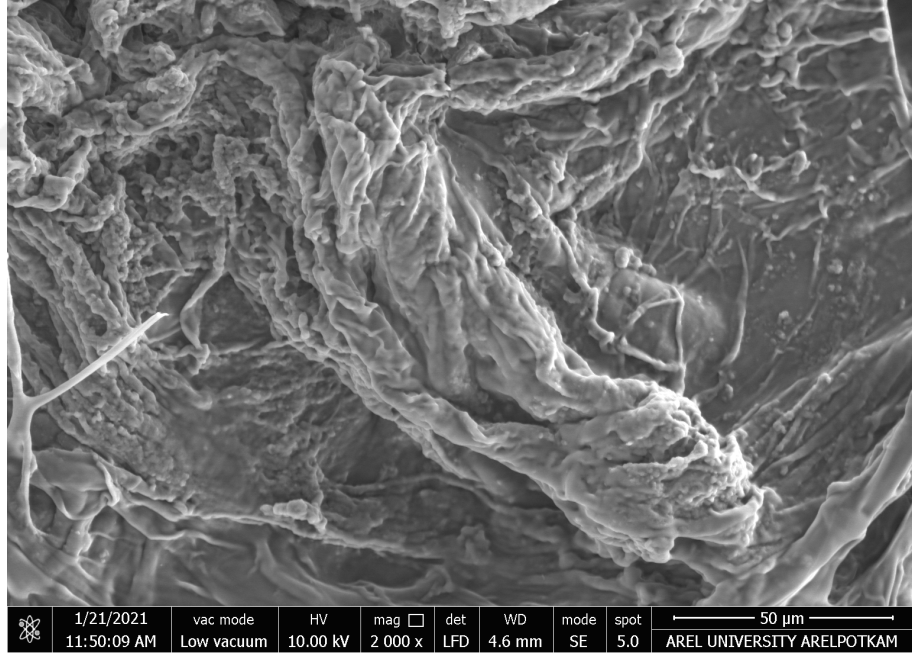
Şekil 4.12 CAPE yüklü ChNP eklenmemiş doku iskelesinin 2400x büyütmede alınan SEM görüntüsü

CAPE yüklü ChNP eklenmiş doku iskelesinin SEM görüntülerinde 226-482 μm arasında değişen daha büyük gözenek çapları ve daha yoğun iç bağlantılar olduğu görülmektedir. Bu duruma nanopartiküllerin iskelenin gözenek çeperlerine uyguladığı kuvvetin neden olduğu söylenebilir.

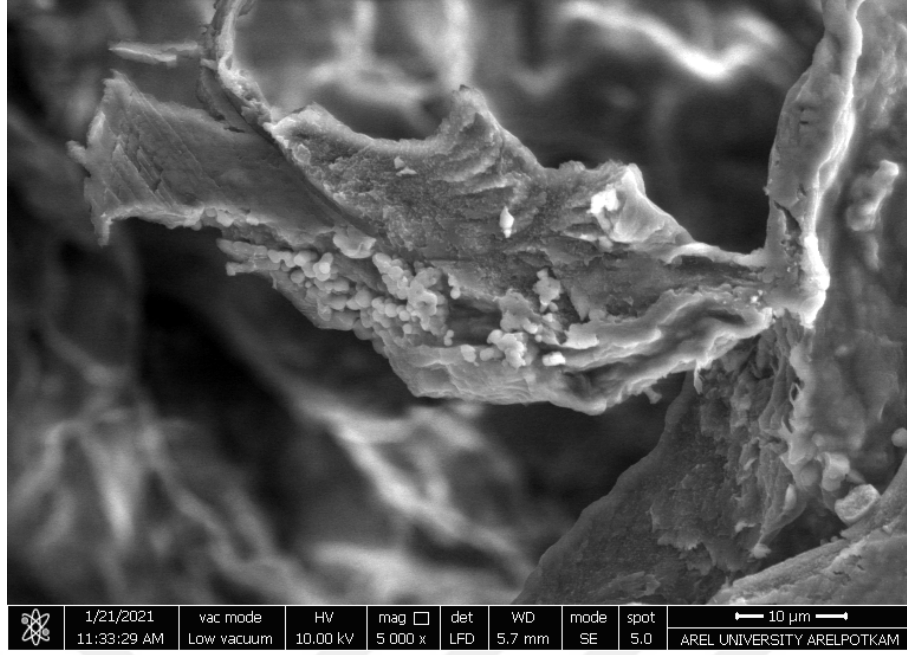
CAPE yüklü ChNP eklenmiş doku iskelesinin farklı büyütme oranlarındaki SEM görüntüleri verildi.



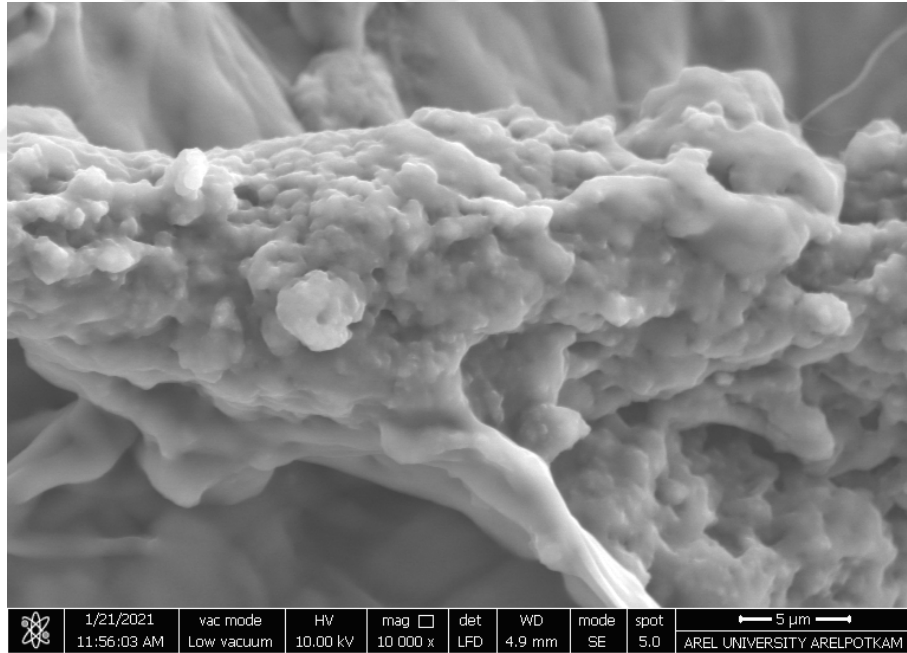
Şekil 4.13 CAPE yüklü ChNP eklenmiş doku iskelesinin 1000x büyütmede alınan SEM görüntüsü



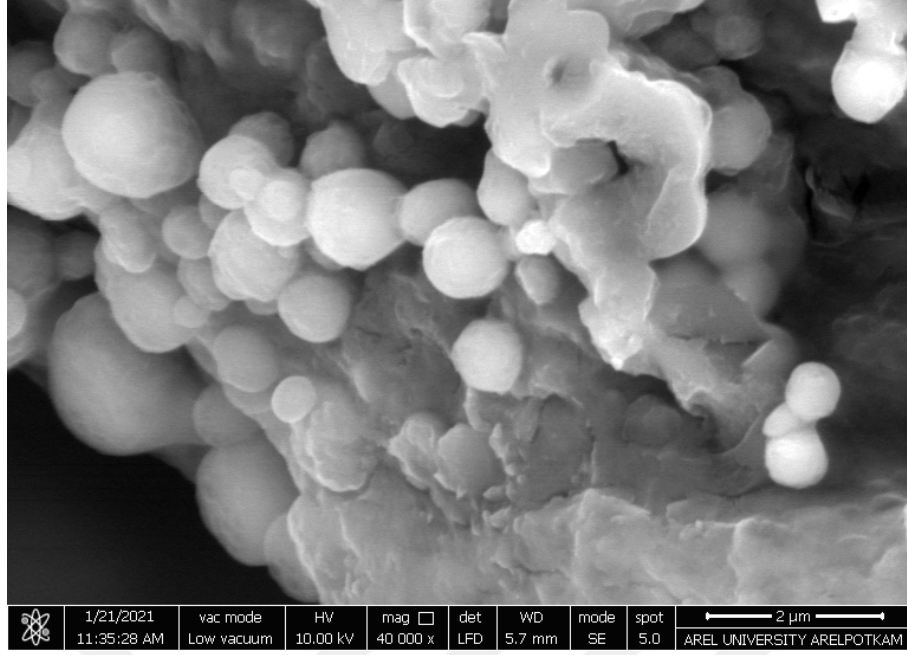
Şekil 4.14 CAPE yüklü ChNP doku eklenmiş doku iskelesinin 2000x büyütmede alınan SEM görüntüsü



