

β -ESTRADIOL YÜKLÜ DOKU İSKELELERİ İLE İN-VİTRO KEMİK DOKU MÜHENDİSLİĞİ

IN-VITRO BONE TISSUE ENGINEERING WITH β -ESTRADIOL LOADED SCAFFOLDS

GÜLSEREN IRMAK

Hacettepe Üniversitesi

Lisansüstü Eğitim - Öğretim ve Sınav Yönetmeliğinin

Biyomühendislik Anabilim Dalı İçin Öngördüğü

YÜKSEK LİSANS TEZİ

olarak hazırlanmıştır.

2013

Fen Bilimleri Enstitüsü Müdürlüğü'ne,

Bu çalışma jürimiz tarafından **BİYOMÜHENDİSLİK ANABİLİM DALI** 'nda **YÜKSEK LİSANS TEZİ** olarak kabul edilmiştir.

Başkan :.....
Prof. Dr. Mehlika PULAT

Üye (Danışman) :.....
Prof. Dr. Menemşe GÜMÜŞDERELİOĞLU

Üye :.....
Prof. Dr. Zümriye AKSU

Üye :.....
Prof. Dr. Adil DENİZLİ

Üye :.....
Yrd. Doç. Dr. Ayşe KARAKEÇİLİ

ONAY

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

Prof. Dr. Fatma SEVİN DÜZ
Fen Bilimleri Enstitüsü Müdürü

β-ESTRADIOL YÜKLÜ DOKU İSKELELERİ İLE İN-VİTRO KEMİK DOKU MÜHENDİSLİĞİ

Gülseren IRMAK

ÖZ

Sunulan tez çalışmasında, kemik doku rejenerasyonuna yönelik olarak 17-β estradiol (E2) yüklü poli (laktik-ko-glikolik asit) PLGA nanopartikül-kitosan/HA doku iskelesi sistemi geliştirilmesi ve oluşturulan sistemin in-vitro etkinliğinin adipoz kökenli mezenkimal kök hücre (AdMSC) kültürlerinde araştırılması amaçlanmıştır.

Tez çalışmasının ilk aşamasında farklı poli-laktik asit/poli-glikolik asit (PLA/PGA) (50:50 ve 65:35) bileşimlerine sahip PLGA kopolimerlerinden, boş ve 17-β estradiol yüklü nanopartiküller, emülsiyon-çözücü-buharlaştırma yöntemi ile hazırlanmıştır. Nanopartiküllerin karakterizasyonu sonucu, boş ve E2 yüklü partikül büyüklüklerinin sırasıyla yaklaşık 200 ve 241 nm olduğu saptanmıştır. Üretilen nanopartiküllerin E2 enkapsülasyon verimlerinin, 50:50 PLGA için %29 ve 65:35 PLGA için ise % 52 olduğu HPLC ve UV spektrofotometre ölçümlerinden hesaplanmış ve en uygun taşıyıcı sistemin 65:35 PLGA nanopartiküllerle oluşturulabildiği belirlenmiştir. Nanopartiküllerden salım çalışması 40 gün sürdürülmüş ve nanopartiküllere yüklenen E2'nin % 45'inin salındığı saptanmıştır.

İçsel bağlantılı ve makrogözenekli kitosan/hidroksiapatit (HA) süpergözenekli doku iskeleleri, gaz köpükleştirme tekniği ve mikrodalga ısıma ile çapraz-bağlama yöntemi bir araya getirilerek sentezlenmiştir. Sulu fazda bulunan E2 yüklü PLGA nanopartiküller, kitosan/HA doku iskelelerine, önceden hazırlanmış iskelelere emdirilerek ve iskele üretimi sırasında kitosan çözeltisine katılarak olmak üzere iki şekilde yüklenmiştir. Ticari olarak bulunan suda çözünür E2 de doku iskelelerine emdirilerek yüklenmiştir. SEM (taramalı elektron mikroskobu) ve FTIR (Fourier dönüşümlü kızılötesi spektroskopisi) analizleri ile PLGA nanopartiküllerin her iki yöntemle de doku iskelesi yapısına başarıyla katıldıkları gözlenmiştir.

Nanopartiküllerin emdirilmesiyle hazırlanan doku iskelelerinden salım çalışması 55 gün sürmüştür ve 17-β estradiol'ün %100'ünün salındığı kümülatif salım profilinden belirlenmiştir. Nanopartiküllerin doku iskelesi üretimi aşamasında yüklendiği durumda ise salım 135 gün sürmüştür ve sistemden 17-β estradiol'ün % 92'sinin salındığı belirlenmiştir. Suda çözünür E2 yüklü doku iskelesinden yapılan salım çalışmasında E2'nin 8 günde % 80'i salınmıştır.

Tezin son aşamasında, E2 içeren PLGA nanopartikül-kitosan/HA doku iskelesi sisteminin osteojenik aktivitesi AdMSC'ler kullanılarak in-vitro koşullarda hücre kültürü çalışmaları ile incelenmiştir. Doku iskelelerinde hücre üremesi MTT (3-[4,5-dimetiltiazol-2-il]-2,5-difeniltetrazolyum bromür) analizi ile hücrelerin doku iskelesi içerisindeki morfolojileri ise SEM ile belirlenmiştir. Erken dönem osteojenik farklılaşma, ALP(alkalen fosfataz) aktivitesinin ölçümü ile belirlenmiştir. RT-PCR (gerçek zamanlı polimeraz zincir reaksiyonu) ile AdMSC'lerin kollajen I, osteokalsin, ve β-aktin ekspresyon seviyeleri tespit edilmiştir. Analiz sonuçlarına göre nanopartikül yüklü grupların, AdMSC hücrelerinin osteojenik farklılaşmasını

ve matris mineralizasyonunu diğer gruplara göre daha fazla desteklediği görülmüştür.

Sonuçlar 17- β estradiol yüklü PLGA nanopartikül-kitosan/HA doku iskelesi sisteminin 17- β estradiol'ün kontrollü ve uzun dönemde salımını sağladığını göstermektedir. Ayrıca, hazırlanan sistem, AdMSC'lerin üremesini ve osteojenik farklılaşmasını önemli ölçüde arttırdığı için kemik doku rejenerasyonu için değerlendirilebilir.

Anahtar Kelimeler: 17- β estradiol, poli (laktik-ko-glikolik asit) (PLGA), nanopartikül, kontrollü salım, adipoz kökenli kök hücre (AdMSC), kemik doku mühendisliği.

Danışman: Prof.Dr. Menemşe GÜMÜŞDERELİOĞLU, Hacettepe Üniversitesi,

Kimya Mühendisliği / Biyomühendislik Anabilim Dalı.

IN-VITRO BONE TISSUE ENGINEERING WITH β -ESTRADIOL LOADED SCAFFOLDS

Gülseren IRMAK

ABSTRACT

The aim of the present study was to develop a system of 17- β estradiol (E2) loaded poly (lactic-co-glycolic acid) PLGA nanoparticles-chitosan/hydroxyapatite (HA) tissue scaffold and to investigate the in-vitro effectiveness of this system in adipose derived mesenchymal stem cell (AdMSC) cultures for bone tissue regeneration.

In the first part of the study, free and 17- β estradiol loaded PLGA nanoparticles were prepared from different compositions of PLA/PGA (50:50 and 65:35) by using emulsion-solvent evaporation technique. Characterization studies showed that free and 17- β estradiol loaded particle sizes were approximately 200 nm and 240 nm, respectively. Encapsulation efficiency of nanoparticles was calculated as 29% and 52% for 50:50 PLGA and 65:35 PLGA, respectively by using UV spectrophotometer and HPLC. Accordingly, 65:35 PLGA nanoparticles were selected as optimum carrier system. Release study from nanoparticles was continued up to 40 days and cumulative release (%) of 17- β estradiol from nanoparticles was determined as 45 %.

Interconnected and macroporous chitosan/ HA superporous tissue scaffolds were synthesized by combining microwave irradiation and gas foaming techniques. PLGA nanoparticles in the aqueous phase were loaded into the chitosan/HA scaffolds by two ways i.e. during manufacturing by stirring and after manufacturing by embedding. In addition, water soluble E2 that available as commercial was loaded into the chitosan/HA scaffolds by embedding. SEM (scanning electron microscope) and FTIR (Fourier transform infrared spectroscopy) analysis observed that PLGA nanoparticles were successfully loaded into the chitosan/HA scaffolds.

In-vitro release studies indicated that 100 % of 17- β estradiol was released from the scaffolds loaded with PLGA nanoparticles by embedding, during 55 days. While the 92 % of the 17- β estradiol was releasing during 135 days from chitosan/HA scaffolds that was containing PLGA nanoparticles loaded by scaffold fabrication, 80 % of water-soluble E2 was released from scaffolds in 8 days.

In the last part of the study, osteogenic activities of E2 loaded PLGA nanoparticles-chitosan/HA tissue scaffold were determined in-vitro cell culture studies by using AdMSCs. Cell viability and proliferation were analyzed by MTT (3-[4,5-dimethylthiazoyl-2-yl]-2,5-diphenyltetrazolium bromide) assay and morphological examination was performed with SEM. Early cell differentiation was quantified by the determination of ALP (alkaline phosphatase) activity. Collagen I, osteocalcin and β -actin expression levels were determined using RT-PCR (real time polymerase chain reaction). According to the results, it was observed that

nanoparticle loaded systems supported the osteogenic differentiation of AdMSCs and extracellular matrix mineralization much more than other scaffolds.

The results indicate that the system of 17- β estradiol loaded PLGA nanoparticles-chitosan/HA tissue scaffolds provides controlled and long term release of 17- β estradiol. Also this system significantly enhanced proliferation and osteogenic differentiation of AdMSCs.

Keywords: 17- β estradiol, poly (lactic-co-glycolic acid) (PLGA), nanoparticle, controlled release, adipose derived mesenchymal stem cell, bone tissue engineering.

Advisor: Prof.Dr. Menemşe GÜMÜŞDERELİOĞLU, Hacettepe University,

Chemical Engineering / Bioengineering Department

TEŞEKKÜR

Tez çalışmalarımın yürütülmesi ve sonuçlandırılması için engin bilgi ve tecrübeleriyle desteğini hiçbir zaman esirgemeyen, disiplinli çalışması ve yol göstericiliğiyle her zaman örnek alacağım çok değerli hocam Prof. Dr. Menemşe Gümüşderelioğlu'na, verdiği cesaret ve sağladığı olanaklar için saygı ve teşekkürlerimi sunarım.

Çalışmaların tüm aşamasına çok büyük emeği olan, bilgi ve tecrübelerini paylaşarak her zaman yanımda olan, dostluğu, samimiyeti ve verdiği umut ışığı ile yolumu aydınlatan sevgili Tuğrul Tolga Demirtaş'a sevgi ve teşekkürlerimi sunarım. Çalışmalarımda özveri ve disipliniyle çok büyük emeği olan, tecrübeleri ve desteğiyle hep yanımda olduğunu bildiğim değerli arkadaşım Araş. Gör. Damla Çetin Altındal'a en içten teşekkürlerimi sunarım.

Salım çalışmalarımın bir bölümünde laboratuvarlarını kullanmama izin vererek tezime katkı sağlayan değerli hocam Prof. Dr. Adil Denizli ve öğrencilerine teşekkürlerimi sunarım.

Yüksek lisans hayatım boyunca içten dostluğuyla hep yanımda olan, zor anlarımda kapısını çekinmeden çalabildiğim, hayatımda hep ayrı bir yeri olacak olan dostum Nazife Ülker'e sevgi ve teşekkürlerimi sunarım.

Laboratuvar çalışmalarım sırasında bilgi ve tecrübeleriyle, dostlukları ve destekleriyle hep yanımda olduklarını bildiğim sevgili sıra arkadaşlarım Anıl S. Çakmak ve eşi Araş. Gör. Soner Çakmak'a teşekkürlerimi sunarım.

Hücre karakterizasyon çalışmaları ile tezime katkıda bulunan, bilgi ve tecrübelerini paylaşan, içtenliği ve destekleriyle yanımda olan sevgili arkadaşım Araş. Gör. Işıl Gerçek Beşkardeş'e teşekkür ederim.

Laboratuvar arkadaşlarım Murat Şimşek'e, Suna Sop'a, Araş. Gör. Merve Çapkın Yurtsever'e, Müşra Zeren'e, Pınar Türkyılmaz'a, Ekin Ö. Tunçay'a ve Gökçe Kaynak'a teşekkürlerimi sunarım.

Kararlarımı her zaman destekleyerek bana olan güvenlerini, sevgilerini ve aile kavramının sıcaklığını bana hep hissettiren canım aileme çok teşekkür ederim.

İÇİNDEKİLER DİZİNİ

ÖZ	i
TEŞEKKÜR.....	v
İÇİNDEKİLER DİZİNİ	vi
ŞEKİLLER DİZİNİ	x
ÇİZELGELER DİZİNİ	xiv
SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ.....	xv
1. GİRİŞ VE ÇALIŞMANIN AMACI.....	1
2. GENEL BİLGİLER	5
2.1. Doku Mühendisliği.....	5
2.2. Kemik Doku Mühendisliği	5
2.2.1. Kemik yapısı ve özellikleri	5
2.2.2. Kemik doku mühendisliği yaklaşımı	8
2.2.3. Kemik doku mühendisliğinde doku iskeleleri.....	9
2.2.3.1. Doku iskelelerinin genel özellikleri	9
2.2.3.2 Kemik doku mühendisliğinde kullanılan biyomalzemeler.....	10
2.2.4. Kemik doku mühendisliğinde kullanılan hücreler	11
2.2.4.1. Kök hücreler	11
Mezenkimal kök hücreler	12
<i>Adipoz kökenli mezenkimal kök hücreler</i>	14
2.2.5 Kemik doku mühendisliğinde kullanılan biyosinyal moleküller	15
2.3 Östrojen.....	18
2.3.1. Östrojen reseptörleri	19
2.3.1.1. Östrojen reseptör sinyalinin mekanizmaları	19

Östrojen cevap elementi (ERE) bağımlı genomik mekanizma (klasik mekanizma)	20
ERE bağımsız genomik mekanizma	21
Östrojenin genomik olmayan etki mekanizması	22
2.3.2. Östrojenin vücuttaki etkileri	22
2.3.2.1. Östrojenin kemik doku üzerindeki etkileri	23
Östrojenin kemik yapımı üzerindeki etkileri	24
Östrojenin kemik yıkımı üzerindeki etkileri	25
2.3.3. Östrojenin kök hücreler üzerindeki etkisi	27
2.4. Nanopartiküller	27
2.4.1. Nanopartikül üretim yöntemleri	29
2.4.1.1. Emülsiyon-çözücü buharlaştırma yöntemi	29
2.4.1.2. Polimerizasyon yöntemi	29
2.4.1.3. İyonik jelleşme yöntemi	29
2.4.1.5. Süperkritik akışkan yöntemi	30
2.4.2. Nanopartikül üretiminde kullanılan polimerler	31
2.4.2.1. Poli (laktik-ko-glikolik-asit) PLGA	31
2.4.3. PLGA nanopartiküllerden salım mekanizması	33
2.4.4. Nanopartiküllerin biyomedikal uygulamaları	34
3. DENEYSEL ÇALIŞMALAR	35
3.1 Malzemeler	35
3.2. 17-β Estradiol Yüklü PLGA Nanopartiküllerin Hazırlanması	36
3.2.1. PLGA nanopartiküllerin sentezi	36
3.2.2. PLGA nanopartiküllere 17-β estradiol yüklenmesi	36
3.3. PLGA Nanopartiküllerinin Karakterizasyon Çalışmaları	36
3.3.1. Partikül boyutunun belirlenmesi	36
3.3.2. FTIR analizi	37
3.3.3. Taramalı elektron mikroskop (SEM) analizi	37
3.3.4 Geçirimli elektron mikroskobu (TEM) analizi	37
3.3.5. 17-β estradiol enkapsülasyon veriminin belirlenmesi	37

3.4. PLGA Nanopartikül İçeren ve İçermeyen (Boş) Kitosan/Hidroksiapatit Süpergözenekli Doku İskelelerinin Sentezi ve Karakterizasyonu	38
3.4.1 Kitosan/hidroksiapatit süpergözenekli doku iskelesi sentezi ve karakterizasyonu.....	38
3.4.2. PLGA nanopartikül içeren kitosan doku iskelesi sentezi ve karakterizasyonu.....	39
3.4.2.1. FTIR analizi	39
3.4.2.2. SEM analizi	39
3.5. Salım Sistemlerinin Hazırlanması	40
3.6. Hücre Kültür Çalışmaları.....	40
3.6.1. Hücre kültür koşulları	41
3.6.2. MTT analizi	42
3.6.3. Taramalı elektron mikroskop (SEM) analizi.....	43
3.6.4. ALP aktivitesinin tayini	43
3.6.5. Gerçek zamanlı polimeraz zincir reaksiyonu (RT-PCR) analizleri.....	44
3.6.6. İstatiksel analiz.....	45
4. DENEYSEL SONUÇLAR VE TARTIŞMALAR	46
4.1. PLGA Nanopartiküllerin Hazırlanması	46
4.2. PLGA Nanopartiküllerin Karakterizasyonu	48
4.2.1. Boy ve boy dağılımı	48
4.2.2. FTIR analizi.....	49
4.2.3. SEM ve TEM analizi.....	50
4.2.4. 17-β estradiol enkapsülasyon veriminin hesaplaması	51
4.3. Kitosan/ Hidroksiapatit (HA) Süpergözenekli Doku İskelelerinin Üretimi	53
4.4. PLGA Nanopartikül Yüklü Kitosan/HA Doku İskeleleri	56
4.4.1. Nanopartiküllerin doku iskelesine yüklenmesi	56
4.4.2. PLGA nanopartikül yüklü doku İskelelerinin karakterizasyon çalışmaları	56
4.4.2.1. SEM analizi	56
4.4.2.2. FTIR analizi	58