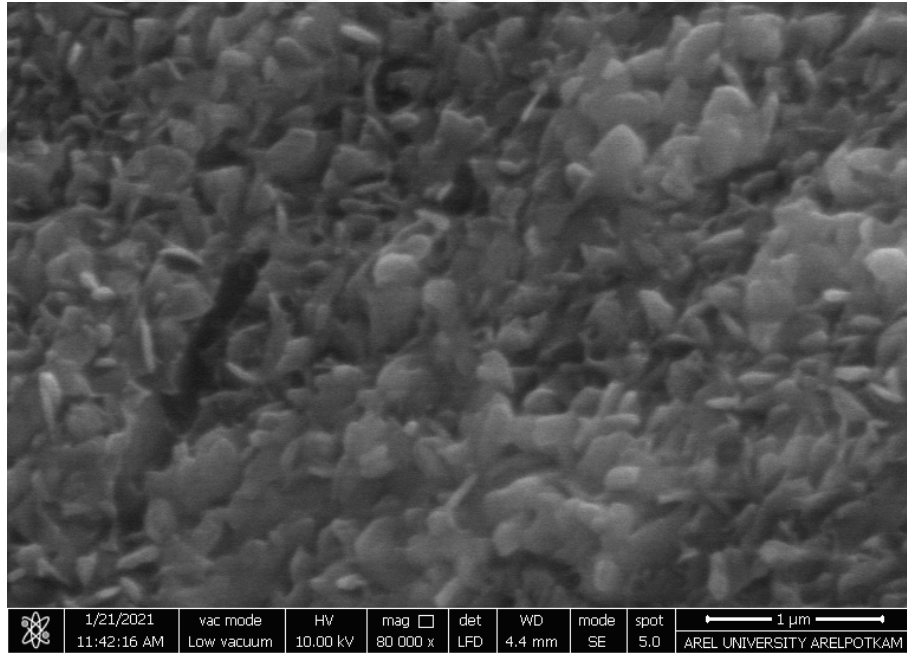
Şekil 4.15 CAPE yüklü ChNP eklenmiş doku iskelesinin 5000x büyütmede alınan SEM görüntüsü



Şekil 4.16 CAPE yüklü ChNP eklenmiş doku iskelesinin 10000x büyütmede alınan SEM görüntüsü



Şekil 4.17 CAPE yüklü ChNP eklenmiş doku iskelesinin 40000x büyütmede alınan SEM görüntüsü



Şekil 4.18 CAPE yüklü ChNP eklenmiş doku iskelesinin 80000x büyütmede alınan SEM görüntüsü

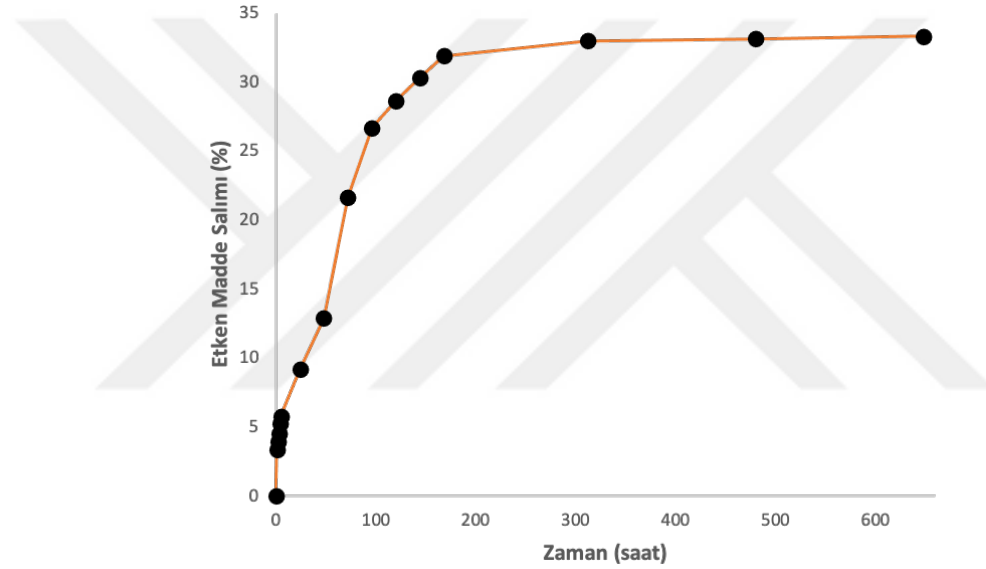
Gözenek çaplarının büyümesinin doku iskelesi uygulamalarında hücrelerin barınmasını, hücre penetrasyonunu, hücre göçünü ve ECM oluşumunu dolayısıyla doku büyümesini ve vaskülarizasyonu arttırdığı bilinmektedir. Elde edilen sonuçlar literatür ile uyumludur [118, 120, 137, 138]

4.4.3 CAPE Yüklü ChNP İçeren Doku İskelesinin *In-vitro* Salım Çalışmaları

CAPE yüklü ChNP içeren doku iskelesinin kümülatif salım çalışmaları 30 gün boyunca yürütüldü ve salım profili incelendi. Belirli zaman aralıklarında alınan 323 nm'deki UV ölçümlerinden yola çıkılarak konsantrasyon hesabı yapıldı ve bu değerler mg cinsinden hesaba katılarak CAPE'nin zamana bağlı salım grafiği çizildi.

Kümülatif salım çalışmaları sonunda CAPE yüklü ChNP içeren doku iskelesinin ilk 5 saat içerisinde yüklü etken maddenin %5,79'unu saldı, 2.günden sonra salım yüzdesinin 2 katına çıktığı, 20.günde ise etken maddenin maksimum %33,30 ile salımı tamamladığı tespit edildi.

Salım grafiği Şekil 4.19'da verildi.



Şekil 4.19 CAPE yüklü ChNP eklenmiş doku iskelesinin salım grafiği

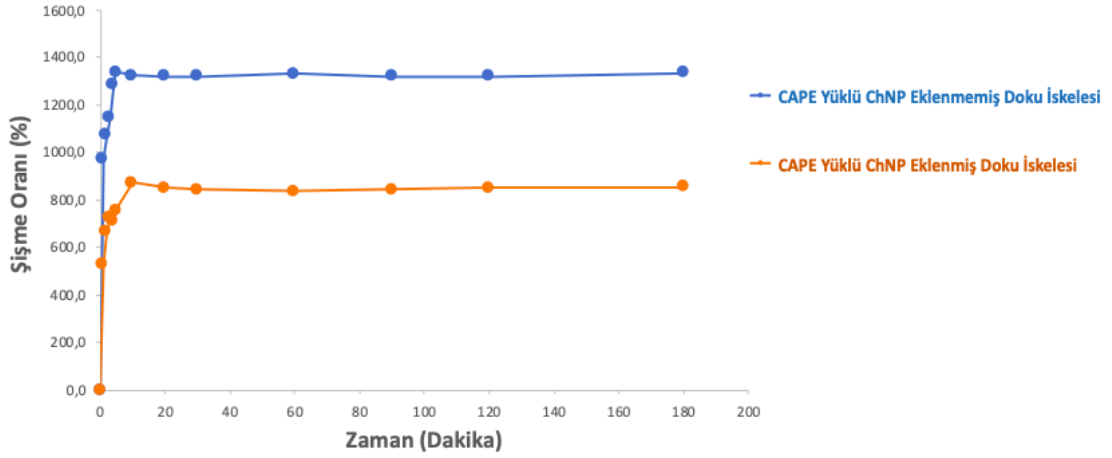
Elde edilen salım grafiği, literatürde yer alan ve kinetik çalışmaları yapılan salım profillerine benzerlik göstermektedir [139, 140]. Bu çalışmalardan yola çıkılarak etken maddenin salım yüzdesinin; fiziksel ve kimyasal modifikasyonlar ile arttırılabileceği düşünülmektedir.

4.4.4 Doku İskelelerinin Şişme Testi Sonuçları

Doku iskelelerine şişme testleri, 37°C'deki PBS içerisinde 3 saat boyunca uygulandı. Belirli zaman aralarında PBS çözeltisinden uzaklaştırılan doku iskelelerinin şişme oranları eşitlik 3.10 ile hesaplandı.

CAPE yüklü ChNP eklenmiş ve eklenmemiş doku iskelelerinin, zamana karşı çizilen

yüzde şişme grafiği Şekil 4.20’de verildi.