4.5. İn-Vitro Salım Çalışmaları	60
4.5.1. PLGA nanopartiküllerden 17- β estradiol salımı.....	60
4.5.2. PLGA nanopartikül yüklü doku iskelelerinden salım çalışmaları	61
4.5.3. Kitosan doku iskelelerine yüklenen suda çözünür formda 17- β estradiol salımı	64
4.6. Hücre Kültür Çalışmaları.....	66
4.6.1. Adipoz kökenli mezenkimal kök hücrelerin karakteristikleri.....	66
4.6.2. MTT analizi	68
4.6.3. Taramalı elektron mikroskop (SEM) analizi.....	71
4.6.4. ALP aktivitesi	76
4.6.5. Gerçek zamanlı polimeraz zincir reaksiyonu (RT-PCR) analizleri.....	78
5. GENEL SONUÇLAR.....	82
6.KAYNAKLAR DİZİNİ	86
7.EKLER	93

ŞEKİLLER DİZİNİ

Şekil 2.1. Kemik doku yapısı	7
Şekil 2.2. Kemik doku mühendisliği yaklaşımı.	9
Şekil 2.3. Mezenkimal kök hücrelerin farklılaşma potansiyelleri.	13
Şekil 2.4. Hücre ile yalın ve immobilize olmuş biyosinyal molekülü arasındaki etkileşimin şematik gösterimi (Ito, 1998).....	17
Şekil 2.5. İmmobilize edilen ve çözünen biyosinyalin hücredeki aktivasyon sürelerinin karşılaştırılması.	17
Şekil 2.6. 17- β estradiol, estron ve estriol'ün kimyasal yapıları.	19
Şekil 2.7. ER sinyal mekanizmalarının şematik gösterimi.: 1) genomik mekanizma 2) ERE bağımsız genomik mekanizma 3) genomik olmayan mekanizma; büyüme faktörü aracılığıyla aktifleşen protein kinaz kaskatı fosforilasyonu başlatır ve çekirdekte ERE bölgesine yerleşmiş olan ER'nin aktivasyonu başlatılır 4) genomik olmayan mekanizma; E2-ER kompleksi, protein-kinaz kaskatlarının aktivasyonunu sağlar ve sitoplazmadaki proteinlerin fonksiyonunun değişmesine neden olur (Björnström ve Sjöberg, 2005).	20
Şekil 2.8. ER tarafından gen transaktivasyonunun mekanizması (Osborne, 2000).	21
Şekil 2.9. Östrojenin kemik hücreleri üzerindeki etki mekanizmaları.	24
Şekil 2.10. Kemik mikroçevresinde osteoklast fonksiyonunu düzenleyen temel sitokinler. Uyaran faktörler turuncu, inhibe edici faktörler mavi renkle belirtilmiştir. Östrojenin düzenleyici proteinler üzerindeki pozitif (+) ve negatif (-) etkisi kırmızı renkle gösterilmiştir. Büyük çerçeve içinde TNF α ve RANKL' nin ayrı ayrı reseptörleri ile etkileşimi ve sonuçta her ikisinin de NF- κ B ve JNK hücre içi sinyal yolağını aktive etmesi gösterilmektedir. GM-CSF: granülosit makrofaj-koloni-uyarıcı faktör (Riggs B., 2000).	26

Şekil 2.11. Nanopartiküllerin şematik gösterimi.: a) nanoküre, b) nanokapsül (Soppimath et al., 2001).	28
Şekil 2.12. Glikolitin halka açılma polimerizasyonu ile PGA sentezi.	31
Şekil 2.13. PGA, PLA ve PLGA'nın kimyasal yapıları.	32
Şekil 2.14. Nanopartiküllerden salım mekanizmasının şematik gösterimi.: A) Biyoaktif ajan ile birleştirilen polimerik nanopartikül salım ortamı ile etkileştiriliyor B) ortam sıvısı polimerik matrise difüze oluyor ve matrisin şişmesine neden oluyor, C) matris içine giren ortam sıvısı, difüzyon kanalları oluşturuyor ve D) malzemenin bozunmasıyla birlikte sistem yok olmaya başlıyor.	33
Şekil 4.1. Nanopartikül üretiminde kullanılan malzemelere ve nanopartiküllere ait FTIR spektrumları. a) PLGA nanopartikül; b) E2 yüklü PLGA nanopartikül; c) DMAB; d) PLGA polimeri.	50
Şekil 4.2. 65:35 bileşimine sahip a) boş (X40.000) ve b) 17- β estradiol yüklü PLGA nanopartiküllerin (X50.000) SEM görüntüleri.	51
Şekil 4.3. 65:35 bileşimine sahip PLGA nanopartiküllerin TEM fotoğrafı (Bar:500nm).	51
Şekil 4.4. Kitosan/HA doku iskelelerinin a) distile su içindeki görüntüleri b) doku iskelesinin kuru haldeki (sol), şişme sonrası (sağ) görüntüsü c) SEM fotoğrafı (x100).	55
Şekil 4.5. 17- β estradiol içeren 65:35 PLGA nanopartiküllerin emdirilerek yüklendiği doku iskelelerinin farklı büyütme ölçeklerindeki SEM görüntüleri: a) X100, b) X20, 000.	57
Şekil 4.6. 17- β estradiol içeren 65:35 PLGA nanopartiküllerin yapıya jelleşme aşamasında katılarak yüklendiği doku iskelelerinin farklı büyütme ölçeklerindeki SEM görüntüleri: a) X100, b) X10, 000, c) X20, 000. Nanopartiküllerin dağılımı ok ile gösterilmiştir.	57
Şekil 4.7. Nanopartikül içeren ve içermeyen kitosan doku iskelelerine ait FTIR spektrumları. a) Boş kitosan/HA doku iskelesi, b) PLGA nanopartikül emdirilen	

kitosan/HA doku iskelesi, c) Nanopartikül üretim aşamasında yüklenmiş kitosan/HA doku iskelesi.....	59
Şekil 4.8. 65:35 bileşimine sahip PLGA nanopartiküllerden 17-β estradiolün kümülatif salımı.	60
Şekil 4.9. 65:35 bileşimine sahip PLGA nanopartiküllerin emdirilerek yüklendiği kitosan/HA doku iskelelerinden estradiolün kümülatif salımı.	63
Şekil 4.10. 65:35 bileşimine sahip PLGA nanopartiküllerin üretim aşamasında yüklendiği kitosan/HA doku iskelelerinden 17-β estradiolün kümülatif salımı.	64
Şekil 4.11. Kitosan/HA doku iskelesinden suda çözünür formda 17-β estradiol salımı a) 8 günlük, b) 5 saatlik salım.	65
Şekil 4.12. Sıçan kökenli AdMSC'lere ait akış sitometri analiz sonuçları.....	68
Şekil 4.13. Kitosan/HA doku iskeleleri, kitosan/HA+Np doku iskeleleri, kitosan/HA-Np doku iskeleleri ve kitosan/HA+E2 doku iskeleleri üzerinde kültüre edilmiş AdMSC'lere ait MTT sonuçları (İstatistiksel olarak anlamlı farklılık, n=3, kontrol grubu kitosan/HA iken * p<0.05, ** p<0.01, *** p<0.001; kontrol grubu kitosan/HA+Np iken # p<0.05, ## p<0.01, ### p<0.001; kontrol grubu kitosan/HA-Np iken ● p<0.05, ●●● p<0.001)	69
Şekil 4.14. Kitosan/HA doku iskelelerinde kültüre edilen AdMSC'lere ait SEM görüntüleri. a) 4.gün, 1000X, b) 4.gün 2500X, c) 4.gün, 4000X, d) 14. gün, 500X, e) 14. gün, 1000X, f) 14. gün, 5000X, g) 14. gün, yan kesit 1000X.	73
Şekil 4.15. Kitosan/HA+Np doku iskelelerinde kültüre edilen AdMSC'lere ait SEM görüntüleri: a) 4. gün, 500X, b) 4.gün, 1000X, c) 4.gün 2500X, d) 4.gün 4000X e) 14.gün, 500X, f) 14.gün, 1000X, g) 14. gün, 2500X, h) 14. gün 5000X. Mineralizasyonun varlığı ok ile gösterilmiştir.	74
Şekil 4.16. Kitosan/HA-Np doku iskelelerinde kültüre edilen AdMSC'lere ait SEM görüntüleri: a) 4. gün, 1000X, b) 4.gün, 2500X, c) 14.gün 500X, d) 4.gün 1000X e) 14.gün, 2500X, f) 14.gün, 5000X, g) 14. gün, 15000X. Mineralizasyonun varlığı ok ile gösterilmiştir.....	75

Şekil 4.17. Kitosan/HA+E2 doku iskelelerinde kültüre edilen AdMSC'lere ait SEM görüntüleri: a) 4. gün, 500X, b) 4.gün, 5000X, c) 14.gün 2500X, d) 14.gün 2000X e) 14.gün, 5000X. Mineralizasyonun varlığı ok ile gösterilmiştir. 76

Şekil 4.18. Kitosan/HA doku iskeleleri, kitosan/HA+Np doku iskeleleri, kitosan/HA-Np doku iskeleleri ve kitosan/HA+E2 doku iskeleleri üzerinde kültüre edilmiş AdMSC'lere ait ALP sonuçları (İstatistiksel olarak anlamlı farklılık, n=3, kontrol grubu kitosan/HA iken * p<0.05, ** p<0.01, *** p<0.001; kontrol grubu kitosan/HA+Np iken # p<0.05, ## p<0.01, ### p<0.001; kontrol grubu kitosan/HA-Np iken ● p<0.05, ●●● p<0.001) 77

Şekil 4.19. Kitosan/HA doku iskeleleri, kitosan/HA+Np doku iskeleleri, kitosan/HA-Np doku iskeleleri ve kitosan/HA+E2 doku iskeleleri üzerinde kültüre edilmiş AdMSC'lere ait bağıl tip I kollajen gen ekspresyonu (İstatistiksel olarak anlamlı farklılık, n=2, kontrol grubu kitosan/HA iken * p<0.05; kontrol grubu kitosan/HA+Np iken # p<0.05; kontrol grubu kitosan/HA-Np iken ● p<0.05).....79

Şekil 4.20. Kitosan/HA doku iskeleleri, kitosan/HA+Np doku iskeleleri, kitosan/HA-Np doku iskeleleri ve kitosan/HA+E2 doku iskeleleri üzerinde kültüre edilmiş AdMSC'lere ait bağıl osteokalsin gen ekspresyonu (İstatistiksel olarak anlamlı farklılık, n=2, kontrol grubu kitosan/HA iken * p<0.05, ** p<0.01; kontrol grubu kitosan/HA+Np iken # p<0.05, ## p<0.01; kontrol grubu kitosan/HA-Np iken ● p<0.05)80

Şekil 7.1. 17-β estradiolün enkapsülasyon verimi hesabında kullanılan UV kalibrasyon grafiği.....93

Şekil 7.2.a) 17-β estradiol'ün enkapsülasyon verimi hesabında kullanılan HPLC kalibrasyon grafiği, b) 50 µg/mL derişimindeki 17-β estradiol'ün 280 nm'de HPLC kromatogramı. 4.2. dk'da ok ile gösterilen pik E2'ye aittir.....94

Şekil 7.3.ADMSC'lere ait optik mikroskop görüntüleri: (a) 4X; (b) 10X; (c) 20X; (d) 40X.....99

Şekil 7.4. ADMSC'lerin floresan boyamasına ait görüntüler: 3.gün (a) 4X, (b) 10X, (c) 20X, (d) 20X; 13. gün (e) 4X; 33.gün (f) 4X.....100

ÇİZELGELER DİZİNİ

Sayfa

Çizelge 2.1. PLA, PGA ve PLGA polimerlerinin fiziksel özellikleri.....	32
Çizelge 3.1. Polimeraz zincir reaksiyonu için primer dizileri.	45
Çizelge 4.1. Farklı bileşimlerdeki PLGA kopolimerlerinden üretilen boş ve 17- β estradiol (E2) yüklü nanopartiküllerin boy ve boy dağılım değerleri.....	49
Çizelge 4.2. Farklı bileşimlerdeki PLGA kopolimerlerinden üretilen nanopatiküllere yüklenmiş 17- β estradiolün enkapsülasyon verimi	52
Çizelge 4.3. Kitosan/HA doku iskelelerinin temel özellikleri.....	55
Çizelge 7.1. E2 yüklü PLGA nanopartiküllerin emdirilerek yüklendiği kitosan/HA doku iskelelerinde E2 salımına ait veriler.....	97

SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ

α -MEM	Minimum Essential Medium Alpha Modification
α (PPAR α)	Peroksizom Proliferatör Aktive Edici Reseptör
AdMSC	Adipoz Kökenli Mezenkimal Kök Hücre
ALP	Alkalen Fosfataz
AP-1	Aktifleştirici Protein
BMSC	Kemik İliği Mezenkimal Kök Hücre
BMP	Kemik Morfojenik Protein
cbfa-1	Çekirdek Bağlayıcı Protein
CH	Kitosan
DCM	Diklorometan
DMAB	Dido desil dimetil amonyum bromür
DMSO	Dimetil Sülfoksit
DNA	Deoksiribonükleik Asit
DPBS	Dulbecco Fosfat Tampon Tuzu
E2	17- β Estradiol
ECM	Hücre Dışı Matris
EDRF	Endotelyal Kaynaklı Gevşetici Faktör
ER	Östrojen Reseptörü
ERE	Östrojen Cevap Elementi
FBS	Fetal Sığır Serum
FCS	Fetal Buzağı Serum
FGF	Fibroblast Büyüme Faktörü
FTIR	Fourier Transform Kızılötesi
GA	Glikolik Asit
GH	Büyüme Faktörü
GM-CSF	Granülosit Makrofaj-Koloni-Uyarıcı Faktör

HA	Hidroksiapatit
HCl	Hidroklorik Asit
HDL	Yüksek Yoğunluklu Lipoprotein
HMDS	Hekzametildisilazan
HPLC	Yüksek Basıncılı Sıvı Kromatografisi
IGF	İnsülin Benzeri Büyüme Faktörü
IL	İnterlökin
KBr	Potasyum Bromür
Kitosan/HA+E2	Suda Çözünen Formda Bulunan Estradiolün Doku İskelesine Emdirilmesiyle Hazırlanan Sistem
Kitosan/HA+Np	17- β Estradiol Yüklü Nanopartiküllerin Doku İskelesine Üretim Aşamasında Yapıya Katılmasıyla Hazırlanan Sistem
Kitosan/HA-Np	Doku İskeleleri Hazırlandıktan Sonra Nanopartiküllerin Yapıya Emdirme Yoluyla Katılmasıyla Hazırlanan Sistem
LA	Laktik Asit
LDL	Düşük Yoğunluklu Lipoprotein
MAPK	Mitojenlerle Aktifleştirilen Protein Kinazlar
MgCl ₂	Magnezyum Klorür
MKH	Mezenkimal Kök Hücre
MTT	3-[4,5-Dimetiltiazol-2-il]-Difeniltetrazolyum Bromür
NaHCO ₃	Sodyum Bikarbonat
NaOH	Sodyum Hidroksit
OCN	Osteokalsin
OP	Osteopontin
OPG	Osteoprotegrin
PBS	Fosfat Tampon Çözeltisi
PCL	Polikaprolakton

PEO	Polietilen oksit
PGA	Poli(Glikolik Asit)
PLGA	Poli(Laktik-ko-Glikolik Asit)
pNPP	p-Nitrofenil Fosfat
PS	Polistiren
PTH	Parathormon
RANKL	Reseptör Aktivatör Nükleer Kappa B Ligandı
RNA	Ribonükleik Asit
RT-PCR	Gerçek Zamanlı Polimerik Zincir Reaksiyonu
SDS	Sodyum Dodesil Sülfat
SEM	Taramalı Elektron Mikroskobu
SPH	Süpergözenekli Hidrojel
TCP	β -Trikalsiyum Fosfat
TCPS	Polistiren Hücre Kültür Kapları
TGA	Termogravimetrik Analizör
TGF- β	Transforme Edici Büyüme Faktörü
TNF	Tümör Nekroz Faktör
UV	Ultraviyole

1. GİRİŞ ve ÇALIŞMANIN AMACI

Doku mühendisliği yaklaşımı ile kemik rejenerasyonunun sağlanması için doku iskelesi, osteoblastlar veya osteoblasta farklılaşabilen hücreler ile hücre büyümesini ve mineralize kemik doku oluşumunu destekleyen biyosinyaller gereklidir. Bu üç bileşenin tümü kullanılabileceği gibi, sadece hücreler ve doku iskelesinin kullanımı ile gerçekleştirilen kemik doku mühendisliği çalışmaları da bulunmaktadır.

Doku iskeleleri, hücreler için geçici bir yapay hücre dışı matris sağlayacak şekilde tasarlanan 3-boyutlu yapılardır. Doku iskelesi üretilirken kullanılan malzemeler vücut içine yerleştirildiğinde istenmeyen doku tepkilerine yol açmayacak şekilde biyoyumlu olmalıdır (Gümüşderelioğlu, 2007).

Doku mühendisliğinde biyosinyaller, in-vitro kültür ortamına doğrudan verilebildikleri gibi lokal olarak hasarlı bölgeye de yerleştirilebilirler. Biyosinyaller, ayrıca doku iskelelerine de yüklenebilmektedirler (Gümüşderelioğlu, 2011). Biyosinyal moleküllerin implante edilecek doku iskelesinin yüzeyine doğrudan enjekte edilmesi durumunda kararsız kimyasal yapıları, yarı ömürlerinin kısa olması ve doku içerisine yeterince alınamamalarından dolayı etkin sonuçlar elde edilememektedir. Bu nedenle biyosinyallerin taşıyıcılara yerleştirilerek kontrollü ve uzun dönemde salımı gündeme gelmektedir. Bu amaçla biyobozunur, biyoyumlu, sentetik veya doğal polimerlerden ya da seramiklerden elde edilen mikro ya da nano boyutlu taşıyıcılar kullanılmaktadır (Gümüşderelioğlu, 2007). Bu taşıyıcılar doku iskelelerine emdirilme veya kimyasal bağlanma şeklinde yüklenmektedirler (Gümüşderelioğlu, 2011).

Nanopartiküller boyutları 10-1000 nm arasında değişen katı partikül ya da dispersiyon partikül olarak tanımlanmaktadır. Biyoaktif ajanlar (ilaç, biyosinyal molekül vb.) nanopartikül matrise bağlanabilir, enkapsüle edilebilir ya da gömülebilirler (Soppimath et al., 2001).

PLGA polimerleri biyoyumlu ve biyobozunur özelliklerinden dolayı ilaç, hormon, peptid ve proteinlerin kontrollü salımı için uygun taşıyıcılardır. PLGA, yapısındaki ester bağlarının hidrolizi sonucu laktik ve glikolik asit son ürünlerine bozunmaktadır. Polimerin bozunma davranışı salım kinetiğini belirleyen önemli bir

parametredir. PLGA'yı oluşturan kopolimerlerden PGA hidrofilik yapıda olup 2-4 haftada bozunur. PLA ise yapısındaki metil grupları dolayısıyla hidrofobik yapıdadır. Zengin laktik asit içeriği PLGA kopolimerlerinin hidrofilitesini azaltır ve buna bağlı olarak polimer daha yavaş bozunur (Hirenkumar, 2011).

Kitosan, kimyasal özellikleri sayesinde hücre yapışmasını ve çoğalmasını desteklemektedir. Kemik doku mühendisliği için kitosan doku iskelelerinin önemli bir özelliği ise hem in-vitro, hem de in-vivo kemik doku oluşumunu destekleyen içsel bağlantılı gözeneklere sahip iskelelerin oluşumuna imkan vermesidir. Kemik gibi sert dokularda matris mineralizasyonunun oluşumu için doku iskelesinin mekanik özellikleri önemlidir. Hidroksiapatit (HA), $\text{Ca}_{10}(\text{PO}_4)_6(\text{OH})_2$ kimyasal yapısına sahip olup kemik doku uygulamalarında sıklıkla kullanılan bir biyoseramiktir. Ayrıca yüksek osteokondüktiviteye sahiptir ve kemiğin temel inorganik bileşenidir (Demirtaş et al., 2006).

Mezenkimal kök hücreler (MKH), yer aldıkları dokunun hücre tiplerine dönüşebilen yani multipotent özelliğe sahip stromal kökenli erişkin kök hücrelerdir (Liu et al., 2012). MKH'ler yüksek proliferasyon yeteneği ve çok iyi farklılaşma kapasitesine sahip oldukları için kemik rejenerasyonunda hücre kaynağı olarak kullanımları giderek artmaktadır (Meijer, 2007).

Yağ (adipoz) doku da kemik iliği gibi embriyonik mezodermden oluşur ve heterojen stromal hücre popülasyonu içerir. Bu hücre popülasyonu incelendiğinde adipositlerin dışında, preadipositler, endotelyal hücreler, düz kas hücreleri, perisitler, fibroblastlar ve mezenkimal kök hücrelerden oluştuğu görülmüştür. Adipoz dokudan elde edilen mezenkimal kök hücrelerin (AdMSC)'lerin yağ, kemik, kıkırdak, kas ve sinir dokularına dönüşebildikleri gösterilmiştir (Zuk et al., 2002). Yağ doku kolay ulaşılabilir olması, vücutta bol miktarda bulunabilmesi, erişilebilir erişkin kök hücre kaynaklarına sahip olması ve plastik cerrahi için rutin bir işlem olan yağ aldırma (liposakşın) tekniği ile elde edilebilmesi nedeniyle kök hücre çalışmalarında çok önemli bir kaynak haline gelmiştir (Zuk et al., 2001). Küçük miktar adipoz doku (100-200 mL) lokal anestezi ile alınabilir. Bir gram adipoz dokudan enzimatik parçalama işlemi ile yaklaşık olarak 5×10^3 kök hücre elde edilmektedir ve bu miktar kemik iliğinden elde edilen kök hücre sayısının yaklaşık 500 kat fazlasıdır (Mizuno, 2009). AdMSC'ler, BMSC'ler ile aynı kültür

koşullarında ve 2-4 hafta içinde osteojenik hücelere farklılaşma gösterirler (Rada et al., 2009).

Biyosinyal moleküller genlerin ürünü olan protein/peptid moleküller olup yapışma, yayılma, büyüme, farklılaşma ve apoptoz gibi hücrel fonksiyonları düzenlemektedirler (Ito, 1998). Kemik oluşumu ve rejenerasyonu biyosinyal moleküller tarafından kontrol edilmektedir. Steroid bir hormon olan östrojen ise kemik doku mühendisliğinde rejeneratif etki sağladığı düşünülen bir biyosinyal moleküldür. Östrojen kemik metabolizmasının düzenlenmesine büyük oranda katılmaktadır. Kemik oluşumunu artırarak, kemik yıkımını azaltmaktadır ve kemik döngü (turnover) hızını yavaşlatmaktadır (Seyisoğlu, 1999). Ayrıca, literatürde östrojenin mezenkimal kök hücrelerin osteojenik farklılaşmasını etkilediği yönünde az sayıda çalışma yer almaktadır. 17- β estradiol (E2), östrojenik kuvvetinin en yüksek olmasından dolayı östrojen kaynağı olarak rejeneratif tıp alanında kullanılmaktadır. E2, hidrofobik yapıda olup, sudaki çözünürlüğü 5 mg/L'dir (Guyton, 2005).

Yukarıda da kısaca özetlenen literatür bilgisi ışığında, östrojenin doku iskelesi yapısına katılarak uzun dönemde kemik doku oluşumu üzerindeki etkilerinin incelendiği bir çalışmaya rastlanılmamıştır. Sunulan tez çalışmasının amacı PLGA nanopartiküllere yüklenmiş 17- β estradiolün kitosan doku iskelesinden kontrollü ve uzun süreli salımının incelenmesi ve bunu takiben adipoz kökenli mezenkimal kök hücrelerinin osteoblastik farklılaşmasına etkisinin araştırılmasıdır. Bu amaçla emülsiyon-çözücü-buharlaştırma yöntemi ile 17- β estradiol yüklü PLGA nanopartiküller sentezlenmiştir. Üretilen nanopartiküllerin boyutlarını ve morfolojilerini belirlemek için karakterizasyon çalışmaları yapılmıştır. 17- β estradiol'ün enkapsülasyon verimi HPLC ve UV spektrofotometreleri ile yapılan ölçümler sonucunda belirlenmiştir. 17- β estradiol yüklü nanopartiküller, biyobozunur bir polimer olan kitosan/HA doku iskelelerinin yapısına iki şekilde yüklenmişlerdir. Birincisinde, önceden hazırlanmış doku iskelelerine nanopartiküller emdirilmiştir. İkinci yöntemde ise nanopartiküller iskele üretim aşamasında yüklenmişlerdir. Nanopartikül yüklü doku iskeleleri SEM ve FTIR ile karakterize edilmişlerdir. PLGA nanopartiküllerden ve her iki yöntemle oluşturulan nanopartikül yüklü doku iskelelerinden 17- β estradiol salım çalışmaları yapılmıştır.

Hücre kültürü çalışmalarında ise, 17- β estradiolün AdMSC'lerin osteojenik farklılaşmasına olan etkisi araştırılmıştır. Bu amaçla hücre üremesi, hücre morfolojileri ve osteojenik farklılaşma potansiyelleri belirlenmiştir. Elde edilen sonuçlar, in-vitro kemik doku mühendisliği açısından değerlendirilmiştir.

2. GENEL BİLGİLER

Bu bölümde, çalışmanın temelini oluşturan konular ile ilgili literatür bilgisi 4 başlık altında sunulmuştur. İlk olarak doku mühendisliğine kısaca giriş yapılmıştır. İkinci bölümde kemik dokusu hakkında bilgi verilmiş ve kemik doku mühendisliği yaklaşımından söz edilmiştir. Ardından, kemik doku mühendisliğinde kullanılan bileşenlerden biri olan doku iskelelerinin sahip olması gereken özelliklere yer verilmiştir. Kemik doku mühendisliğinde kullanılan kök hücreler hakkında ayrıntılı bilgi sunulduktan sonra biyosinyaller hakkında bilgi verilmiştir. Üçüncü bölümde östrojen ve östrojenin kemik dokusu üzerindeki etkileri ayrıntılı bir biçimde açıklanmıştır. Son bölümde ise nanopartiküller ile ilgili açıklamalara yer verilmiştir.

2.1. Doku Mühendisliği

Doku mühendisliği; biyomalzeme, hücre ve biyosinyal moleküllerinin tek başlarına veya birlikte kullanılarak canlı dokuların tamiri veya yeniden yapılanması için biyoloji, kimya ve mühendislik ilkelerinin uygulanmasıdır (Gümüşderelioğlu, 2007). Doku mühendisliğinde, hasarlı dokunun yenilenmesi ya da tamiri, fonksiyonları onarmaya ve ana doku ile iletişimi desteklemeye yardımcı olmak amacıyla tasarlanmış doku iskeleleri ile sağlanmaktadır. Bu doku iskeleleri, hücrelerin çoğalmalarına, farklılaşmalarına ve böylelikle fonksiyonlarını sürdürmelerine olanak sağlayan yapay bir hücre dışı matris görevi görmektedirler (Theinhan et al, 2009). Uygun kaynaktan sağlanan ve hücre kültüründe istenilen sayıya çoğaltılan hücreler, biyosinyal molekülleri ile birlikte söz konusu doku iskelelerine ekilmekte ve ardından, elde edilen yapı, doku hasarının bulunduğu bölgeye implante edilmektedir (Gümüşderelioğlu, 2007).

2.2. Kemik Doku Mühendisliği

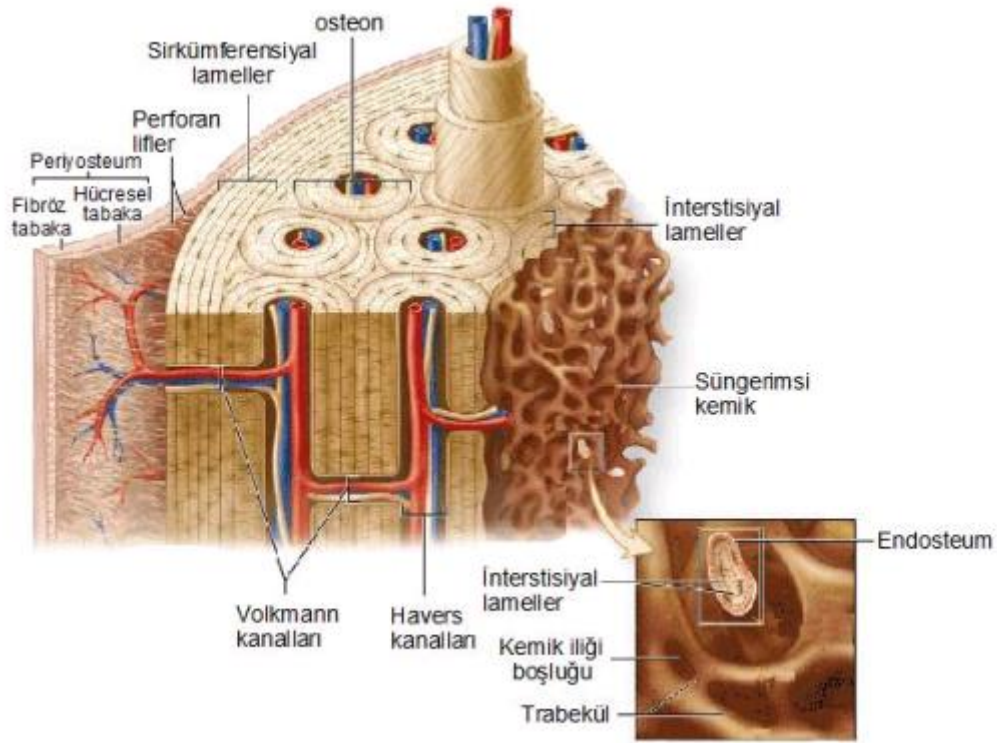
2.2.1. Kemik yapısı ve özellikleri

Kemik, dinamik ve oldukça damarlı bir destek dokudur. Kemiğin esas görevi vücuda destek sağlamaktır. Buna ilave olarak kemik, mineral depolar, hareketle sonuçlanan kas kasılmasını destekler ve iç organları korur.

Kemik dokusu iki ana bölümden oluşmaktadır; **kortikal** (sıkı, kompakt) ve **trabeküler** (süngerimsi) kemik bölgesi. Kortikal kemik sert yapıdadır ve % 10 oranında gözenekliliğe sahiptir, toplam iskeletin yaklaşık % 20'sini oluşturmaktadır.

Trabeküler kemik ise % 50-90 gözenekliliğe sahiptir ve bu özelliğiyle kortikal kemiğe göre yaklaşık 20 kat daha düşük sıkıştırma direncine sahiptir. Kemik matrisi, kemiğe elastiklik veren organik kısım (% 35) ve kemiğe sertlik veren apatit mineralleri içeren inorganik bileşenlerden oluşan kompozit bir yapıdır. Organik kısım büyük oranda tip 1 kollajen, glikoproteinler, proteoglikanlar ve sialoproteinler gibi birçok protein içermektedir (Salgado et al., 2004).

Kemik, **periosteum** adı verilen ve osteoejenik aktivitesi olan bir bağ dokusuyla çevrilidir. Periosetumun, kemiğe destek sağlanmasında, kemiğin beslenmesinde ve onarımında büyük rolü vardır. Yapısında kollajen ve elastik lifler bulunur. Periosteumun altında yer alan ve kemiğin iç boşluklarını örten tabaka olan **endosteum** ise kemik iliği boşluğunu ve kortikal kemik iliğinin kanal sistemlerini çevreleyen ince retiküler bağ dokusudur (Bayram, 1995). Bu tabakanın hem kemik doku hücrelerini, hem de hemopoetik hücreleri yapabilme özelliği vardır (Sunay, 2010). Kortikal kemik içerisinde **Havers kanalları** denilen çok sayıda ince kanalcıklar mevcuttur. Bu kanallarda kemik dokusunun kılcal damar dolaşımı (kapillerler) bulunur (Mehrra, 2006). **Osteonlar**, bir Havers kanalıyla onun etrafındaki yaklaşık 3-7 µm çapa sahip eş merkezli lamelleri içeren kemiğin en temel birimidir (Rogel et al., 2008). Bir Havers kanalı yan dallarla kemik iliği ve periosteumla bağlantı kurar. Bu yan dallara **Volkmann kanalları** adı verilir. Sert bir matrise sahip olan kemik dokusunda kanal ve kanaliküllerle kemiğin dışından içine kadar ilişki kurulur ve bu şekilde metabolizma için gerekli maddeler damar ve kanaliküllerle hücrelere kadar ulaşır (Bayram, 1995). Kemiğin makroskobik yapısı Şekil 2.1.'de verilmiştir.



Şekil 2.1. Kemik doku yapısı

Kemik doku üç çeşit hücreden oluşmaktadır. Bunlar; osteoblastlar, osteositler ve osteoklastlardır. **Osteoblastlar**, mezenkimal orijinli osteoprogenitör hücrelerden kaynaklanırlar. Matris içeriğinin üretiminden sorumlu hücreler olup, tip I kollajen sentezleme ve mineralizasyonu düzenleme yetenekleri vardır. **Osteositler**, kemiğin esas hücreleri olup, olgun kemik hücreleridir. Ayrıca, osteositlerin, kalsiyumun kemiklerden kana verilmesi gibi önemli metabolik rolleri de vardır. **Osteoklastlar** ise, kemikte yıkımı ve resorpsiyonu gerçekleştirdikleri gibi içerdikleri kollajenaz ve diğer proteolitik enzimlerle kemiği rezorbe etmektedirler. Eritici enzimlerle eritilen kemik dokusu uzantılarla hücre içine alınmaktadır (Roodman, 1999).