Şekil 4.20 CAPE yüklü ChNP eklenmiş ve eklenmemiş doku iskelelerine uygulanan şişme testi grafiği

Şişme testleri sonunda; CAPE yüklü ChNP eklenmemiş doku iskelesinin denge şişme yüzdesi ortalama %1323 olup, dengeye ulaşma süresi 10 dakikadır. Nanopartikül eklenmiş doku iskelesinin ise denge şişme yüzdesi ortalama %846 olup, dengeye ulaşma süresi 20 dakikadır. Nanopartikül yüklenmiş sistemde meydana gelen bu değişiklikler nanopartiküllerin sisteme başarılı şekilde yüklenebildiğini kanıtlar niteliktedir.

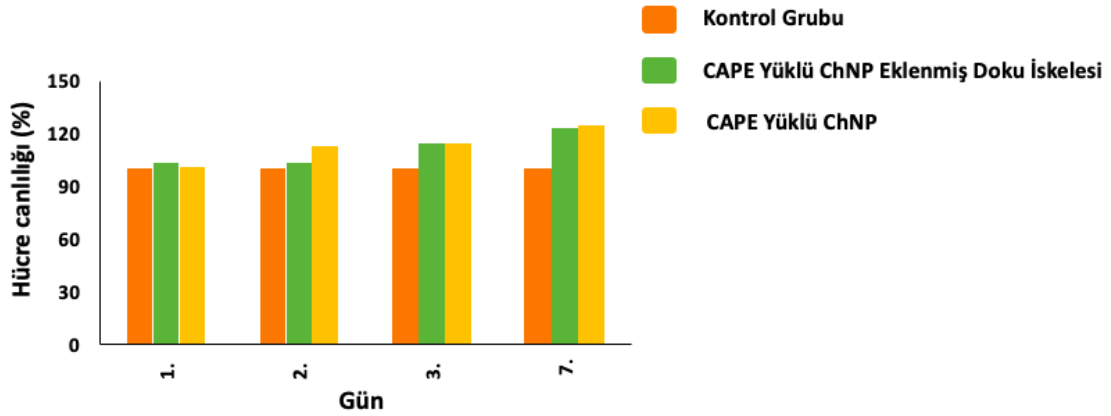
Doku iskelesinin şişme ve sıvı tutma özellikleri hücresel yapışma başta olmak üzere vücut sıvılarının emilimi ve hücresel besin kaynaklarının transferi için de kritik rol oynamaktadır. Şişme, doku iskelesinin iç yüzey alanını arttırdığı için kontrolsüz şişme durumunda iskelenin zayıflamasına ve hızlıca bozunmasına neden olur [137].

Bu tez çalışmasında üretilen doku iskelesine küresel yapıdaki nanopartiküllerin yüklenmesi, doku iskelesinin gözeneklerinin kısmen dolmasını, dolayısıyla daha düşük ve kontrollü şişme oranı elde edilmesini sağlar. Çalışmalar sonunda elde edilen bulgular literatür ile benzerlik göstermektedir [118, 120, 122, 137, 138].

4.4.5 CAPE yüklü ChNP İçeren Doku İskelesinin Biyoyumluluk Testi Sonuçları

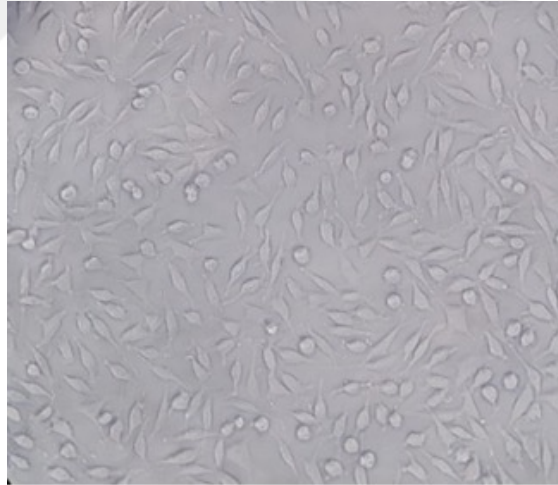
Günlerin bir fonksiyonu olarak 48.saatte CAPE yüklü ChNP ve CAPE yüklü ChNP içeren doku iskelesi örneklerinin tutulduğu besiyeri ortamlarının L929 hücre proliferasyonuna etkisi MTT testi ile ölçüldü. Bu çalışmada CAPE yüklü ChNP ve CAPE yüklü ChNP eklenmiş doku iskelesinin hücre çoğalması ve biyoyumluluğu MTT testi ile araştırıldı.

48.saatte CAPE yüklü ChNP ve doku iskelesi örneklerinin MTT sonucu elde edilen verilerin grafiği Şekil 4.21’de verildi.



Şekil 4.21 48.saatte CAPE yüklü ChNP ve CAPE yüklü ChNP eklenmiş doku iskelesi örneklerinin tutulduğu besiyeri ortamlarının L929 hücre proliferasyonuna etkisinin MTT testi ile ölçülmesi sonucu elde edilen verilerin grafiği

L929 fibroblast hücrelerin 24 saat inkübasyonu sonucu ortaya çıkan mikroskop görüntüsü Şekil 4.22’de verildi.

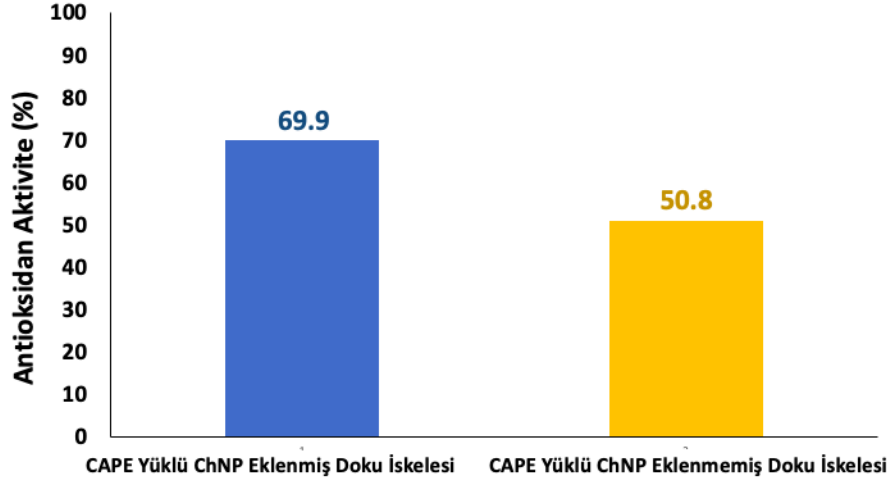


Şekil 4.22 L929 fibroblast hücrelerin 24 saat inkübasyonu sonucu ortaya çıkan mikroskop görüntüsü

Elde edilen veriler bu örneklerin L929 hücreleri ile *in-vitro* ortamda kontrol edildiğinde toksik olmadığını gösterdi. Sonuçlar literatür ile uyumludur [141–143].

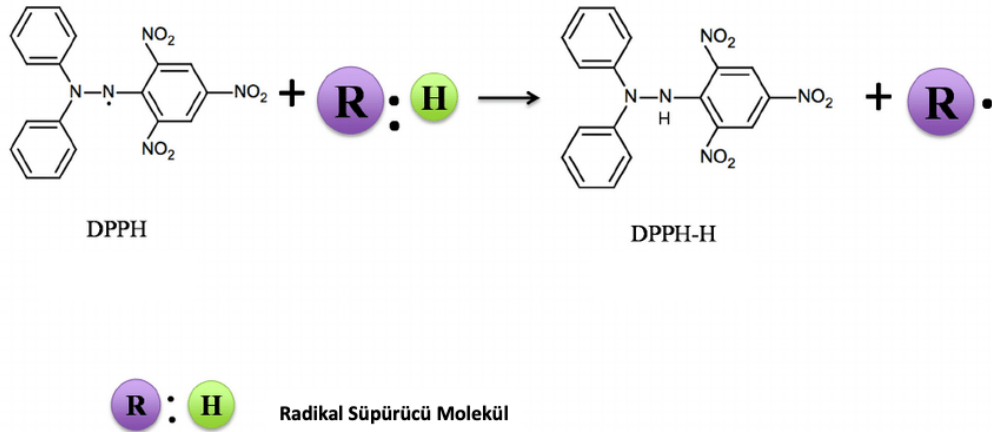
4.4.6 Antioksidan Aktivite Sonuçları

Yapılan AA testinde CAPE yüklü ChNP eklenmiş ve eklenmemiş doku iskelelerinin karşılaştırmalı olarak serbest radikalleri süpürme yüzdeleri hesaplandı ve ilgili grafik Şekil 4.23’de verildi.



Şekil 4.23 CAPE yüklü ChNP eklenmiş ve eklenmemiş doku iskelelerinin karşılaştırmalı AA verileri

DPPH serbest radikal süpürme reaksiyon mekanizması şematik olarak Şekil 4.24’de verildi.



Şekil 4.24 DPPH serbest radikal süpürme reaksiyon mekanizması [144]

Ch’nin ve CS’nin sahip olduğu -OH ve -NH₂ gruplarının serbest radikallerle reaksiyona girebilmesi, çapraz bağlı her iki doku iskelesinin de AA göstermesini sağlar [145, 146]. 1 saat sonunda hesaplanan AA sonuçlarında, her iki doku iskelesinin birbirinden önemli oranda farklı AA göstermediği ancak beklenildiği gibi CAPE yüklü ChNP

eklenmiş doku iskelesinin daha yüksek AA gösterdiği bulundu. Bu durum CAPE'nin yüksek AA etkisiyle açıklanabilir.



5 SONUÇ VE ÖNERİLER

Bu tez çalışmasında CS, Ch ve CAPE yüklü ChNP kullanılarak OA tedavisinde kullanılabilecek ve literatürde daha önce çalışılmamış bir doku iskelesinin üretilmesi ve bu doku iskelesinin fizikokimyasal ve morfolojik özellikleri ile beraber ilaç salımı, şişme oranı, biyouyumluluğu ve AA açısından incelenmesi amaçlanmıştır.

İyonik jelasyon yöntemiyle sentezlenen optimize edilmiş boş ChNP için çıkan sonuçlar şu şekildedir;

o Nanopartiküllerin ortalama boyutu $215,2 \pm 9,6$ nm, PDI değerinin $0,207 \pm 0,090$ ve zeta potansiyel değerlerinin $+23,3 \pm 1,62$ mV,

o Reaksiyon veriminin ise %45.36 olduğu tespit edildi.

o Moleküler karakterizasyon FT-IR spektrofotometre ile gerçekleştirildi. Beklenildiği gibi ChNP'in FT-IR grafiğinin Ch polimeri karakteristiğinde olduğu, böylece nanopartikül enkapsülasyonunun başarılı şekilde gerçekleştiği düşünüldü.

İyonik jelasyon yöntemiyle sentezlenen optimize edilmiş CAPE yüklü ChNP için çıkan sonuçlar şu şekildedir;

o İyonik jelasyon yöntemiyle sentezlenen optimize edilmiş CAPE yüklü ChNP için nanopartiküllerin boyutlarının $397,2 \pm 12,5$ nm, PDI değerinin $0,189 \pm 0,041$ ve zeta potansiyel değerlerinin $+24,3 \pm 2,2$ mV,

o Reaksiyon veriminin %46.55, enkapsülasyon etkinliğinin %97.33, yükleme kapasitesinin %55.25 olduğu tespit edildi.

o Moleküler karakterizasyon FT-IR spektrofotometre ile gerçekleştirildi. Beklenildiği gibi CAPE yüklü ChNP'de CAPE molekülüne ait karakteristik bantlarının görülmemesi ve Ch karakteristiğinde spektrum elde edilmesi ChNP'e enkapsüle olan CAPE'yi kanıtlar niteliktedir.

Üretilen doku iskeleleri için çıkan sonuçlar şu şekildedir;

o Karşılaştırma yapabilmek adına CAPE yüklü ChNP eklenmiş ve eklenmemiş doku iskelelerinin morfolojik analizleri SEM ile gerçekleştirildi. Homojen ve gözenekliliği yüksek doku iskeleleri elde edildiği görüldü. CAPE yüklü ChNP eklenmemiş doku iskelesinin gözenek çapları 62-115 μm arasında değişmekle birlikte CAPE yüklü ChNP eklenmiş doku iskelesinin gözenek çapları 226-482 μm arasında değişmektedir. Bu çap artışına nanopartiküllerin sisteme başarılı şekilde yüklenerek iskelenin gözenek çeperlerine uyguladığı kuvvetin neden olduğu söylenebilir.

o Moleküler karakterizasyon FT-IR spektrofotometre ile gerçekleştirildi. Polielektrolit kompleksleşmeye ait bantlar, CAPE yüklü ChNP eklenmiş ve eklenmemiş doku iskelelerdeki çapraz bağlanmanın gerçekleştiğini kanıtlar niteliktedir. CAPE yüklü ChNP eklenmiş doku iskelesinde CAPE'ye ait bantların görülmemesi, nanopartiküllerin sisteme enkapsüle edilebildiğini ispat etmektedir.

o Üretilen doku iskelesinin salım çalışması sonucunda doku iskelesinin içerdiği etken maddenin 20.gün sonunda %33.30'a kadar salım yapabildiği tespit edilmiştir.

o Şişme testi çalışmaları sonunda; nanopartikül eklenmemiş doku iskelesinin denge şişme yüzdesi ortalama %1323 olup, dengeye ulaşma süresi 10 dakikadır. Nanopartikül eklenmiş doku iskelesinin ise denge şişme yüzdesi ortalama %846 olup, dengeye ulaşma süresi 20 dakikadır. Nanopartiküllerin yüklenmesi, doku iskelesinin gözeneklerinin kısmen kapanmasına, dolayısıyla ani şişme artışının önüne geçilerek daha kontrollü şişme oranı elde edilmesini sağladı. Nanopartikül yüklenmiş sistemde meydana gelen bu değişiklikler nanopartiküllerin sisteme başarılı şekilde yüklenebildiğini kanıtlar niteliktedir.

o Biyouyumluluk analizi sonucu, CAPE yüklü ChNP eklenmiş doku iskelesinin L929 hücreleri ile *in-vitro* ortamda kontrol edildiğinde biyouyumlu olduğu tespit edildi.

o AA analizi sonuçlarında yüksek AA gösteren CAPE sayesinde, CAPE yüklü ChNP eklenmiş doku iskelesinin AA'sının %69.9, CAPE yüklü ChNP eklenmemiş doku iskelesinin AA'sının %50.8 olduğu tespit edildi.

Tüm bu sonuçlar kapsamında literatürde ilk defa CS, Ch ve CAPE yüklü ChNP'lerden oluşan ve OA için yeni bir tedavi önerisi olarak sunulabilecek bir doku iskelesi üretildi.

Bu doku iskelesinin salım yüzdesinin artırılması için salım çalışmalarının farklı koşullarda tekrarlanması ve bu doku iskelesine antimikrobiyal aktivite testinin uygulanması önerilebilir.

- [1] A. D. Woolf, B. Pfleger, "Burden of major musculoskeletal conditions," *Bulletin of the world health organization*, vol. 81, pp. 646–656, 2003.
- [2] K. Sinusas, "Osteoarthritis: Diagnosis and treatment," *American family physician*, vol. 85, no. 1, pp. 49–56, 2012.
- [3] T. Towheed, L. Maxwell, M. Judd, M. Catton, M. C. Hochberg, G. A. Wells, "Acetaminophen for osteoarthritis," *Cochrane database of systematic reviews*, no. 1, 2006.
- [4] M. Fransen, S. McConnell, A. R. Harmer, M. Van der Esch, M. Simic, K. L. Bennell, "Exercise for osteoarthritis of the knee," *Cochrane database of systematic reviews*, no. 1, 2015.
- [5] E. B. Hunziker, K. Lippuner, M. Keel, N. Shintani, "An educational review of cartilage repair: Precepts & practice–myths & misconceptions–progress & prospects," *Osteoarthritis and Cartilage*, vol. 23, no. 3, pp. 334–350, 2015.
- [6] J. N. Katz, B. E. Earp, A. H. Gomoll, "Surgical management of osteoarthritis," *Arthritis care & research*, vol. 62, no. 9, p. 1220, 2010.
- [7] R. Langer, J. P. Vacanti, "Tissue engineering," *Science (New York, NY)*, vol. 260, no. 5110, pp. 920–926, 1993.
- [8] C. Chung, J. A. Burdick, "Engineering cartilage tissue," *Advanced drug delivery reviews*, vol. 60, no. 2, pp. 243–262, 2008.
- [9] W. Wang, M. Zhang, W. Lu, X. Zhang, D. Ma, X. Rong, C. Yu, Y. Jin, "Cross-linked collagen–chondroitin sulfate–hyaluronic acid imitating extracellular matrix as scaffold for dermal tissue engineering," *Tissue Engineering Part C: Methods*, vol. 16, no. 2, pp. 269–279, 2010.
- [10] S. Yan, Q. Zhang, J. Wang, Y. Liu, S. Lu, M. Li, D. L. Kaplan, "Silk fibroin/chondroitin sulfate/hyaluronic acid ternary scaffolds for dermal tissue reconstruction," *Acta biomaterialia*, vol. 9, no. 6, pp. 6771–6782, 2013.
- [11] C. Pillai, W. Paul, C. P. Sharma, "Chitin and chitosan polymers: Chemistry, solubility and fiber formation," *Progress in polymer science*, vol. 34, no. 7, pp. 641–678, 2009.
- [12] C. Qin, H. Li, Q. Xiao, Y. Liu, J. Zhu, Y. Du, "Water-solubility of chitosan and its antimicrobial activity," *Carbohydrate polymers*, vol. 63, no. 3, pp. 367–374, 2006.
- [13] A. R. Dudhani, S. L. Kosaraju, "Bioadhesive chitosan nanoparticles: Preparation and characterization," *Carbohydrate polymers*, vol. 81, no. 2, pp. 243–251, 2010.