Kemik yıkım ve yapım olayı hayat boyu devam eder. Kemik dokusu, osteoblastların salgıladıkları matrisin doğrudan mineralize olması ile (intramembranöz kemikleşme) ya da daha önceden var olan kıkırdak matris üzerine kemik matrisinin çöküşü (endokondral kemikleşme) ile şekillenmektedir. **Intramembranöz kemikleşme** olayında, önce mezenkimal kök hücreleri damarlar etrafında toplanırlar ve çoğalırlar, aradaki boşluklar sertleşmemiş matris ve içindeki kollajen liflerce doldurulmuştur. Bu hücreler, hücrelerarası madde ve lif

sentezini de yaparak osteositlere farklılaşırlar. Oluşan kemik trabeküler yapıdadır. Damar çevresindeki osteoblastların osteositlere dönüşerek boşalttıkları yerlere yeni hücrelerin gelmesiyle olayda devamlılık sağlanmaktadır (Sunay, 2010).

Kemik dokuda herhangi bir kırık meydana geldiğinde kanama oluşur. Kırık bölgesinde hasarlı dokunun ortadan kaldırılması için fibroblastlar ve damarların çoğaldığı gözlenmektedir. Bu bölge fibröz bir doku yapısı haline gelmekte ve kırık yeri kırık dokuya dönüşmektedir. Bölgede daha sonra olgunlaşmamış kemik doku oluşur. Bu doku daha sonra yavaş yavaş ortadan kalkarken yerini esas kemik dokuya bırakır (Mescher, 2009).

2.2.2. Kemik doku mühendisliği yaklaşımı

Kemik hasarlarında güncel tedavi, otolog kemik greftleri, allojenik greftler ve bunlara alternatif, metal ya da seramik malzemelerin kullanımıdır (Salgado et al., 2004). Ancak, otogreftlerin donör alan morbiditesini arttırması, allogreftlerin hastalık taşıma riskinin olması gibi sorunlardan dolayı son yıllarda “**kemik doku mühendisliği**” yaklaşımı ön plana çıkmıştır (Khan 2008). Doku mühendisliği yaklaşımı ile kemik rejenerasyonunun sağlanması için doku iskelesi, osteoblastlar veya osteoblasta farklılaşabilen hücreler ile hücre büyümesini ve mineralize kemik doku oluşumunu destekleyen büyüme faktörleri gereklidir (Şekil 2.2). Bu üç bileşenin tümü kullanılabileceği gibi, sadece hücreler ve doku iskelesinin kullanımı ile gerçekleştirilen kemik doku mühendisliği çalışmaları da bulunmaktadır.



Şekil 2.2. Kemik doku mühendisliği yaklaşımı.

2.2.3. Kemik doku mühendisliğinde doku iskeleleri

2.2.3.1. Doku iskelelerinin genel özellikleri

Doku iskeleleri, hücreler için geçici bir yapay hücre dışı matris sağlayacak şekilde tasarlanan 3-boyutlu yapılardır. Doku iskelesi üretiminde kullanılacak malzemeler vücut içine yerleştirildiğinde istenmeyen doku tepkilerine yol açmayacak şekilde biyouyumlu olmalıdır (Gümüşderelioğlu, 2007).

Kemik doku mühendisliği uygulamalarında kullanılan iskelelerin osteoindüktif ve osteokondüktif olmaları beklenmektedir. **Osteoindüktif** malzemeler, greftin olduğu bölgede kök hücrelerin osteoblastik hücre hattına farklılaşmasını indükleyen malzemelerdir. **Osteokondüktif** malzemeler ise osteojenik hücrelerin üremelerini destekleyerek, kemiğin üç boyutlu yapısının oluşmasını sağlayan malzemelerdir (Salgado et al., 2004). Ayrıca, kemik gibi yük taşıyan dokuların rejenerasyonunda kullanılan doku iskelelerinin mekanik dayanımlarının yüksek olması gerekmektedir (Hutmacher, 2007).

Doku iskelelerinin sahip olması gereken diğer bir özellik ise uygun gözenekliliktir. Kemik doku mühendisliğinde doku iskelelerinin besin maddelerinin akışını ya da difüzyonunu destekleyecek, hücre göçüne izin verecek şekilde %90 gözeneklilik

oranına ve en az 100 µm gözenek çapına sahip olmaları hücrelerin penetrasyonu ve büyüyen dokunun uygun şekilde damarlaşması için gereklidir (Çetin, 2010).

Hücreler kendi hücre dışı matrislerini oluşturabilecek kapasiteye ulaştıklarında iskeleye ihtiyaç kalmayacağından, doku iskelesinin biyobozunur bir malzemeden üretilmesi gerekmektedir (Gümüşderelioğlu, 2007). Kemik rejenerasyonunun amaçlandığı çalışmalarda kullanılan doku iskelelerinin fiziksel özelliklerini en az 6 ay boyunca korumaları gerekmektedir (Hutmacher, 2007).

2.2.3.2 Kemik doku mühendisliğinde kullanılan biyomalzemeler

Kemik doku mühendisliği uygulamalarında, metaller, seramikler, polimerler (doğal ve sentetik) ve bunların birleşiminden oluşan kompozit malzemeler kullanılmaktadır. Metal malzemeler, vücut içinde bozunur olmama ve implantasyon bölgesinde enfeksiyon oluşturma gibi bazı önemli dezavantajlara sahiptir. Seramikler ise düşük gerilme kuvvetine sahiptirler ve oldukça kırılğan yapıdadırlar (Salgado et al., 2004). Bileşimleri ve yapıları ayarlanabilen, biyobozunur polimerler doku iskelesi üretimi için oldukça cazip malzemelerdir (Khan, 2008).

Biyobozunur polimerler iki gruba ayrılmaktadır: doğal polimerler (kitin/kitosan nişasta, aljinat, ve hiyaluronik asit türevleri olan polisakkaritler ile kollajen, ipek ve fibrin jelleri içeren proteinler) ve sentetik polimerler. Doğal polimerler yüksek derecede organize olmuş yapılar olup, hücre dışı matris bileşenleri içermektedirler.

Doğal bir polimer olan kitosan, böcek ve kabuklu deniz hayvanlarının kabuklarında bulunan kitinin kısmi deasetilasyonu ile elde edilen katyonik ve doğrusal yapıda bir polisakkarittir (Muzarelli, 1977). Kitosan, kimyasal özellikleri sayesinde hücre yapışmasını ve çoğalmasını desteklemektedir. Kemik doku mühendisliği için kitosan doku iskelelerinin önemli bir özelliği ise hem in-vitro, hem de in-vivo kemik doku oluşumunu destekleyen içsel bağlantılı gözeneklere sahip iskelelerin oluşumuna imkan vermesidir. Kemik gibi sert dokularda matris mineralizasyonunun oluşumu için doku iskelesinin mekanik özellikleri önemlidir. Güncel çalışmalar, kitosan doku iskelelerinin biyolojik ve mekanik özelliklerinin geliştirilmesi için hidroksiapatit (HA), β -trikalsiyum fosfat (TCP) gibi biyoseramikler ya da jelatin, aljinat gibi biyomalzemeler ile birleştirilmesine yoğunlaşmıştır. Kalsiyum fosfatın, kitosan matrise katılması rezorpsiyon ve bozunma kinetiklerine

katkıda bulunmakta, biyouyumluluğu ve sert doku entegrasyonunu geliştirmektedir (Thein-Han et al., 2009). Hidroksiapatit, $\text{Ca}_{10}(\text{PO}_4)_6(\text{OH})_2$ kimyasal yapısına sahip olup kemik doku uygulamalarında sıklıkla kullanılan bir biyoseramiktir ve ayrıca kemiğin temel inorganik bileşenidir. Ayrıca hidroksiapatit, yüksek biyoaktif ve osteokondüktif özelliklere sahiptir (Demirtaş et al., 2008).

2.2.4. Kemik doku mühendisliğinde kullanılan hücreler

Kemik rejenerasyonunun amaçlandığı çalışmalarda osteoblastlar ya da osteoprogenitör yani kök hücreler kullanılmaktadır (Caplan, 1991). Bunların yanı sıra, MC3T3-E1, MG63, HOBIT ve SAOS-2 gibi osteoblast benzeri hücre hatları ile de çalışmalar yapılmaktadır (Beşkardeş, 2008).

Osteoprogenitör hücreler, olgunlaşmamış, öncül kemik hücreleridir ve çeşitli büyüme faktörlerinin varlığında osteoblastlara farklılaşırlar (Beşkardeş, 2008). Kemik doku mühendisliğinde kemik iliği mezenkimal kök hücreleri sık kullanılmaktadır. Alternatif olarak, adipoz dokudan elde edilen mezenkimal kök hücrelerin de kullanımı yaygınlaşmaktadır.

2.2.4.1. Kök hücreler

Rejeneratif tıbbın ortaya çıkması ile beraber doku iskeleleri ve biyosinyallere ek olarak kök hücre kaynaklarına olan ihtiyaç ortaya çıkmıştır (Mizoni, 2009). 2001 yılında dokularda kök hücrelerin varlığına dair ilk bulgular ortaya çıktığından beri kök hücre kaynaklarına olan ilgi giderek artmaktadır. Kök hücreler embriyodan, fetüstan ve erişkinden elde edilebilen, canlıda yaşam süresi boyunca kendi kopyasını yaparak kendini yenileyebilen ve/veya dokuları, organları oluşturan özel hücrelere farklılaşabilen hücrelerdir (Rada et al, 2009).

Kök hücreler farklılaşabilme yetenekleri ve izole edildikleri doku bölgesine göre gruplara ayrılmaktadır. Bulundukları dokuya göre i) embriyonik kök hücreler, ii) embriyonik olmayan kök hücreler olarak iki gruba ayrılmaktadır (Woodbury et al., 2000). Farklılaşma potansiyellerine göre ise totipotent, pluripotent, multipotent ve unipotent kök hücreler olarak sınıflandırılırlar.

i) Embriyonik kök hücreler:

Embriyonik kök hücreler, 4-5 günlük embriyonun blastositinin iç hücre tabakasından elde edilen totipotent özellikte hücrelerdir (Blau et al., 2001). Bu hücreler, sınırsız farklılaşma ve farklı yönlere gidebilme özelliğinde olan kök hücrelerdir (Sunay, 2010).

ii) Erişkin kök hücreler:

Erişkin kök hücreleri, bir doku veya organdaki farklılaşmış hücreler arasında bulunan farklılaşmamış hücredir. Bu hücreler kendilerini yenileyebilir ve içinde bulunduğu doku veya organın özelleşmiş hücre tiplerine farklılaşabilirler (Şahin ve ark., 2005). **Somatik kök hücre** de denilen erişkin kök hücrelerin esas görevi, bulundukları dokuyu tamir etmek ve dokunun devamlılığını sağlamaktır (Blau et al., 2001). Erişkin kök hücre kaynakları, kemik iliği, kan, kornea, retina, beyin, iskelet, diş pulpası, karaciğer, deri ve pankreas'tır (Liu et al., 2012). Erişkin kaynaklı kök hücreler pluripotent özelliğe sahiptirler. Pluripotent özelliğe sahip bir kök hücre kendini yenileme özelliğine sahiptir ve pek çok vücut hücresine dönüşebilmektedir (Woodbury et al., 2000).

Kemik iliğinde, mezodermden köken alan hemapoetik, endotel ve mezenkimal kök hücreler bulunmaktadır (Sunay 2010).

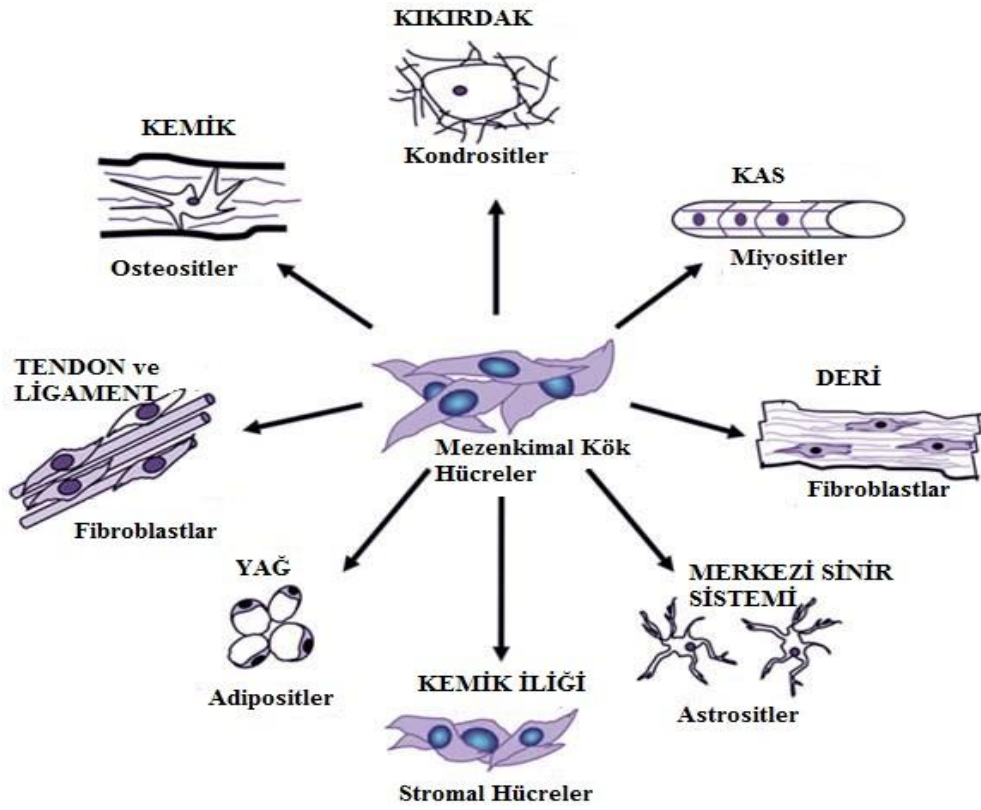
Mezenkimal kök hücreler

Mezenkimal kök hücreler (MKH), yer aldıkları dokunun hücre tiplerine dönüşebilen yani multipotent özelliğe sahip stromal kökenli erişkin kök hücrelerdir (Liu et al., 2012). Mezenkimal kök hücreler bağ (konnektif) dokunun ana hücreleridir. Bu hücreler ilk kez 1976 yılında Fridenstein tarafından tanımlanmışlardır. Fridenstein, fetal buzağı serumu (FCS) kullanarak yaptığı kemik iliği kültürlerinde yapışma (adezyon) yeteneği gösteren, morfolojik olarak fibroblastlara benzeyen hücre kolonilerinin bulunduğunu ve bunların kemik ve yağ hücrelerine farklılaşabilme yeteneğine sahip olduklarını göstermiştir. "Kemik iliği stromal fibroblast'ları" denilen bu hücreler daha sonra **mezenkimal kök/stromal hücre** olarak tanımlanmışlardır (Shao et al, 2007). MKH tanımlanmasında yaygın olarak kullanılan başlıca özellikler; plastik yüzeye yapışma (plastic adherence), stromal

karakterde yüzey antijenlerinin ekspresyonu ve multipotent farklılaşma potansiyelidir (Sunay, 2010).

Organizmanın en zengin kök hücre kaynaklarından biri olan kemik iliği, MKH'ler için ana kaynak sayılmaktadır. Bunun dışında MKH'ler, adipoz doku, periferik kan, kordon kanı, karaciğer, kıkırdak dokusu, kas dokusu, diş pulpası ve fetal dokulardan da izole edilebilirler (Barry ve Murphy, 2004).

Son yıllarda yapılan çok sayıda çalışma kemik iliği kökenli mezenkimal kök hücrelerinin (BMSC) kemik, kıkırdak, yağ ve ligament hücrelerine farklılaşabildiklerini göstermiştir (Şekil 2.3) (Schaffler A., Büchler C., 2007).



Şekil 2.3. Mezenkimal kök hücrelerin farklılaşma potansiyelleri.

Mezenkimal kök hücrelerin avantaj ve dezavantajları

MKH'ler elde edilme yöntemlerinin kolay olması, farklılaşma ve kendini yenileyebilme kapasitelerinin oldukça yüksek olması, çok farklı dokularda bulunmaları (Barry ve Murphy, 2004) ve elde edildikleri doku dışında plastik kültür kaplarına yapışabilme özelliklerinin bulunmasından dolayı doku mühendisliğinde

oldukça yaygın kullanıma sahiptirler. Ayrıca bu hücrelerin in-vitro çoğaltılmaya elverişli, dayanıklı hücreler oldukları, kültürde çoğalma (proliferasyon) ve farklılaşma yeteneklerini korudukları bilinmektedir (Sunay, 2010).

Adipoz kökenli mezenkimal kök hücreler

Yağ (adipoz) doku da kemik iliği gibi embriyonik mezodermden oluşur ve heterojen stromal hücre popülasyonu içerir. Bu hücre popülasyonu incelendiğinde adipositlerin dışında, preadipositler, endotelyal hücreler, düz kas hücreleri, perisitler, fibroblastlar ve mezenkimal kök hücrelerden oluştuğu görülmüştür (Zuk et al., 2002). Adipoz doku vücutta bol miktarda bulunabilmesi ve erişilebilir erişkin kök hücre kaynaklarına sahip olması nedeniyle doku iyileşmesi ve yenilenmesi için ümit vermektedir. Yapılan çalışmalar, adipoz kökenli mezenkimal kök hücrelerin yağ, kemik, kırık, kas ve sinir dokularına dönüşebildiklerini göstermiştir (Zuk et al., 2001).