- [14] H. Göçer, İ. Gülçin, "Caffeic acid phenethyl ester (cape): Correlation of structure and antioxidant properties," *International journal of food sciences and nutrition*, vol. 62, no. 8, pp. 821–825, 2011.
- [15] A. Russo, R. Longo, A. Vanella, "Antioxidant activity of propolis: Role of caffeic acid phenethyl ester and galangin," *Fitoterapia*, vol. 73, S21–S29, 2002.
- [16] F. Chen, Z. Shi, K. Neoh, E. Kang, "Antioxidant and antibacterial activities of eugenol and carvacrol-grafted chitosan nanoparticles," *Biotechnology and bioengineering*, vol. 104, no. 1, pp. 30–39, 2009.
- [17] W.-M. Wu, L. Lu, Y. Long, T. Wang, L. Liu, Q. Chen, R. Wang, "Free radical scavenging and antioxidative activities of caffeic acid phenethyl ester (cape) and its related compounds in solution and membranes: A structure–activity insight," *Food Chemistry*, vol. 105, no. 1, pp. 107–115, 2007.
- [18] K. Natarajan, S. Singh, T. R. Burke, D. Grunberger, B. B. Aggarwal, "Caffeic acid phenethyl ester is a potent and specific inhibitor of activation of nuclear transcription factor nf-kappa b," *Proceedings of the National Academy of Sciences*, vol. 93, no. 17, pp. 9090–9095, 1996.
- [19] H. Järveläinen, A. Sainio, M. Koulu, T. N. Wight, R. Penttinen, "Extracellular matrix molecules: Potential targets in pharmacotherapy," *Pharmacological reviews*, vol. 61, no. 2, pp. 198–223, 2009.
- [20] M. L. Tanzer, "Current concepts of extracellular matrix," *Journal of Orthopaedic Science*, vol. 11, no. 3, p. 326, 2006.
- [21] C. Frantz, K. M. Stewart, V. M. Weaver, "The extracellular matrix at a glance," *Journal of cell science*, vol. 123, no. 24, pp. 4195–4200, 2010.
- [22] M. L. Jones, J. D. Bancroft, M. Gamble, "Connective tissues and stains," *Theory and practice of histological techniques*, vol. 6, pp. 135–60, 2008.
- [23] S. Mathews, S. Jain, "Anatomy, head and neck, cricoid cartilage," in *StatPearls [Internet]*, StatPearls Publishing, 2019.
- [24] M. Benjamin, E. Evans, "Fibrocartilage.," *Journal of anatomy*, vol. 171, p. 1, 1990.
- [25] D. A. Parry, A. S. Craig, "Growth and development of collagen fibrils in connective tissue," in *Ultrastructure of the connective tissue matrix*, Springer, 1984, pp. 34–64.
- [26] L. Chiu, S. Waldman, *Nanomaterials for cartilage tissue engineering*, 2016.
- [27] J. A. Buckwalter, N. E. Lane, "Athletics and osteoarthritis," *The American journal of sports medicine*, vol. 25, no. 6, pp. 873–881, 1997.
- [28] A. M. Bhosale, J. B. Richardson, "Articular cartilage: Structure, injuries and review of management," *British medical bulletin*, vol. 87, no. 1, pp. 77–95, 2008.
- [29] B. Yue, "Biology of the extracellular matrix: An overview," *Journal of glaucoma*, S20, 2014.
- [30] J. C. Hu, K. A. Athanasiou, "Structure and function of articular cartilage," in *Handbook of histology methods for bone and cartilage*, Springer, 2003, pp. 73–95.

- [31] M. A. Teixeira, M. T. P. Amorim, H. P. Felgueiras, "Poly (vinyl alcohol)-based nanofibrous electrospun scaffolds for tissue engineering applications," *Polymers*, vol. 12, no. 1, p. 7, 2020.
- [32] A. R. Poole, T. Kojima, T. Yasuda, F. Mwale, M. Kobayashi, S. Lavery, "Composition and structure of articular cartilage: A template for tissue repair," *Clinical Orthopaedics and Related Research®*, vol. 391, S26–S33, 2001.
- [33] R. L. Davies, N. J. Kuiper, "Regenerative medicine: A review of the evolution of autologous chondrocyte implantation (aci) therapy," *Bioengineering*, vol. 6, no. 1, p. 22, 2019.
- [34] M. Nazouri, A. Seifzadeh, E. Masaeli, "Characterization of polyvinyl alcohol hydrogels as tissue-engineered cartilage scaffolds using a coupled finite element-optimization algorithm," *Journal of Biomechanics*, vol. 99, p. 109 525, 2020.
- [35] S. Glyn-Jones, A. Palmer, R. Agricola, A. Price, T. Vincent, H. Weinans, A. Carr, "Osteoarthritis," *The Lancet*, vol. 386, no. 9991, pp. 376–387, 2015.
- [36] N. Arden, M. C. Nevitt, "Osteoarthritis: Epidemiology," *Best practice & research Clinical rheumatology*, vol. 20, no. 1, pp. 3–25, 2006.
- [37] M. B. Goldring, M. Otero, "Inflammation in osteoarthritis," *Current opinion in rheumatology*, vol. 23, no. 5, p. 471, 2011.
- [38] G. Li, J. Yin, J. Gao, T. S. Cheng, N. J. Pavlos, C. Zhang, M. H. Zheng, "Subchondral bone in osteoarthritis: Insight into risk factors and microstructural changes," *Arthritis research & therapy*, vol. 15, no. 6, p. 223, 2013.
- [39] C. Buckland-Wright, "Subchondral bone changes in hand and knee osteoarthritis detected by radiography," *Osteoarthritis and cartilage*, vol. 12, pp. 10–19, 2004.
- [40] J. Day, J. Van Der Linden, R. Bank, M. Ding, I. Hvid, D. Sumner, H. Weinans, "Adaptation of subchondral bone in osteoarthritis," *Biorheology*, vol. 41, no. 3-4, pp. 359–368, 2004.
- [41] A. Palmer, C. Brown, E. McNally, A. Price, I. Tracey, P. Jezzard, A. Carr, S. Glyn-Jones, "Non-invasive imaging of cartilage in early osteoarthritis," *The bone & joint journal*, vol. 95, no. 6, pp. 738–746, 2013.
- [42] P. Omoumi, G. A. Mercier, F. Lecouvet, P. Simoni, B. C. V. Berg, "Ct arthrography, mr arthrography, pet, and scintigraphy in osteoarthritis," *Radiologic Clinics*, vol. 47, no. 4, pp. 595–615, 2009.
- [43] W. Van Spil, J. DeGroot, W. Lems, J. Oostveen, F. Lafeber, "Serum and urinary biochemical markers for knee and hip-osteoarthritis: A systematic review applying the consensus biped criteria," *Osteoarthritis and cartilage*, vol. 18, no. 5, pp. 605–612, 2010.
- [44] J. P. Glotzbach, V. W. Wong, G. C. Gurtner, M. T. Longaker, "Regenerative medicine," *Current problems in surgery*, vol. 3, no. 48, pp. 148–212, 2011.
- [45] S. Yi, F. Ding, L. Gong, X. Gu, "Extracellular matrix scaffolds for tissue engineering and regenerative medicine," *Current stem cell research & therapy*, vol. 12, no. 3, pp. 233–246, 2017.

- [46] M. B. Elliott, S. Gerecht, "Three-dimensional culture of small-diameter vascular grafts," *Journal of Materials Chemistry B*, vol. 4, no. 20, pp. 3443–3453, 2016.
- [47] V. E. Santo, M. E. Gomes, J. F. Mano, R. L. Reis, "Chitosan–chondroitin sulphate nanoparticles for controlled delivery of platelet lysates in bone regenerative medicine," *Journal of tissue engineering and regenerative medicine*, vol. 6, no. S3, s47–s59, 2012.
- [48] C.-T. Lee, P.-H. Kung, Y.-D. Lee, "Preparation of poly (vinyl alcohol)-chondroitin sulfate hydrogel as matrices in tissue engineering," *Carbohydrate Polymers*, vol. 61, no. 3, pp. 348–354, 2005.
- [49] E. Huskisson, "Glucosamine and chondroitin for osteoarthritis," *Journal of International Medical Research*, vol. 36, no. 6, pp. 1161–1179, 2008.
- [50] V. Profant, C. Johannessen, E. W. Blanch, P. Bouř, V. Baumruk, "Effects of sulfation and the environment on the structure of chondroitin sulfate studied via raman optical activity," *Physical Chemistry Chemical Physics*, vol. 21, no. 14, pp. 7367–7377, 2019.
- [51] H. Ogawa, S. Hatano, N. Sugiura, N. Nagai, T. Sato, K. Shimizu, K. Kimata, H. Narimatsu, H. Watanabe, "Chondroitin sulfate synthase-2 is necessary for chain extension of chondroitin sulfate but not critical for skeletal development," *PLoS One*, vol. 7, no. 8, e43806, 2012.
- [52] T. Mikami, H. Kitagawa, "Biosynthesis and function of chondroitin sulfate," *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-General Subjects*, vol. 1830, no. 10, pp. 4719–4733, 2013.
- [53] J. Mouw, N. Case, R. Guldberg, A. Plaas, M. Levenston, "Variations in matrix composition and gag fine structure among scaffolds for cartilage tissue engineering," *Osteoarthritis and Cartilage*, vol. 13, no. 9, pp. 828–836, 2005.
- [54] D.-A. Wang, S. Varghese, B. Sharma, I. Strehin, S. Fermanian, J. Gorham, D. H. Fairbrother, B. Cascio, J. H. Elisseeff, "Multifunctional chondroitin sulphate for cartilage tissue–biomaterial integration," *Nature materials*, vol. 6, no. 5, pp. 385–392, 2007.
- [55] C. Schiraldi, D. Cimini, M. De Rosa, "Production of chondroitin sulfate and chondroitin," *Applied microbiology and biotechnology*, vol. 87, no. 4, pp. 1209–1220, 2010.
- [56] M. Vallières, P. Du Souich, "Modulation of inflammation by chondroitin sulfate," *Osteoarthritis and Cartilage*, vol. 18, S1–S6, 2010.
- [57] M. Iovu, G. Dumais, P. Du Souich, "Anti-inflammatory activity of chondroitin sulfate," *Osteoarthritis and cartilage*, vol. 16, S14–S18, 2008.
- [58] V. Dodane, V. D. Vilivalam, "Pharmaceutical applications of chitosan," *Pharmaceutical Science & Technology Today*, vol. 1, no. 6, pp. 246–253, 1998.
- [59] N. Van Toan, T. T. Hanh, "Application of chitosan solutions for rice production in vietnam," *African Journal of Biotechnology*, vol. 12, no. 4, 2013.
- [60] L. S. Nair, C. T. Laurencin, "Biodegradable polymers as biomaterials," *Progress in polymer science*, vol. 32, no. 8-9, pp. 762–798, 2007.

- [61] A. Di Martino, M. Sittinger, M. V. Risbud, "Chitosan: A versatile biopolymer for orthopaedic tissue-engineering," *Biomaterials*, vol. 26, no. 30, pp. 5983–5990, 2005.
- [62] K. S. Soppimath, T. M. Aminabhavi, A. R. Kulkarni, W. E. Rudzinski, "Biodegradable polymeric nanoparticles as drug delivery devices," *Journal of controlled release*, vol. 70, no. 1-2, pp. 1–20, 2001.
- [63] F. C. Adams, C. Barbante, "Nanoscience, nanotechnology and spectrometry," *Spectrochimica Acta Part B: Atomic Spectroscopy*, vol. 86, pp. 3–13, 2013.
- [64] J. Hulla, S. Sahu, A. Hayes, "Nanotechnology: History and future," *Human & experimental toxicology*, vol. 34, no. 12, pp. 1318–1321, 2015.
- [65] X. Cheng, "Nanostructures: Fabrication and applications," in *Nanolithography*, Elsevier, 2014, pp. 348–375.
- [66] M. Nasrollahzadeh, Z. Issaabadi, M. Sajjadi, S. M. Sajadi, M. Atarod, "Types of nanostructures," *Interface science and technology*, vol. 28, pp. 29–80, 2019.
- [67] R. Rauti, M. Musto, S. Bosi, M. Prato, L. Ballerini, "Properties and behavior of carbon nanomaterials when interfacing neuronal cells: How far have we come?" *Carbon*, vol. 143, pp. 430–446, 2019.
- [68] Y. Ju-Nam, J. R. Lead, "Manufactured nanoparticles: An overview of their chemistry, interactions and potential environmental implications," *Science of the total environment*, vol. 400, no. 1-3, pp. 396–414, 2008.
- [69] J. Jeevanandam, A. Barhoum, Y. S. Chan, A. Dufresne, M. K. Danquah, "Review on nanoparticles and nanostructured materials: History, sources, toxicity and regulations," *Beilstein journal of nanotechnology*, vol. 9, no. 1, pp. 1050–1074, 2018.
- [70] M. Masserini, "Nanoparticles for brain drug delivery," *International Scholarly Research Notices*, vol. 2013, 2013.
- [71] S. Bhatia, "Nanoparticles types, classification, characterization, fabrication methods and drug delivery applications," in *Natural polymer drug delivery systems*, Springer, 2016, pp. 33–93.
- [72] I. R. Khalil, A. T. Burns, I. Radecka, M. Kowalczyk, T. Khalaf, G. Adamus, B. Johnston, M. P. Khechara, "Bacterial-derived polymer poly-γ-glutamic acid (γ-pga)-based micro/nanoparticles as a delivery system for antimicrobials and other biomedical applications," *International journal of molecular sciences*, vol. 18, no. 2, p. 313, 2017.
- [73] C. Vauthier, K. Bouchemal, "Methods for the preparation and manufacture of polymeric nanoparticles," *Pharmaceutical research*, vol. 26, no. 5, pp. 1025–1058, 2009.
- [74] Y. Ohya, M. Shiratani, H. Kobayashi, T. Ouchi, "Release behavior of 5-fluorouracil from chitosan-gel nanospheres immobilizing 5-fluorouracil coated with polysaccharides and their cell specific cytotoxicity," *Journal of Macromolecular Science—Pure and Applied Chemistry*, vol. 31, no. 5, pp. 629–642, 1994.
- [75] A. Grenha, "Chitosan nanoparticles: A survey of preparation methods," *Journal of drug targeting*, vol. 20, no. 4, pp. 291–300, 2012.

- [76] U. Perera, N. Rajapakse, "Chitosan nanoparticles: Preparation, characterization, and applications," in *Seafood processing by-products*, Springer, 2014, pp. 371–387.
- [77] W. Tiyafoonchai, "Chitosan nanoparticles: A promising system for drug delivery," *Naresuan University Journal: Science and Technology (NUJST)*, vol. 11, no. 3, pp. 51–66, 2013.
- [78] L.-M. Zhao, L.-E. Shi, Z.-L. Zhang, J.-M. Chen, D.-D. Shi, J. Yang, Z.-X. Tang, "Preparation and application of chitosan nanoparticles and nanofibers," *Brazilian Journal of Chemical Engineering*, vol. 28, no. 3, pp. 353–362, 2011.
- [79] Z.-X. Tang, J.-Q. Qian, L.-E. Shi, "Preparation of chitosan nanoparticles as carrier for immobilized enzyme," *Applied Biochemistry and Biotechnology*, vol. 136, no. 1, pp. 77–96, 2007.
- [80] S. F. Hosseini, M. Zandi, M. Rezaei, F. Farahmandghavi, "Two-step method for encapsulation of oregano essential oil in chitosan nanoparticles: Preparation, characterization and in vitro release study," *Carbohydrate polymers*, vol. 95, no. 1, pp. 50–56, 2013.
- [81] R. Yoksan, J. Jirawutthiwongchai, K. Arpo, "Encapsulation of ascorbyl palmitate in chitosan nanoparticles by oil-in-water emulsion and ionic gelation processes," *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*, vol. 76, no. 1, pp. 292–297, 2010.
- [82] P. Calvo, C. Remunan-Lopez, J. L. Vila-Jato, M. Alonso, "Novel hydrophilic chitosan-polyethylene oxide nanoparticles as protein carriers," *Journal of Applied Polymer Science*, vol. 63, no. 1, pp. 125–132, 1997.
- [83] P. Calvo, C. Remuñan-López, J. L. Vila-Jato, M. J. Alonso, "Chitosan and chitosan/ethylene oxide-propylene oxide block copolymer nanoparticles as novel carriers for proteins and vaccines," *Pharmaceutical research*, vol. 14, no. 10, pp. 1431–1436, 1997.
- [84] W. Fan, W. Yan, Z. Xu, H. Ni, "Formation mechanism of monodisperse, low molecular weight chitosan nanoparticles by ionic gelation technique," *Colloids and surfaces B: Biointerfaces*, vol. 90, pp. 21–27, 2012.
- [85] M. Bodnar, J. F. Hartmann, J. Borbely, "Preparation and characterization of chitosan-based nanoparticles," *Biomacromolecules*, vol. 6, no. 5, pp. 2521–2527, 2005.
- [86] M. Elsabahy, K. L. Wooley, "Design of polymeric nanoparticles for biomedical delivery applications," *Chemical Society Reviews*, vol. 41, no. 7, pp. 2545–2561, 2012.
- [87] A. Vila, A. Sanchez, M. Tobio, P. Calvo, M. Alonso, "Design of biodegradable particles for protein delivery," *Journal of controlled release*, vol. 78, no. 1-3, pp. 15–24, 2002.
- [88] V. Mohanraj, Y. Chen, "Nanoparticles-a review," *Tropical journal of pharmaceutical research*, vol. 5, no. 1, pp. 561–573, 2006.
- [89] S. Derman, A. Katmis, S. Fide, S. Karaismailoglu, "Synthesis and characterization methods of polymeric nanoparticles," *Characterization and Application of Nanomaterials*, vol. 1, no. 4, 2018.