Adipoz kökenli mezenkimal kök hücreler (AdMSC) ve kemik iliği mezenkimal kök hücreleri, büyüme, morfolojik yapı, fibroblastik karakter gösterme ve sitoplazmik hacme göre geniş çekirdek hacmine sahip olma gibi özellikler bakımından önemli ölçüde benzerlik gösterirler (Ugarte et al., 2003). Bununla birlikte, AdMSClerin kolay elde edilebilmeleri, fazla miktarda bulunmaları ve geniş alana yayılmış olmaları kemik iliği kökenli mezenkimal kök hücrelere oranla avantajları olarak görülebilir.

Kök hücrelerin yenileyici tıpta kullanılmaları için birtakım kriterlere sahip olması gerekmektedir. Bunlar: i) bol miktarda bulunmaları (milyon-milyar hücre), ii) minimum invaziv koşullarda hasat edilmeleri, iii) otolog ya da allojenik transplantasyonda etkili ve güvenli olmaları, iv) çoklu hücre hattı boyunca ayarlanabilir ve çoğaltılabilir davranışta farklılaşabilmeleridir. Adipoz dokudan izole edilen mezenkimal kök hücreler bu kriterlerin hepsine uymaktadır (Rada et al., 2009).

Estetik cerrahi yöntemi olan liposakşın (yağ aldırma) yöntemi ile elde edilen adipoz dokudan enzimatik parçalama işlemi ile kök hücre eldesi, kemik iliğinden kök hücre alınması yöntemine göre daha az invazivdir. Liposakşında, daha az hasta rahatsızlığı ve daha az donör alan morbiditesi görülür. Küçük miktar adipoz doku

(100-200 mL) lokal anestezi ile alınabilir. 1 gram adipoz dokudan enzimatik parçalama işlemi ile yaklaşık olarak 5×10^3 kök hücre elde edilmektedir ve bu miktar kemik iliğinden elde edilen kök hücre sayısının yaklaşık 500 kat fazlasıdır (Mizuno, 2009).

Adipoz dokudan izole edilen mezenkimal kök hücrelerin farklılaşma potansiyeli

AdMSC'lerin, adipojenik, osteojenik, kondrojenik, miyojenik hatlara ve kardiyomiyositlere farklılaşma potansiyeli bulunmaktadır. Ayrıca çalışmalar, AdMSC'lerin nöron benzeri hücrelere, endotel, epitel hücrelere, hepatositlere, pankreatik hücrelere ve hematopoetik destekli hücrelere de farklılaşabildiğini göstermektedir (Mizuno, 2009).

AdMSC'ler preadipositlerden meydana geldikleri için yağ dokusuna farklılaşma potansiyelleri oldukça yüksektir. 2-3 haftalık bir süre sonucunda farklılaşma gerçekleşmektedir. İlk haftanın sonunda hücre içinde yağ depolanması başlamaktadır (Tholpady et al., 2006). Adiposit fenotipe farklılaşma, peroksizom proliferatör aktive edici reseptör α (PPAR α) transkripsiyon faktörü ile belirlenebilmektedir (Rada et al., 2009).

AdMSC'lerin osteojenik farklılaşma potansiyeli üzerine çeşitli çalışmalar yapılmıştır. AdMSC'ler, BMSC'ler ile aynı kültür koşullarında ve 2-4 hafta içinde osteojenik hücrelere farklılaşma gösterirler. Alkalen fosfataz (ALP), osteokalsin (OCN), kollajen tip 1 ve Runx2 gibi transkripsiyon faktörleri kök hücrelerin osteoblastik fenotipe farklılaşma kapasitesi hakkında bilgi verir. Bilindiği gibi ortam bileşenleri osteojenik fenotipin indüklenmesi açısından önemlidir. Kültür ortamına ilave edilen dekzametazon ve β -gliserofosfat AdMSC'lerin osteojenik farklılaşmasını arttırmaktadır (Rada et al., 2009).

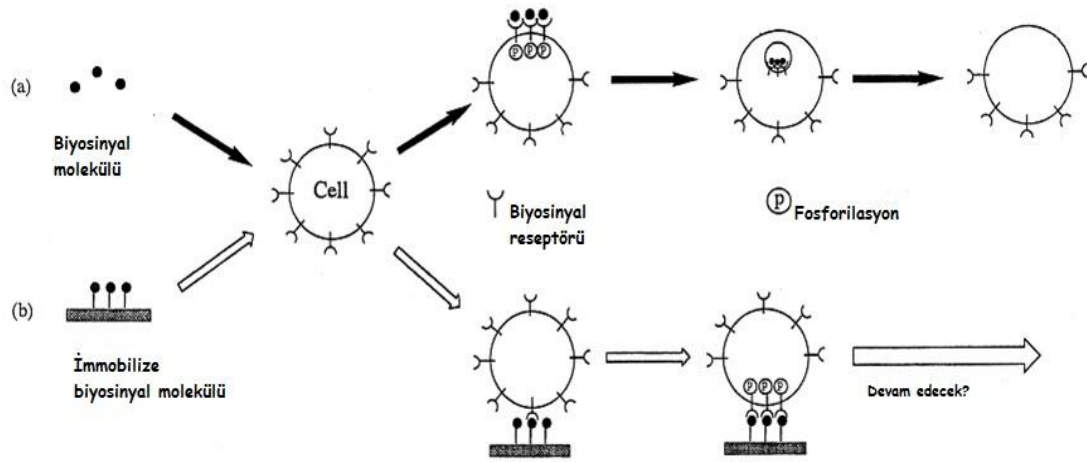
2.2.5 Kemik doku mühendisliğinde kullanılan biyosinyal moleküller

Biyosinyal moleküller genlerin ürünü olan protein/peptid moleküller olup yapışma, yayılma, büyüme, farklılaşma ve apoptoz gibi hücresel fonksiyonları düzenlemektedirler (Ito, 1998). Biyosinyaller, hücre yapışma faktörleri ve hücre büyüme faktörleri olmak üzere iki grupta incelenmektedirler.

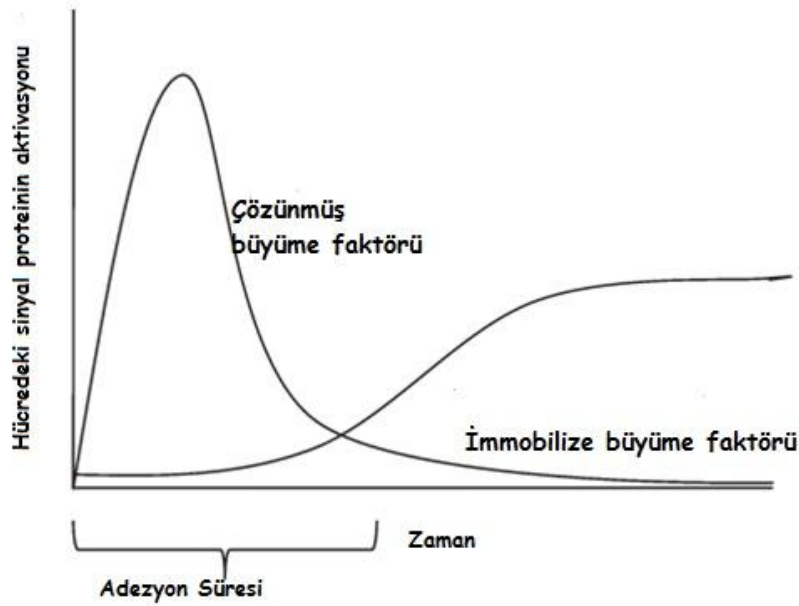
Hücre yapışma proteinleri, immüoglobulinler, integrin ve selektinlerdir. Hücrenin yüzeyine adsorplanan proteinler, hücreler tarafından üretilen proteinlerle etkileşerek hücrelerin yüzeye yapışmasını yönlendirmektedirler. Hücre büyüme faktörleri; endokrin bezlerden salgılanan hormonlar, bağışıklık sistemi tarafından salgılanan sitokinler ve tüm hücreler tarafından salgılanan büyüme faktörlerini içermektedir (Gümüşderelioğlu, 2011). Kemik oluşumu ve rejenerasyonu biyosinyal moleküller tarafından kontrol edilmektedir. İlk olarak 1965’de M. Urist tarafından, demineralize kemik matrisinin, kemik dışı bölgelere yerleştirildiğinde kemik oluşumunu indükleyici etkilerinin gösterilmesi ile tanımlanan kemik morfojenik protein (BMP) kemik doku rejenerasyonu için önemli bir biyosinyaldir. Bunun yanı sıra, transforme edici büyüme faktörü (TGF- β), insülin benzeri büyüme faktörü (IGF) ve fibroblast büyüme faktörü (FGF), gibi büyüme faktörleri de kemik oluşumunu düzenleyen faktörlerdir. Kalsitonin ve parathormon ise kemik oluşumunu düzenleyen endokrin faktörlerdir (Lee et al., 2007). Steroid bir hormon olan östrojen ise kemik doku mühendisliğinde rejeneratif etki sağladığı düşünülen bir biyosinyal moleküldür.

Proteinler gibi yüksek molekül ağırlıklı biyosinyaller, hücre membranında reseptörlerine bağlanarak hücre içine alınırlar. Steroidler gibi hücre membranından geçebilen biyosinyaller ise, hücre içinde reseptörlerine bağlanırlar. Biyosinyalin reseptör ile etkileşmesiyle, biyosinyal-reseptör kompleksi oluşur ve reseptörün sitoplazmik bölgesinde otofosforilasyon gerçekleşir. Fosforilasyon ile hücre içi sinyal iletimi başlatılır. Hücre metabolizmasında veya gen ekspresyonunda hücresel yanıt oluşturulmaya başlar. Daha sonra biyosinyallerin aktiviteleri, hücre içi lizozomlar tarafından sonlandırılır (Şekil 2.4.a) (Ito, 2008).

Biyosinyaller immobilize edildiğinde hücre içi “down regülasyon” önlenerek uzun dönemde biyosinyal salımı sağlanmaktadır. Immobilizasyon, biyosinyalin katı bir desteğe tutundurulması olup böylelikle biyosinyalin aktivasyon süresi uzatılır (Şekil 2.4.b), (Şekil 2.5) (Ito, 2008).



Şekil 2.4. Hücre ile yalın ve immobilize olmuş biyosinyal molekülü arasındaki etkileşimin şematik gösterimi (Ito, 1998).



Şekil 2.5. Immobilize edilen ve çözünen biyosinyalin hücredeki aktivasyon sürelerinin karşılaştırılması.

Doku mühendisliğinde biyosinyaller, in-vitro kültür ortamına doğrudan verilebildikleri gibi lokal olarak hasarlı bölgeye de verilebilirler. Biyosinyaller, ayrıca doku iskelelerine de yüklenebilmektedirler (Gümüşderelioğlu, 2011). Biyosinyal moleküllerin implante edilecek doku iskelesinin yüzeyine doğrudan enjekte edilmesi durumunda kararsız kimyasal yapıları, yarı ömürlerinin kısa olması ve doku içerisine yeterince alınamamalarından dolayı etkin sonuçlar elde

edilememektedir. Bu nedenle biyosinyallerin taşıyıcılara yerleştirilerek kontrollü ve uzun dönemde salımı gündeme gelmiştir. Bu amaçla biyobozunur, biyouyumlu, sentetik veya doğal polimerlerden ya da seramiklerden elde edilen taşıyıcılar kullanılmaktadır (Gümüşderelioğlu, 2007). Bu taşıyıcılar doku iskelelerine emdirilme veya kimyasal bağlanma şeklinde yüklenmektedirler (Gümüşderelioğlu, 2011).

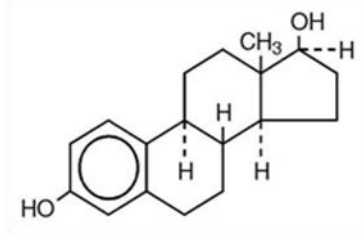
Sunulan tez çalışmasında bir stereroid hormonu olan östrojenin, adipoz kökenli mezenkimal kök hücrelerin kemiğe farklılaşmasındaki potansiyeli incelendiğinden aşağıdaki bölümde östrojen ve östrojenin kemik rejenerasyonundaki etkisi ayrıntılı olarak açıklanmıştır.

2.3 Östrojen

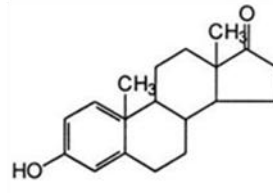
Östrojen, vücutta büyüme, farklılaşma ve üreme sisteminin fonksiyonları üzerinde etkili olup kolesterol türevi steroid yapıda bir hormondur. Bir kadında östrojen gebelik dışında büyük oranda overlerden, küçük miktarda da adrenal korteksten salgılanır. Gebelikte ise çok büyük miktarlarda plasentadan salgılanır. Kadın plazmasında bulunan üç tip östrojen vardır. Bunlar, 17- β estradiol, estron ve estrioldür (Ganong, 2003). Şekil 2.6.'da östrojen çeşitlerinin kimyasal yapıları gösterilmiştir.

Salgılanan başlıca östrojen olan 17- β estradiol, dolaşımda estron ile denge halindedir. Estron, daha sonra estriole dönüşür. Bu dönüşümün büyük bir kısmı karaciğerde gerçekleşir. Bu üç östrojen içinde etkisi en kuvvetli olan 17- β estradiol, en zayıf olanı ise estrioldür. Dolaşımdaki estradiolün %2'si serbesttir. Kalanının ise %60'ı albümine, %38'i ise gonadal steroid-bağlayıcı globuline bağlıdır (Guyton, 2005).

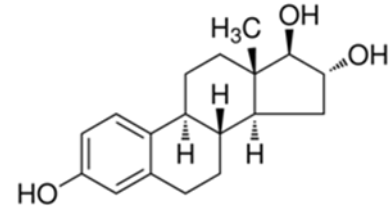
Östrojenler, 18 karbonlu steroidlerdir. 17- β estradiol (E2); 2 hidroksil grup içeren bir molekül yapıya sahiptir. Kimyasal gösterimi: estra-1,3,5 (10)-trien-3,17(beta)-diol'dür. Kimyasal formülü $C_{18}H_{24}O_2$ olup molekül ağırlığı 272.39 g/mol'dür (Guyton, 2005).



17-β Estradiol



Estron



Estriol

Şekil 2.6. 17- β estradiol, estron ve estriol'ün kimyasal yapıları.

17-β estradiol (E2), östrojenik kuvvetinin en yüksek olmasından dolayı östrojen kaynağı olarak rejeneratif tıp alanında kullanılmaktadır. E2, hidrofobik yapıda olup, sudaki çözünürlüğü 5 mg/L'dir (Guyton, 2005). Östrojenin sudaki çözünürlüğünü arttırmak için nano-mikro partiküller, lipozomlar ve siklodekstrinler kullanılmaktadır.

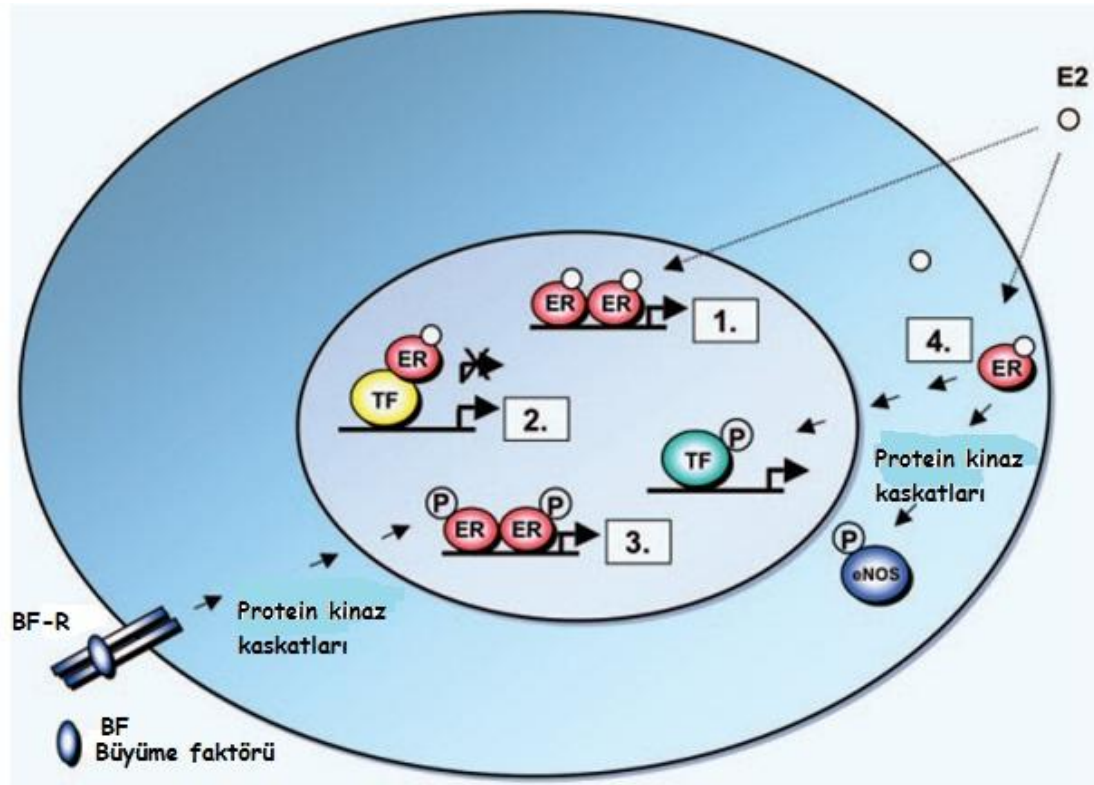
2.3.1. Östrojen reseptörleri

Östrojen reseptörü (ER); ligand bağımlı transkripsiyon faktörlerinin süper ailesine ait olup, bir nükleer hormon reseptörüdür. Bugüne kadar ERα ve ERβ olmak üzere iki farklı çeşidi tanımlanmıştır. ERα, 66 kDa moleküler ağırlıkta olup, 595 amino asit içerir. ERβ ise ERα' dan daha kısa olup, 54 kDa moleküler ağırlıkta ve 530 amino asitten oluşmaktadır (Kuipper et al., 1996).