- [90] A. Kumari, S. K. Yadav, S. C. Yadav, "Biodegradable polymeric nanoparticles based drug delivery systems," *Colloids and surfaces B: biointerfaces*, vol. 75, no. 1, pp. 1–18, 2010.
- [91] R. Langer, N. Peppas, "Chemical and physical structure of polymers as carriers for controlled release of bioactive agents: A review," *Journal of Macromolecular Science-Reviews in Macromolecular Chemistry and Physics*, vol. 23, no. 1, pp. 61–126, 1983.
- [92] K. E. Uhrich, S. M. Cannizzaro, R. S. Langer, K. M. Shakesheff, "Polymeric systems for controlled drug release," *Chemical Reviews-Columbus*, vol. 99, no. 11, pp. 3181–3198, 1999.
- [93] P. Bhatt, D. Patel, A. Patel, A. Patel, A. Nagarsheth, "Oral controlled release systems: Current strategies and challenges," in *Novel Drug Delivery Technologies*, Springer, 2019, pp. 73–120.
- [94] S. Dash, P. N. Murthy, L. Nath, P. Chowdhury, *et al.*, "Kinetic modeling on drug release from controlled drug delivery systems," *Acta Pol Pharm*, vol. 67, no. 3, pp. 217–223, 2010.
- [95] J. H. Lee, Y. Yeo, "Controlled drug release from pharmaceutical nanocarriers," *Chemical engineering science*, vol. 125, pp. 75–84, 2015.
- [96] A. K. Bajpai, S. K. Shukla, S. Bhanu, S. Kankane, "Responsive polymers in controlled drug delivery," *Progress in Polymer Science*, vol. 33, no. 11, pp. 1088–1118, 2008.
- [97] S. Sershen, J. West, "Implantable, polymeric systems for modulated drug delivery," *Advanced drug delivery reviews*, vol. 54, no. 9, pp. 1225–1235, 2002.
- [98] N. A. Peppas, A. R. Khare, "Preparation, structure and diffusional behavior of hydrogels in controlled release," *Advanced drug delivery reviews*, vol. 11, no. 1-2, pp. 1–35, 1993.
- [99] S. J. Holland, B. J. Tighe, P. L. Gould, "Polymers for biodegradable medical devices. 1. the potential of polyesters as controlled macromolecular release systems," *Journal of Controlled Release*, vol. 4, no. 3, pp. 155–180, 1986.
- [100] R. Langer, "Invited review polymeric delivery systems for controlled drug release," *Chemical Engineering Communications*, vol. 6, no. 1-3, pp. 1–48, 1980.
- [101] M. A. Obeid, M. M. Al Qaraghuli, M. Alsaadi, A. R. Alzahrani, K. Niwasabutra, V. A. Ferro, "Delivering natural products and biotherapeutics to improve drug efficacy," *Therapeutic delivery*, vol. 8, no. 11, pp. 947–956, 2017.
- [102] I.-S. Kim, S.-H. Kim, "Development of a polymeric nanoparticulate drug delivery system: In vitro characterization of nanoparticles based on sugar-containing conjugates," *International journal of pharmaceuticals*, vol. 245, no. 1-2, pp. 67–73, 2002.
- [103] B. Kumar, K. Jalodia, P. Kumar, H. K. Gautam, "Recent advances in nanoparticle-mediated drug delivery," *Journal of Drug Delivery Science and Technology*, vol. 41, pp. 260–268, 2017.

- [104] J. McMillan, E. Batrakova, H. E. Gendelman, "Cell delivery of therapeutic nanoparticles," *Progress in molecular biology and translational science*, vol. 104, pp. 563–601, 2011.
- [105] A. Prokop, J. M. Davidson, "Nanovehicular intracellular delivery systems," *Journal of pharmaceutical sciences*, vol. 97, no. 9, pp. 3518–3590, 2008.
- [106] S. A. Rizvi, A. M. Saleh, "Applications of nanoparticle systems in drug delivery technology," *Saudi Pharmaceutical Journal*, vol. 26, no. 1, pp. 64–70, 2018.
- [107] T. Nagaoka, A. H. Banskota, Y. Tezuka, K. Midorikawa, K. Matsushige, S. Kadota, "Caffeic acid phenethyl ester (cafe) analogues: Potent nitric oxide inhibitors from the netherlands propolis," *Biological and pharmaceutical bulletin*, vol. 26, no. 4, pp. 487–491, 2003.
- [108] S. Derman, "Caffeic acid phenethyl ester loaded plga nanoparticles: Effect of various process parameters on reaction yield, encapsulation efficiency, and particle size," *Journal of Nanomaterials*, vol. 2015, 2015.
- [109] K. Nakamura, T. Nakajima, T. Aoyama, S. Okitsu, M. Koyama, "One-pot esterification and amidation of phenolic acids," *Tetrahedron*, vol. 70, no. 43, pp. 8097–8107, 2014.
- [110] T. Arasoğlu, S. Derman, "Assessment of the antigenotoxic activity of poly (d, l-lactic-co-glycolic acid) nanoparticles loaded with caffeic acid phenethyl ester using the ames salmonella/microsome assay," *Journal of agricultural and food chemistry*, vol. 66, no. 24, pp. 6196–6204, 2018.
- [111] T. Arasoglu, S. Derman, B. Mansuroglu, "Comparative evaluation of antibacterial activity of caffeic acid phenethyl ester and plga nanoparticle formulation by different methods," *Nanotechnology*, vol. 27, no. 2, p. 025 103, 2015.
- [112] H.-H. Perkampus, *UV-VIS Spectroscopy and its Applications*. Springer Science & Business Media, 2013.
- [113] J. Stetefeld, S. A. McKenna, T. R. Patel, "Dynamic light scattering: A practical guide and applications in biomedical sciences," *Biophysical reviews*, vol. 8, no. 4, pp. 409–427, 2016.
- [114] Z. Movasaghi, S. Rehman, D. I. ur Rehman, "Fourier transform infrared (ftir) spectroscopy of biological tissues," *Applied Spectroscopy Reviews*, vol. 43, no. 2, pp. 134–179, 2008.
- [115] K. Vernon-Parry, "Scanning electron microscopy: An introduction," *III-Vs Review*, vol. 13, no. 4, pp. 40–44, 2000.
- [116] C. Peniche, M. Fernández, G. Rodriguez, J. Parra, J. Jimenez, A. L. Bravo, D. Gómez, J. San Román, "Cell supports of chitosan/hyaluronic acid and chondroitin sulphate systems. morphology and biological behaviour," *Journal of Materials Science: Materials in Medicine*, vol. 18, no. 9, pp. 1719–1726, 2007.
- [117] Y. Hu, J. Chen, T. Fan, Y. Zhang, Y. Zhao, X. Shi, Q. Zhang, "Biomimetic mineralized hierarchical hybrid scaffolds based on in situ synthesis of nano-hydroxyapatite/chitosan/chondroitin sulfate/hyaluronic acid for bone tissue engineering," *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*, vol. 157, pp. 93–100, 2017.

- [118] S. Azizian, A. Hadjizadeh, H. Niknejad, "Chitosan-gelatin porous scaffold incorporated with chitosan nanoparticles for growth factor delivery in tissue engineering," *Carbohydrate polymers*, vol. 202, pp. 315–322, 2018.
- [119] N. Cui, J. Qian, T. Liu, N. Zhao, H. Wang, "Hyaluronic acid hydrogel scaffolds with a triple degradation behavior for bone tissue engineering," *Carbohydrate polymers*, vol. 126, pp. 192–198, 2015.
- [120] S. Saravanan, S. Nethala, S. Pattnaik, A. Tripathi, A. Moorthi, N. Selvamurugan, "Preparation, characterization and antimicrobial activity of a bio-composite scaffold containing chitosan/nano-hydroxyapatite/nano-silver for bone tissue engineering," *International journal of biological macromolecules*, vol. 49, no. 2, pp. 188–193, 2011.
- [121] R. A.-B. Sanad, H. M. Abdel-Bar, "Chitosan–hyaluronic acid composite sponge scaffold enriched with andrographolide-loaded lipid nanoparticles for enhanced wound healing," *Carbohydrate polymers*, vol. 173, pp. 441–450, 2017.
- [122] K. Nazemi, P. Azadpour, F. Moztarzadeh, A. Urbanska, M. Mozafari, "Tissue-engineered chitosan/bioactive glass bone scaffolds integrated with plga nanoparticles: A therapeutic design for on-demand drug delivery," *Materials Letters*, vol. 138, pp. 16–20, 2015.
- [123] A. Neamnark, N. Sanchavanakit, P. Pavasant, T. Bunaprasert, P. Supaphol, R. Rujiravanit, "In vitro biocompatibility evaluations of hexanoyl chitosan film," *Carbohydrate Polymers*, vol. 68, no. 1, pp. 166–172, 2007.
- [124] D. Algul, H. Sipahi, A. Aydin, F. Kelleci, S. Ozdatli, F. G. Yener, "Biocompatibility of biomimetic multilayered alginate–chitosan/ β -tcp scaffold for osteochondral tissue," *International journal of biological macromolecules*, vol. 79, pp. 363–369, 2015.
- [125] M. Bayindir Bilgic, N. T. Lacin, H. Berber, B. Mansuroglu, "In vitro evaluation of alpha-tocopherol loaded carboxymethylcellulose chitosan copolymers as wound dressing materials," *Materials Technology*, vol. 34, no. 7, pp. 386–393, 2019.
- [126] G. Ajmal, G. V. Bonde, S. Thokala, P. Mittal, G. Khan, J. Singh, V. K. Pandey, B. Mishra, "Ciprofloxacin hcl and quercetin functionalized electrospun nanofiber membrane: Fabrication and its evaluation in full thickness wound healing," *Artificial cells, nanomedicine, and biotechnology*, vol. 47, no. 1, pp. 228–240, 2019.
- [127] M. A. Kalam, A. A. Khan, S. Khan, A. Almalik, A. Alshamsan, "Optimizing indomethacin-loaded chitosan nanoparticle size, encapsulation, and release using box–behnken experimental design," *International journal of biological macromolecules*, vol. 87, pp. 329–340, 2016.
- [128] N. Buyuk, P. Arayici, S. DERMAN, Z. Mustafaeva, S. Yucel, "Synthesis of chitosan nanoparticles for controlled release of amiodarone," *Indian Journal of Pharmaceutical Sciences*, vol. 82, no. 1, pp. 131–138, 2020.
- [129] L. Qi, Z. Xu, X. Jiang, C. Hu, X. Zou, "Preparation and antibacterial activity of chitosan nanoparticles," *Carbohydrate research*, vol. 339, no. 16, pp. 2693–2700, 2004.

- [130] B. Hu, C. Pan, Y. Sun, Z. Hou, H. Ye, B. Hu, X. Zeng, "Optimization of fabrication parameters to produce chitosan- tripolyphosphate nanoparticles for delivery of tea catechins," *Journal of agricultural and food chemistry*, vol. 56, no. 16, pp. 7451–7458, 2008.
- [131] S. A. Loutfy, H. M. A. El-Din, M. H. Elberry, N. G. Allam, M. Hasanin, A. M. Abdellah, "Synthesis, characterization and cytotoxic evaluation of chitosan nanoparticles: In vitro liver cancer model," *Advances in Natural Sciences: Nanoscience and Nanotechnology*, vol. 7, no. 3, p. 035 008, 2016.
- [132] E. M. P. Garrido, A. S. Cerqueira, D. Chavarria, T. Silva, F. Borges, J. M. Garrido, "Microencapsulation of caffeic acid phenethyl ester and caffeic acid phenethyl amide by inclusion in hydroxypropyl- β -cyclodextrin," *Food chemistry*, vol. 254, pp. 260–265, 2018.
- [133] X. Wei, J. Dai, Y. Zhong, D. Zhang, L. Liu, L. Wang, Y. Huang, P. Chen, Z. Zhou, X. Chen, *et al.*, "Caffeic acid phenethyl ester loaded in nano-targeted delivery system with casein: Physicochemical characterization, in vitro release, and binding mechanisms," *LWT*, p. 111 938, 2021.
- [134] B. N. Singh, V. Veeresh, S. P. Mallick, Y. Jain, S. Sinha, A. Rastogi, P. Srivastava, "Design and evaluation of chitosan/chondroitin sulfate/nano-bioglass based composite scaffold for bone tissue engineering," *International journal of biological macromolecules*, vol. 133, pp. 817–830, 2019.
- [135] S. Sharma, K. L. Swetha, A. Roy, "Chitosan-chondroitin sulfate based polyelectrolyte complex for effective management of chronic wounds," *International journal of biological macromolecules*, vol. 132, pp. 97–108, 2019.
- [136] W. Sui, L. Huang, J. Wang, Q. Bo, "Preparation and properties of chitosan chondroitin sulfate complex microcapsules," *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*, vol. 65, no. 1, pp. 69–73, 2008.
- [137] A. Hasan, G. Waibhaw, V. Saxena, L. M. Pandey, "Nano-biocomposite scaffolds of chitosan, carboxymethyl cellulose and silver nanoparticle modified cellulose nanowhiskers for bone tissue engineering applications," *International journal of biological macromolecules*, vol. 111, pp. 923–934, 2018.
- [138] K. Maji, S. Dasgupta, K. Pramanik, A. Bissoyi, "Preparation and evaluation of gelatin-chitosan-nanobioglass 3d porous scaffold for bone tissue engineering," *International journal of biomaterials*, vol. 2016, 2016.
- [139] C. Nugraha, M. Bora, S. S. Venkatraman, "Release retardation of model protein on polyelectrolyte-coated plga nano-and microparticles," *PloS one*, vol. 9, no. 3, e92393, 2014.
- [140] R. A. Siegel, R. Langer, "Mechanistic studies of macromolecular drug release from macroporous polymers. II. models for the slow kinetics of drug release," *Journal of Controlled Release*, vol. 14, no. 2, pp. 153–167, 1990.
- [141] P. J. VandeVord, H. W. Matthew, S. P. DeSilva, L. Mayton, B. Wu, P. H. Wooley, "Evaluation of the biocompatibility of a chitosan scaffold in mice," *Journal of Biomedical Materials Research: An Official Journal of The Society for Biomaterials, The Japanese Society for Biomaterials, and The Australian Society for Biomaterials and the Korean Society for Biomaterials*, vol. 59, no. 3, pp. 585–590, 2002.

- [142] H. H. Xu, C. G. Simon Jr, "Fast setting calcium phosphate–chitosan scaffold: Mechanical properties and biocompatibility," *Biomaterials*, vol. 26, no. 12, pp. 1337–1348, 2005.
- [143] H. J. Chun, G.-W. Kim, C.-H. Kim, "Fabrication of porous chitosan scaffold in order to improve biocompatibility," *Journal of Physics and Chemistry of Solids*, vol. 69, no. 5-6, pp. 1573–1576, 2008.
- [144] N. Liang, D. D. Kitts, "Antioxidant property of coffee components: Assessment of methods that define mechanisms of action," *Molecules*, vol. 19, no. 11, pp. 19180–19208, 2014.
- [145] G. Campo, A. Avenoso, S. Campo, A. Ferlazzo, A. Calatroni, "Antioxidant activity of chondroitin sulfate," *Advances in pharmacology*, vol. 53, pp. 417–431, 2006.
- [146] W. Xie, P. Xu, Q. Liu, "Antioxidant activity of water-soluble chitosan derivatives," *Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters*, vol. 11, no. 13, pp. 1699–1701, 2001.

TEZDEN ÜRETİLMİŞ YAYINLAR

Konferans Bildirisi

1. Ekin Bahar Gezer, Serap Derman-3rd International Eurasian Conference on Biological and Chemical Sciences (EurasianBioChem 2020) March 19-20, 2020 / Ankara, Turkey