Östrojen reseptörleri kemik doku dışında merkezi sinir sistemi, kardiyovasküler sistem, immün sistem, ürogenital sistem, sindirim sistemi, böbrekler, karaciğer, akciğerler ve memede eksprese olmaktadır.

2.3.1.1. Östrojen reseptör sinyalinin mekanizmaları

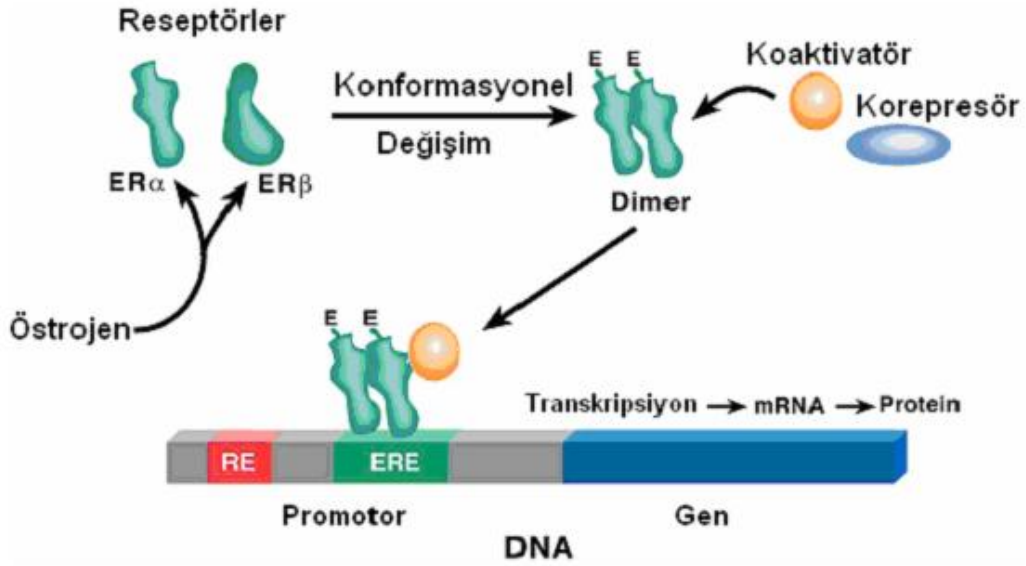
Östrojen, farklı mekanizmalarla hücrel değişiklikleri indükler. Östrojen etkisini reseptörlere bağlanarak üç çeşit mekanizma ile gösterir. Bunlar: i) Östrojen cevap elementi (ERE) bağımlı genomik mekanizma (klasik mekanizma), ii) ERE bağımsız genomik mekanizma ve iii) Östrojenin genomik olmayan etki mekanizmasıdır. Bu mekanizmalar Şekil 2.7.'de şematik olarak gösterilmiştir.



Şekil 2.7. ER sinyal mekanizmalarının şematik gösterimi.: 1) genomik mekanizma 2) ERE bağımsız genomik mekanizma 3) genomik olmayan mekanizma; büyüme faktörü aracılığıyla aktifleşen protein kinaz kaskatı fosforilasyonu başlatır ve çekirdekte ERE bölgesine yerleşmiş olan ER'nin aktivasyonu başlatılır 4) genomik olmayan mekanizma; E2-ER kompleksi, protein-kinaz kaskatlarının aktivasyonunu sağlar ve sitoplazmadaki proteinlerin fonksiyonunun değişmesine neden olur (Björnström ve Sjöberg, 2005).

Östrojen cevap elementi (ERE) bağımlı genomik mekanizma (klasik mekanizma)

Östrojenin etkisini gösterdiği klasik (genomik) mekanizmada, östrojen hücreye difüze olur ve çekirdekte bulunan ER'ye bağlanır. Bu bağlanma reseptörde konformasyonel bir değişikliği uyarır ve hsp90 şaperonlarına bağlı haldeki reseptörün hsp90 şaperonundan ayrılmasını sağlayarak reseptör dimerlerinin oluşumunu sağlar (Klinge, 2001). Meydana gelen östrojen-ER kompleksi, koaktivator ya da korepresör proteinlerle birlikte hedef genin promotör ve/veya hızlandırıcı (enhancer) bölgesinde yer alan ve östrojen cevap elementi (ERE) olarak bilinen spesifik cevap elementine bağlanır (Şekil 2.7.1 ve Şekil 2.8.). Sonuçta bazen hedef genin transkripsiyonu uyarılır, bazen de inhibe edilir ve ilgili protein konsantrasyonu hücrenin ihtiyacına göre düzenlenmiş olur (Björnström ve Sjöberg, 2005).



Şekil 2.8. ER tarafından gen transaktivasyonunun mekanizması (Osborne, 2000).

ERE bağımsız genomik mekanizma

ER'ler DNA 'ya doğrudan bağlanmadan (hedef gen bölgesinde yer alan östrojen cevap elementine, ERE, bağlanmadan) gen ekspresyonunu düzenler (Björnström ve Sjöberg, 2005).

Bu mekanizmada E2-ER kompleksi hedef genin promotör bölgesine bağlanacak olan transkripsiyon faktörüne protein-protein etkileşimi aracılığıyla bağlanır ve bu faktörün uyarılmasını sağlar. Uyarılan transkripsiyon faktörü de hedef bölgeye bağlanarak gen ekspresyonunu düzenler (Şekil 2.7.2) (Bonnie ve Korach, 2006). Kemik rezorbsiyonunda etkili olan interlökin-1 (IL-6) geninin 17- β estradiol aracılığıyla baskılanması, ER ile iki transkripsiyon faktörünün, nükleer faktör κ B (NF- κ B) ve CCAAT/hızlandırıcı bağlama proteini β (C/EBP β), etkileşimi ile gerçekleşir (Björnström ve Sjöberg, 2005).

Östrojen yokluğunda, büyüme faktörü aracılığıyla aktifleşen protein kinaz kaskatı fosforilasyonu başlatır. Sonuçta, ERE üzerinde bulunan çekirdek ER'leri fosforillenerek aktifleşebilir ve bu şekilde de östrojen hücrede genomik etki sağlayabilir (Şekil 2.7.3) (Bonnie ve Korach, 2006).

Östrojenin genomik olmayan etki mekanizması

Östrojen birçok etkisini ER'ler ile gen ekspresyonu üzerinde göstermektedir. Bununla birlikte östrojenin RNA aktivasyonu ve protein sentezine bağımlı olmayan etkileri de bulunmaktadır. Membran üzerinde bulunan ER'lere bağlanarak oluşan E2-ER kompleksi, protein-kinaz kaskatlarının aktivasyonunu sağlar ve sitoplazmadaki proteinlerin fonksiyonunun değişmesine neden olur (Şekil 2.7.4) (Bonnie ve Korach, 2006).

ER α ve ER β , MAPK sinyal yolunu aktive ederek fosforilasyona katılmaktadır (Björnström ve Sjöberg, 2005). MAP kinazlar, "Mitojenlerle aktive edilen protein kinazlar" süper ailesinde yer alırlar. Ökaryotik hücrelerin tümünde mevcut olan bu proteinler hücre membranından çekirdeğe bilgi aktarılmasında büyük önem taşımaktadır. MAP kinaz yolu, reseptör aracılı uyarının hücre içine iletiminden sorumlu bir kinaz kaskadı olarak çalışmaktadır (Doğan ve Güç, 2004).

Ayrıca, östrojenin genomik olmayan etkisi hedef transkripsiyon faktörü üzerinde etkili olan sinyal iletim yolunun aktivasyonunu sağlayarak dolaylı bir şekilde gen ekspresyonuna etki etmesiyle gerçekleşmektedir (Şekil 2.7.4). Bu özellik protein kinazın rol oynadığı fosforilasyon aracılığıyla düzenlenen aktive edici protein (AP-1)'in de içinde bulunduğu birçok transkripsiyon faktöründe etkilidir (Bonnie ve Korach, 2006).

Membran ER'leri, İnsülin benzeri büyüme faktörü (IGF-1) reseptörü ile etkileşerek IGF-1 reseptörünün aktivasyonunu ve sonuçta MAPK sinyal yolu aktivasyonunu gerçekleştirmektedir. 17- β estradiol aracılığıyla MAPK sinyal yolunun aktivasyonu geniş ölçüde göğüs kanseri, endotel hücreler ve kemik hücrelerini içeren birçok hücre çeşidinde çalışılmıştır. 17- β estradiol ayrıca endotel hücrelerde, göğüs kanseri ve karaciğer hücrelerinde fosfoinositol (PI) 3-kinaz sinyal yolunu aktive etmektedir (Björnström ve Sjöberg, 2005).

2.3.2. Östrojenin vücuttaki etkileri

Bir steroid hormonu olan östrojen vücutta pek çok sistem üzerine etki etmektedir. Uterus, vajina, overler, plasenta, meme, beyin, yağ dokusu, karaciğer, böbrek, akciğer ve kemikler üzerinde östrojen reseptörleri varlığı belirlenmiştir (Guyton, 2005).

Östrojen, kadın üreme organları üzerinde anabolik etki sağlar. Overlerde yumurta oluşumunu uyarır ve folikül büyümesini başlatır. Metabolizmada protein sentezini ve deri altı yağ dokusunu artırır. Kollajen sentezini artırarak derinin yumuşak ve düzgün olmasını sağlar. Ayrıca, böbreklerde su ve tuz tutulumunu artırmaktadır (Philip et al., 1996).

Östrojenin büyüme üzerine çift fazlı etkisi vardır. Büyüme hormonunu (GH) uyararak büyümeyi artırır (Eastel, 2005). Ross ve arkadaşlarının (1983) yaptığı çalışmada Turner sendromlu hastalar, estradiol ile tedavi edilmiş ve sonuçta yüksek doz estradiol ile büyümenin yavaş, düşük doz ile büyümenin daha hızlı olduğu kanıtlanmıştır (Ross et al., 1983).

Östrojen, koroner arter hastalığını önlemektedir. Östrojen reseptörü içeren hepatositler ve karaciğerdeki hormonlar, kolesterol metabolizmasına etki eden enzim üretimini uyarır. İzotopla işaretlenmiş kolesterol, kadında östrojenin kötü huylu kolesterol olarak bilinen düşük yoğunluklu lipoprotein (LDL) kolesterol yıkımını ve iyi huylu kolesterol olarak bilinen yüksek yoğunluklu lipoprotein (HDL) kolesterol üretimini arttırdığını göstermiştir. Ayrıca östrojen, arteriyel duvarlarda platelet agregasyonunu ve lipoprotein oksidasyonunu önler, böylece antioksidan etki ile ateroskleroza engellemiş olur. Östrojen, endotelyumda vazodilatör bir ajan olan endotelial kaynaklı gevşetici faktör (EDRF) salımını uyararak vazodilatör (damar gevşetici) etki yapar (Philip et al., 1996).

Östrojen, beyinde kan akımını artırır, metabolizmayı hızlandırır ve nöral ağların etkinliğini artırır. Ayrıca, serotonin salgısını artırır (Philip et al., 1996). Östrojenin vücutta fazla miktarda salgılanması ise özellikle meme kanserine neden olmaktadır.

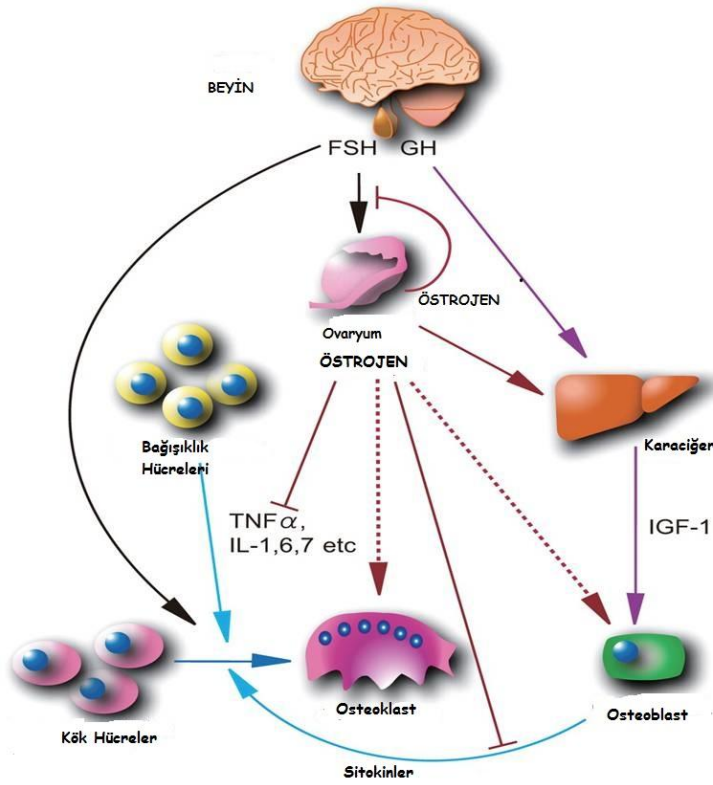
2.3.2.1. Östrojenin kemik doku üzerindeki etkileri

1988 yılında kemik hücrelerinin fonksiyonel östrojen reseptörlerini içerdiği saptanmış ve daha sonraki çalışmalarda da östrojenin kemik üzerindeki etkileri ortaya konmuştur (Riggs, 2000).

Östrojen reseptörleri (ER- α ve ER- β) osteoblast ve osteoklastlar üzerinde tanımlanmışlardır. İmmunolojik çalışmalarla ER- α kortikal kemikte, ER- β ise trabeküler kemikte tanımlanmıştır (Nappi et al., 2012).

Östrojenin kemik metabolizmasına etkisi, kemik doku üzerinden gerçekleşmektedir. Burada dolaylı ya da doğrudan etkileri söz konusudur. Östrojen kemik doku üzerinde, kemik oluşumunu artırarak, kemik yıkımını azaltmaktadır ve kemik döngü (turnover) hızını yavaşlatmaktadır (Seyisoğlu, 1999).

Östrojen, osteoblastlar üzerinde anabolik etki sağlayarak kemik oluşumunu artırır (Compston, 2001). Bu etkinin kanıtı östrojen yokluğunda ve varlığında, fare ve insanlarda yapılan histolojik ve biyokimyasal çalışmalarla ER'lerin ve osteoblastik gen ekspresyonlarının belirlenmesi ile gösterilmiştir (Tobias ve Compston, 1999). Östrojenin kemik hücreleri üzerindeki etkisi Şekil 2.9'da şematize edilmiştir.



Şekil 2.9. Östrojenin kemik hücreleri üzerindeki etki mekanizmaları.

Östrojenin kemik yapımı üzerindeki etkileri

- Osteoblastik hücrelerde östrojen, alkalin fosfataz (ALP) ve tip 1 kollajen ekspresyonunu artırarak mitojenik etki göstermektedir (Compston, 2001).
- Östrojen, kemik oluşum düzenleyici ve uyarıcılarından IGF-1 ve TGF-β ve BMP-2 mRNA ekspresyonlarını artırarak kemik oluşumuna katkı sağlamaktadır (Zhau, 2003; Seyisoğlu, 1999). IGF-1 kemik hücresinin

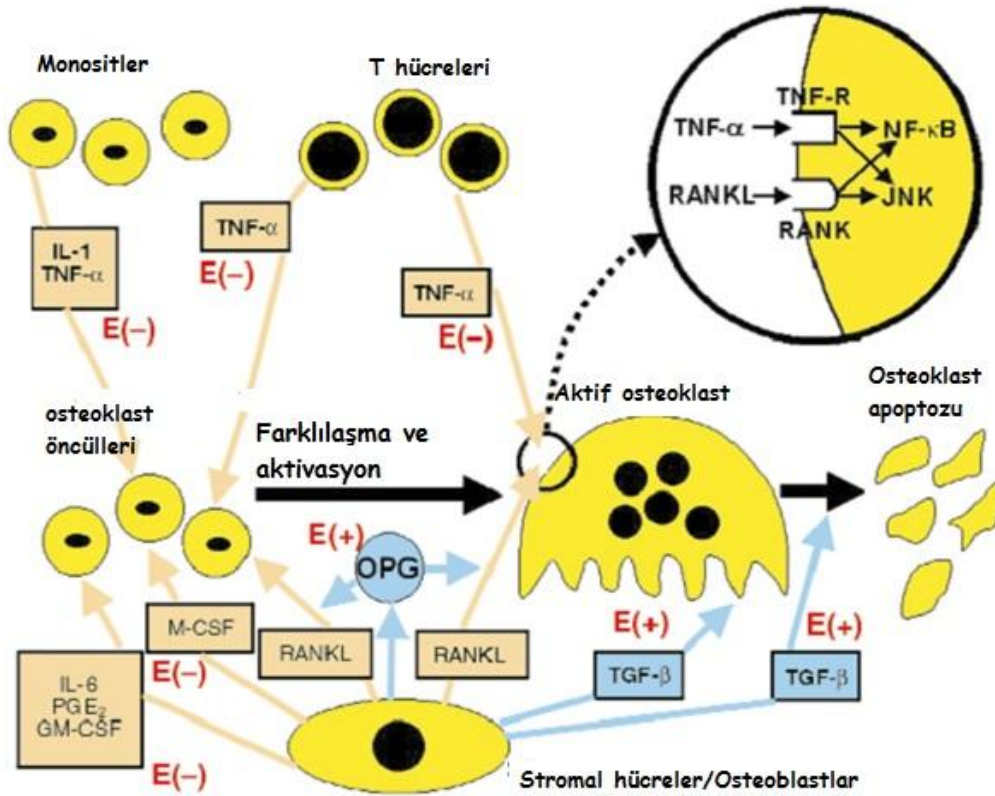
proliferasyonunu, farklılaşmasını, DNA sentezini, kollajen ve nonkollajen proteinlerin sentezini arttırmaktadır. TGF- β hücrenin integrin reseptörlerini uyarmak yoluyla hücre dışı matris bileşenlerinden olan kollajen, fibronektin ve proteoglikanların oluşumunu arttırmaktadır. Ayrıca, bağ dokusunda hasara yol açan proteolitik enzimleri baskılamakta, sonuç olarak granülasyon dokusu oluşumuna etki etmektedir (Roith, 1997).

- Östrojen ayrıca büyüme hormonu (GH)'nunun salımını arttırarak da kemik oluşumuna katkı sağlamaktadır.

Östrojenin kemik yıkımı üzerindeki etkileri

- Osteoprotegrin (OPG)/reseptör aktivatör nükleer kappa B ligandı (RANKL) oranının kemik kütlesini belirleyen esas faktör olduğu belirtilmiştir (Eastel, 2005). 17- β estradiol, osteoblastlar üzerindeki reseptörlere bağlanarak, OPG mRNA seviyelerini arttırmaktadır ve böylece kemik yıkımını önlemektedir. RANKL'ın kemikteki ana görevi osteoklast oluşumunu sağlayarak kemik kaybı ve rezorpsiyonunu arttırmaktır (Kurban, 2007). RANK, preosteoklastlara, RANKL'ın bağlanmasını sağlayan bir reseptör olup, osteoklastojenez ve kalsiyum metabolizmasını kontrol etmektedir (Takayanagi, 2005). OPG'nin kemik dokudaki biyolojik etkileri RANK/RANKL'ın etkisi ile terstir. Dolayısıyla RANKL sentezini inhibe ederek ve bu yolla antirezorptif etki göstermektedir (Şekil 2.10) (Eastel, 2005).
- Östrojen kemik ve hemapoetik hücreler tarafından sentezlenen bir sitokin olan tümör nekroz faktör (TNF) ve interlökin-1 (IL-1) sentezini yavaşlatarak kemik rezorpsiyonunda azalma sağlamaktadır.
- Östrojen ayrıca, interlökin 6 (IL-6) aktivasyonu için gerekli olan transkripsiyon faktörü NF- κ B'nin aktivasyonunu bloke ederek kemik resorpsiyonunu arttıran bir sitokin olan IL-6 üretimini önlemektedir. Overleri alınmış tavşanlar üzerinde yapılan in-vivo çalışmalar, kemik iliği hücrelerinde IL-6 üretiminin arttığını ve IL-6 reseptörü olan IL-6R'nin ekspresyonunun arttığını göstermiştir (Compston, 2001).

- Prostaglandinler, özellikle E serisi prostaglandinler, kemik formasyon ve rezorpsiyonunun lokal düzenleyicilerindendir. Düzeyleri artınca kemik yapım ve yıkım hızı yani döngü (turnover) hızı artmaktadır. Postmenopozal dönemde kullanılan düşük doz östrojenler, özellikle E serisi (PGE₂) olmak üzere prostaglandin sentezini azaltmakta ve bu yolla kemik döngüsü (turnover) hızının yavaşlamasına yardımcı olmaktadır (Seyisoğlu, 1999).



Şekil 2.10. Kemik mikroçevresinde osteoklast fonksiyonunu düzenleyen temel sitokinler. Uyarıcı faktörler turuncu, inhibe edici faktörler mavi renkle belirtilmiştir. Östrojenin düzenleyici proteinler üzerindeki pozitif (+) ve negatif (-) etkisi kırmızı renkle gösterilmiştir. Büyük çerçeve içinde TNFα ve RANKL' nin ayrı ayrı reseptörleri ile etkileşimi ve sonuçta her ikisinin de NF-κB ve JNK hücre içi sinyal yolağını aktive etmesi gösterilmektedir. GM-CSF: granülosit makrofaj-koloni-uyarıcı faktör (Riggs B., 2000).

Östrojen, vücutta kalsiyum dengesinin sağlanmasında rol oynayarak kemik metabolizmasına etki etmektedir. Öncelikle böbreklerde vitamin D sentezini hızlandırmaktadır. Dolayısıyla bağırsak emilim yüzeyi artmakta, kalsiyum taşınmasında görevli proteinlerin sentezi hızlanmakta ve dolayısıyla bağırsaktan kalsiyum emilimi artmaktadır. Ayrıca kemik dokuda parathormon (PTH)'a karşı

kısmi direnç oluşturmakta ve dolaylı yoldan serum PTH düzeylerini arttırmaktadır. Artan PTH, böbrekten kalsiyum geri emilimini azaltmakta ve vitamin D biyosentezini hızlandırmaktadır. Böylece bağırsaktan kalsiyum absorpsiyonu artar ve böbrekten kalsiyum atılımı azalmaktadır (Seyisoğlu, 1999).

2.3.3. Östrojenin kök hücreler üzerindeki etkisi

Östrojen, düzenleyici etkisini östrojen reseptörleri üzerinden ortaya koymaktadır. Yapılan çalışmalarda, embriyonik kök hücreler ve mezenkimal kök hücreler başta olmak üzere birçok öncül hücrede östrojen reseptörlerine rastlanmıştır (Hong et al., 2004, Ramalho et al., 2001). Dieudonne ve arkadaşlarının yaptığı çalışmada gerçek zamanlı polimeraz zincir reaksiyonu (RT-PCR) analizi ile insan adipozitlerinde ER- β ve ER- α mRNA ekspresyonu gözlenmiştir. Adipoz doku öncül hücreleri olan AdMSC'lerde ER reseptörleri bulunmuştur (Dieudonne, 2004).

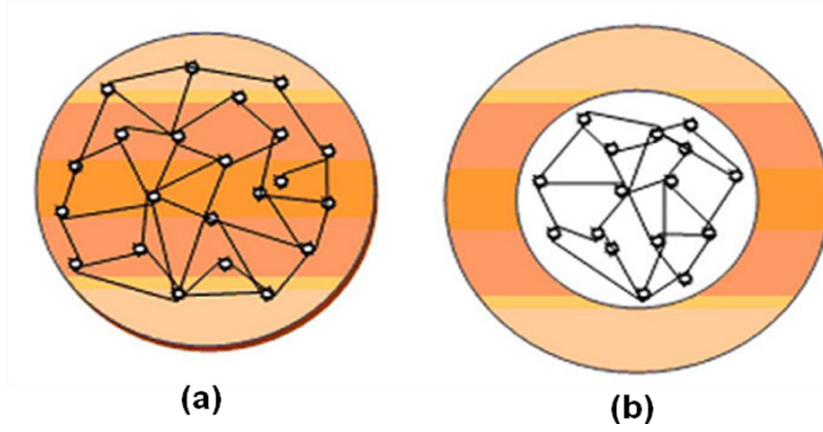
Östrojenin kemik iliği kök hücrelerinin farklılaşmasına olan etkisinin incelendiği bir çalışmada, östrojenin mezenkimal kök hücrelerinin osteoblastik farklılaşmasını arttırdığı gözlenmiştir (Ray et al., 2008).

Hong ve arkadaşlarının yaptığı çalışmada (2006) kemik iliğinden elde edilen MSC'ler 17- β estradiol varlığında osteojenik farklılaşma ortamına maruz bırakılmıştır. Yapılan analizler sonucu, osteojenik farklılaşma belirteçleri olan ALP, çekirdek bağlayıcı protein (cbfa-1) genlerinin ve kemik dönüşüm belirteci olan osteokalsin (OCN) geninin ekspresyonunun, ekstraselüler matris sentezinin ve mineralizasyonun östrojensiz ortama göre daha fazla miktarda arttığı gözlenmiştir. Aynı grup (Hong et al., 2007) bu kez AdMSC'leri, farklı konsantrasyonlarda bulunan 17- β estradiol varlığında osteojenik farklılaşma ortamına maruz bırakmışlardır. Sonuçta 10^{-8} M konsantrasyonuna sahip E2'nin farklılaşmaya etkisinin daha fazla olduğu ALP aktivasyonu tayini ile belirlenmiştir. Ayrıca, osteojenik farklılaşma gen ekspresyonlarında östrojensiz ortama göre artış gözlenmiştir.

2.4. Nanopartiküller

Nanopartiküller boyutları 10-1000 nm arasında değişen katı partikül ya da dispersiyon partikül olarak tanımlanmaktadırlar. Biyoaktif ajanlar (ilaç, biyosinyal molekül vb.) nanopartikül matrise bağlanabilir, enkapsüle edilebilir ya da

gömülebilir. Üretim yöntemine göre nanopartiküller, **nanoküreler** ya da **nanokapsüller** şeklinde elde edilmektedirler (Mohanraj, 2006). Nanoküreler, biyoaktif ajanın, içinde çözündüğü ve homojen şekilde dağıldığı matris sistemlerdir. Nanokapsüller ise, biyoaktif ajanın polimer membran tarafından çevrelenen boşluğa gömüldüğü veziküler sistemlerdir (Soppimath et al., 2001) (Şekil 2.11) .



Şekil 2.11. Nanopartiküllerin şematik gösterimi.: a) nanoküre, b) nanokapsül (Soppimath et al., 2001).

Biyoaktif ajan taşıyıcı sistemlerde nanopartiküllerin kullanılmasının avantajları;

- Partikül boyutu ve yüzey karakteristiğinin kolaylıkla ayarlanabilir olması,
- Partiküllerin küçük kapillere penetre olması ve hücrelerle etkileşimlerinin sağlanması,
- Hidrofobik biyoajanların biyoyaralanımını ve sudaki çözünürlüğünü arttırması,
- Taşıyım boyunca ajanın salımının devam ettirilebilir ve kontrol edilebilir olması,
- Kontrollü salım ve partikül bozunma karakteristiğinin matris malzemesinin seçimi ile kolaylıkla ayarlanabilir olmasıdır (Mohanraj, 2006).

Birçok avantajına rağmen nanopartiküllerin dezavantajları da vardır. Küçük boyut ve geniş yüzey alanı, partikül agregasyonuna neden olarak partikülleri katı veya sıvı formda saklamayı zorlaştırmaktadır. Ayrıca yine küçük boyut ve geniş yüzey

alanı, matrise sınırlı miktarda ilaç yüklenmesine ve hızlı salıma (burst release) neden olmaktadır (Mohanraj, 2006).

2.4.1. Nanopartikül üretim yöntemleri

Nanopartiküller temelde dört şekilde üretilir:

Bu yöntemlerden en çok kullanılan dört tanesi; emülsiyon-çözücü buharlaştırma, monomerin polimerizasyonu, iyonik jelleşme ve süperkritik akışkan yöntemidir. Bu yöntemler aşağıda kısaca özetlenmiştir.

2.4.1.1. Emülsiyon-çözücü buharlaştırma yöntemi

Bu yöntemde polimer ve biyoaktif ajan, diklorometan, etil asetat gibi hidrofobik biyoaktif ajanları da çözebilen organik çözücü içerisinde çözülmemektedir. Oluşan karışım, surfaktan içeren sulu çözelti içerisine eklenerek emülsiyon oluşumu sağlanmaktadır. Küçük boyutlarda partikül eldesi ve homojen dağılım için yüksek hızlı homojenizatör ile karışma sağlanmaktadır. Kararlı emülsiyon oluşumu sağlandıktan sonra organik çözücü sıcaklık/basınç artırılarak ya da sürekli karıştırarak buharlaştırılmaktadır (Soppimath et al., 2001). Bu yöntemde poli(laktik-ko-glikolik asit) (PLGA), poli (ε-kaprolakton) gibi biyobozunur polimerler kullanılmaktadır.

2.4.1.2. Polimerizasyon yöntemi

Bu yöntemde monomerlerin ara yüzeyde polimerizasyonu ile nanopartikül formu oluşturulmaktadır. Önce yağ/su (o/w) emülsiyonu hazırlanır ve bu emülsiyona polimerleri oluşturacak monomer çözeltisi eklenerek polimerizasyon gerçekleştirilir. Biyoaktif ajanlar polimerizasyon ortamında çözünmüş olarak ya da polimerizasyon tamamlandıktan sonra adsorpsiyon ile nanopartiküle yüklenmektedir. Nanopartikül süspansiyonu, surfaktan ve stabilizatörleri uzaklaştırmak için yüksek hızlı santrifüj kullanılarak ve izotonik surfaktansız ortam ile yeniden süspanse edilmektedir (Gürsoy, 2002).

2.4.1.3. İyonik jelleşme yöntemi

Kitosan, aljinat, jelatin gibi hidrofilik malzemelerden nanopartikül oluşturmak için iyonik jelleşme yöntemi kullanılmaktadır. Bu yöntemde, biri katyon ve diğeri anyon olmak üzere iki sulu faz karışımı oluşturulmaktadır. İyonik jelleşme işlemi karışım

içindeki katyon ile anyon grupların iyonik etkileşimi sonucunda, polimer çözeltisinin sıvı formdan jel formuna geçmesi ile gerçekleşmektedir. Calvo ve arkadaşlarının (1997) kitosan nanopartikül eldesi için yaptığı çalışmada, kitosan ve bir kopolimer olan polietilen oksit (PEO), polianyon olarak ise sodyum tripolifosfat kullanılmıştır. Jel oluşumu, kitosanın pozitif yüklü amin grupları ile sodyum tripolifosfatın negatif yüklü fosfat grupları arasındaki iyonik etkileşim ile gerçekleşmektedir.

2.4.1.5. Süperkritik akışkan yöntemi

Konvansiyonel yöntemlerde kullanılan organik çözücülerin zararlı etkisinden kurtulmak için geliştirilen bu yöntemde, biyobozunur mikro-nano boyutlarda partikül eldesi süperkritik akışkan kullanılarak gerçekleştirilmektedir. Süperkritik akışkan, kritik sıcaklığın üzerindeki maddeler için kullanılan bir terimdir. Bu yöntem ile partikül üretiminde süperkritik akışkan olarak en çok CO₂ ve su kullanılmaktadır (Mohanraj, 2006). Süperkritik akışkan yönteminde genel olarak iki yaklaşım kullanılmaktadır. Süperkritik akışkanın ani genişmesi (Rapid expansion of supercritic fluids) (RESS) ve süperkritik anti çözücü yöntemidir (Mishra et al., 2010).

RESS metodunda çözünmesi istenen polimer ve süperkritik akışkandan oluşan çözelti enjektör aracılığıyla genişletilmektedir. Sonuçta yoğunluk, aşamalı olarak azalırken; çözünen polimer, nanopartikül çökelti olarak birirmektedir. Bu yöntemde çözücü, ortamdan tamamen uzaklaştığı için üretilen nanopartiküllerin toksik etkisi gözlenmemektedir. RESS yöntemi ile, düşük molekül ağırlıklı (<10000) polimerler kullanıldığında, homojen ve düzgün nanopartiküller elde edilmiştir. Ancak, yüksek molekül ağırlıklı polimerlerin, çözünürlüklerinin sınırlı olmasından dolayı yöntem uygulanamamaktadır (Mishra et al., 2010).

Süperkritik anti çözücü yönteminde ise polimeri çözmek için süperkritik akışkan ile tamamen karışan sıvı çözücü ve süperkritik akışkan (CO₂) kullanılmaktadır. Polimer ve CO₂ bulunan çözeltiye yüksek basınç altında sıvı fazda çözücü verilmektedir. Çözücünün ani difüzyonu aşırı doygunluk ile sonuçlanmakta ve çökelti oluşmaktadır. CO₂ geçişi çözeltiden çözücünün tamamen arındırılması için devam etmektedir (Mishra et al., 2010).

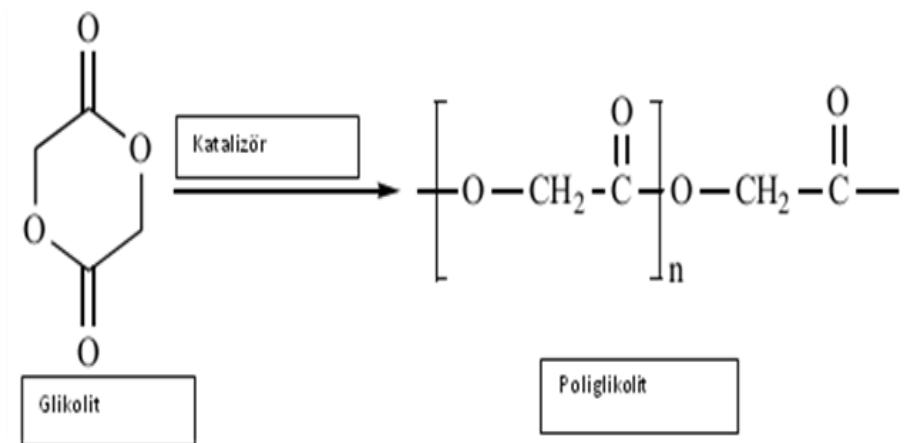
2.4.2. Nanopartikül üretiminde kullanılan polimerler

Nanopartikül üretiminde kullanılacak matris malzeme seçimi birçok faktöre bağlıdır. Bunlar: İstenen partikül boyutu, yüzey karakteristiği (yükü, geçirgenliği), biyobozunma derecesi, biyouyumluluk, toksisite, istenen ilaç salım profili ve son ürün antijenitesidir (Mohanraj, 2006). Poliester tabanlı poli-laktik asit (PLA), poli(laktik-ko-glikolik asit) (PLGA) ve polikaprolakton (PCL) salım sistemlerinde yaygın olarak kullanılan polimerlerdir.

Sunulan tez çalışmasında nanopartiküllerin hazırlanması amacıyla poli (laktik-ko-glikolik asit) (PLGA) kopolimeri kullanılmıştır. Bu nedenle aşağıda PLGA ile ilgili bilgi sunulmuştur.

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

Poliester PLGA, FDA tarafından onaylı PLA ve PGA polimerlerinin birleşmesiyle oluşan sentetik bir kopolimerdir. PLGA, polikondenzasyon reaksiyonu ile ya da siklik diesterlerin halka açılma polimerizasyonu ile sentezlenmektedir (Şekil 2.12). Halka açılma polimerizasyonu, daha kısa reaksiyon süresi ve yüksek monomer dönüşüm oranı ile PLGA üretiminde tercih edilen yöntemdir (Stevanovic, 2009)



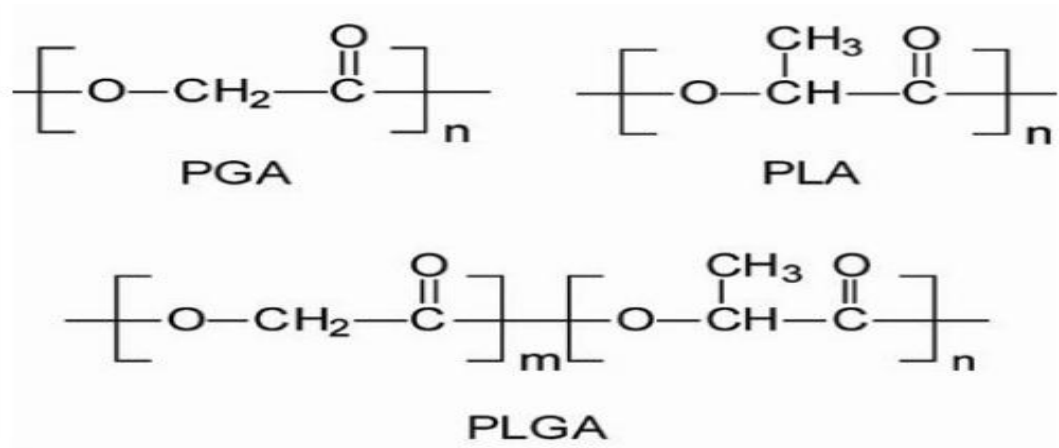
Şekil 2.12. Glikolitin halka açılma polimerizasyonu ile PGA sentezi.

Glikolit monomeri glikolik asitin dimerizasyonu ile oluşur. Laktik ise laktik asitin siklik dimeridir ve D ve L olmak üzere iki optik izomere sahiptir. PLA, PGA ve

PLGA polimerlerinin fiziksel özellikleri Çizelge 2.1.'de, kimyasal yapıları ise Şekil 2.13'de verilmiştir.

Çizelge 2.1. PLA, PGA ve PLGA polimerlerinin fiziksel özellikleri.

Polimer Cinsi	Kristalinite	Camsı geçiş sıcaklığı T _g (°C)	Bozunma Süresi
PGA	Kristal	35-40	2-4 ay
PLLA	Yarıkristal	50-80	>2 yıl
PDLA	Amorf	55-60	12-18 ay
PLGA	Amorf	40-60	Bileşime bağlı



Şekil 2.13. PGA, PLA ve PLGA'nın kimyasal yapıları.

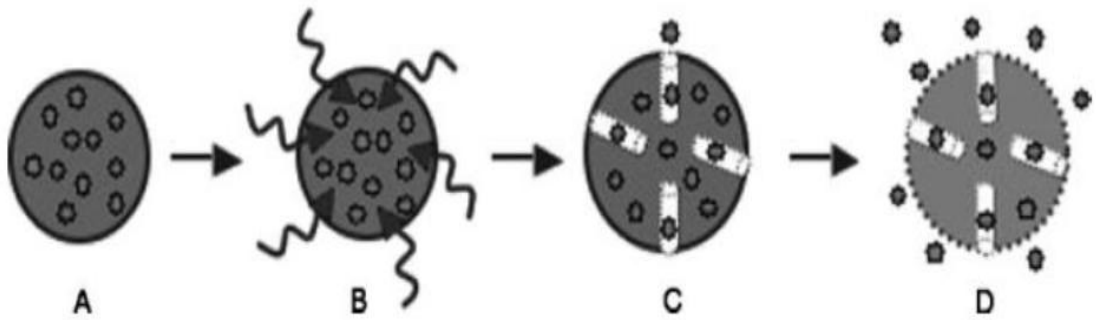
PLGA'nın kristalinitesi; mekanik dayanımını, hidroliz koşullarını, şişme özelliklerini ve biyobozunma oranını doğrudan etkilemektedir. PGA, hidrofilik yapısı nedeniyle sulu ortamlarda ve hücre içinde hızla çözünür ve kısa bir sürede yapısal bütünlüğünü kaybeder. PLA, yapısındaki metil yan gruplarının varlığından dolayı hidrofobik yapıdadır ve dolayısıyla hidrolizi yavaştır. PLGA'nın yapısındaki zengin

laktik içeriği PLGA' yı daha hidrofobik yapar, daha az su absorplamasını ve daha geç bozunmasını sağlar (Hirenkumar et al, 2011).

2.4.3. PLGA nanopartiküllerden salım mekanizması

PLGA kopolimeri hidroliz sonucu ester bağlarının bozunması ile oligomerlerine ve en sonunda da monomerlerine dönüşmektedir. PLGA'nın bozunma prosesi, yığın bozunma ve yüzey erozyonu şeklinde gerçekleşmektedir. Bozunma ilk olarak amorf matris bölgesinde başlamakta ardından daha yavaş şekilde kristal bölgede devam etmektedir (Stevanovic, 2009). PLGA kopolimerinin biyobozunma oranı, polimer zincirindeki laktik ve glikolik asit oranına, polimerin molekül ağırlığına, kristallik derecesine, polimerin camsı geçiş sıcaklığına ve matrisin morfolojisine, boyutlarına, depolanma koşullarına bağlıdır (Hirenkumar et al, 2011).

PLGA nanopartiküllerden biyoaktif ajan salımı iki aşamada gerçekleşmektedir (Şekil 2.14). İlk aşamada, aktif ajan ile birleştirilen polimerik matris ortam ile etkileşmekte ve ortam sıvısı matrise penatre olmaktadır, böylelikle matris şişmeye başlamaktadır. Aynı zamanda matris yüzeyi üzerindeki biyoaktif ajan da salınmaya başlamaktadır. İkinci aşamada, polimer matris ortam sıvısını absorplarken matriste difüzyon kanalları oluşmakta ve biyoaktif ajanın matristen ortama salımı artan bir şekilde olarak devam etmektedir. PLGA matrisin bozunmasıyla beraber sistem yok olmaktadır (Hirenkumar et al, 2011; Silva et al., 2007).



Şekil 2.14. Nanopartiküllerden salım mekanizmasının şematik gösterimi.: A)Biyoaktif ajan ile birleştirilen polimerik nanopartikül salım ortamı ile etkileştiriliyor B) ortam sıvısı polimerik matrise difüze oluyor ve matrisin şişmesine neden oluyor, C) matris içine giren ortam sıvısı, difüzyon kanalları oluşturuyor ve D) malzemenin bozunmasıyla birlikte sistem yok olmaya başlıyor.

Nanopartiküllerden ilaç salım kinetiği biekspansiyel fonksiyonla tanımlanmaktadır (Eşitlik 2.1).

$$C=Ae^{-\alpha t}+Be^{-\beta t} \quad (2.1)$$

C= t anında partikülde bulunan ilaç konsantrasyonu, A= Difüzyon kontrol sistemi sabiti, B= Erozyon kontrol sistemi sabiti, α , β = Oran sabitleridir (Ringe et al., 2004).

Genel olarak polimer matrinden biyoaktif ajan salım oranı çözünürlüğe, difüzyona ve matris materyalinin biyobozunurluğuna bağlıdır. Biyoaktif ajan salımı aynı zamanda yükleme verimine ve nanopartikül büyüklüğüne de bağlıdır. Küçük partikül boyutu, biyoaktif ajanın ani patlama (burst release) şeklinde salımına neden olmaktadır. Ani patlama etkisi zayıf bağlanmadan ya da geniş nanopartikül yüzeyine adsorbe olmuş çok miktarda biyoaktif ajandan kaynaklanmaktadır (Chen et al., 2003).

2.4.4. Nanopartiküllerin biyomedikal uygulamaları

Biyobozunur nanopartiküller yüksek biyoyararlanım, iyi enkapsülasyon, kontrollü salım ve düşük toksisite özelliklerine sahip olduklarından sıklıkla biyoaktif ajan taşıyıcı sistemler, olarak özellikle de suda çözünen/çözünmeyen çeşitli tıbbi ilaçların ve biyoaktif moleküllerin hasta üzerindeki terapötik etkilerini arttırmak amacıyla tercih edilmektedir.

3. DENEYSEL ÇALIŞMALAR

Bu bölümde, tez kapsamında gerçekleştirilen deneysel çalışmalar ve kullanılan yöntemler özetlenmiştir. İlk olarak 17- β estradiol (E2) yüklü poli (laktik-ko-glikolik asit) (PLGA) nanopartiküllerin üretim yöntemi ve karakterizasyon çalışmaları hakkında bilgi verilmiştir. Daha sonra kitosan/hidroksiapatit (HA) doku iskelelerinin üretim yöntemi ve PLGA nanopartiküllerin kitosan doku iskelelerine yüklenme yöntemleri özetlenmiştir. Ardından, nanopartiküllerden ve nanopartikül yüklü doku iskelelerinden 17- β estradiolün salımına yönelik olarak gerçekleştirilen deneysel çalışmalara yer verilmiştir. En son bölümde ise üretilen sistemin, sıçan adipoz kökenli mezenkimal kök hücreler üzerindeki etkilerinin incelendiği hücre kültür çalışmaları açıklanmıştır.

3.1 Malzemeler

Çalışma kapsamında 17- β estradiol'ün ticari olarak mevcut iki formu kullanılmıştır. Bunlar: 17- β estradiol toz (E8875) ve suda çözünür β -estradiol (E4389) olup her ikisi de Sigma firmasından satın alınmıştır. Nanopartikül hazırlanmasında kullanılan poli (laktik-ko-glikolik asit) (PLGA) kopolimerleri (PLA:PGA; 50:50, 65:35), ile stabilizatör olarak kullanılan didodesil dimetil amonyum bromür (DMAB) Sigma-Aldrich'den (Almanya) satın alınmıştır. Polimerler Riedel-de Haen (Almanya) firmasından temin edilen etil asetat içerisinde çözülmüştür. Partikül üretimi sırasında Heidolph (Almanya) marka yüksek hızlı homojenizatör kullanılmıştır.

Doku iskelesi hammaddesi olarak kullanılan kitosan (deasetilasyon derecesi: %75-85), hidroksiapatit toz ve çarpaz bağlayıcı ajan olan gliksal, Sigma-Aldrich'ten satın alınmıştır.

Hücre kültür çalışmalarında kullanılan Minimum Essential Medium Alpha Modification (α -MEM), penisilin-streptomisin, β -gliserol fosfat ve askorbik asit Sigma (Almanya) firmasından; Tripsin/EDTA (%0.01 tripsin/10 mM EDTA) çözeltisi Hyclone (A.B.D) firmasından temin edilmiştir. Hücrelerin metabolik aktivitelerinin takibinde kullanılan 3-[4,5-dimetiltiazol-2-il]-difenilterazolyum bromür (MTT) ve sodyum dodesil sülfat (SDS), SEM analizi için örnek hazırlamada kullanılan hekzametildisilazan (HMDS), Sigma-Aldrich (Almanya); ALP aktivitesinin

belirlenmesinde kullanılan Triton X-100 Sigma (Almanya), 2-amino 2-metil-1,3-propanol Aldrich (Almanya), magnezyum klorür ($MgCl_2$) ve sodyum hidroksit (NaOH) ise Merck (Almanya) firmalarından satın alınmıştır. RNA izolasyonunda kullanılan Trizol ise Invitrogen (A.B.D) firmasından temin edilmiştir.

3.2. 17- β Estradiol Yüklü PLGA Nanopartiküllerin Hazırlanması

3.2.1. PLGA nanopartiküllerin sentezi

Farklı PLA/PGA (50:50 ve 65:35) bileşimlerine sahip PLGA nanopartiküller emülsiyon-çözücü buharlaştırma yöntemi ile hazırlanmıştır. Kısaca, PLGA kopolimeri etil asetat içerisinde çözülerek oluşturulan % 2'lik (w/v) organik faz, içerisinde % 1 oranında (w/v) didodesil dimetil amonyum bromür (DMAB) bulunan sulu faza ilave edilmiş ve oluşan karışım yüksek hızlı homojenizatörde 15,000 rpm'de karıştırılmıştır. Sonrasında karışıma sıcak su eklenerek organik fazın buharlaşması beklenmiştir. Ardından, sulu fazda süspanse halde elde edilen PLGA nanopartiküllerin yıkama işlemi yüksek hızdaki (13,000 rpm) santrifüj (Heraeus, Almanya) kullanılarak gerçekleştirilmiştir.

3.2.2. PLGA nanopartiküllere 17- β estradiol yüklenmesi

PLGA nanopartiküllere 17- β estradiol yüklenmesi aşamasında 17- β estradiol/PLGA oranı 10 (w/w) olacak şekilde hazırlanan karışım etil asetat içerisinde çözülmüş ve boş PLGA nanopartikül üretimindeki işlemler aynen uygulanarak 17- β estradiol yüklü PLGA nanopartiküller hazırlanmıştır.

3.3. PLGA Nanopartiküllerinin Karakterizasyon Çalışmaları

3.3.1. Partikül boyutunun belirlenmesi

Üretildikten sonra sulu faz içerisinde muhafaza edilen PLGA nanopartiküllerin boy ve boy dağılımlarının belirlenebilmesi için, nanopartiküllerin bulunduğu çözelti 1:10 oranında seyreltilmiş ve Zetasizer (Nano series, İngiltere) ile ölçümler gerçekleştirilmiştir.

3.3.2. FTIR analizi

17- β estradiol yüklü PLGA nanopartiküllerin kimyasal yapılarının belirlenebilmesi için partikül haline getirilmemiş PLGA polimerinin, DMAB'nin, 17- β estradiol, 17- β estradiol içeren ve içermeyen (boş) PLGA nanopartiküllerin 400-4000 cm^{-1} dalga boyu aralığında FTIR (Thermo Fisher Scientific, Nicolet iS10, Waltham, MA, ABD) spektrumları alınmıştır.

3.3.3. Taramalı elektron mikroskop (SEM) analizi

Sulu fazda bulunan boş ve 17- β estradiol yüklü PLGA nanopartiküller, analiz yapılacak yüzeye damlatılıp, kurutulduktan sonra altın-paladyum ile kaplanmış ve Zeiss marka (Evo-50, Almanya) taramalı elektron mikroskobu ile incelenmiştir.

3.3.4 Geçirimli elektron mikroskobu (TEM) analizi

Sulu fazda bulunan boş PLGA nanopartiküller, analiz yapılacak yüzeye damlatılıp FEI Technai Spirit G² Bio Twin marka (Hollanda) geçirimli elektron mikroskobu ile incelenmiştir.

3.3.5. 17- β estradiol enkapsülasyon veriminin belirlenmesi

PLGA nanopartiküllerin, üretim sırasında ortamda bulunan 17- β estradiol'ün ne kadarını enkapsüle edebildiğini belirlemek amacıyla 2 farklı yöntem denenmiştir.

İlk yöntemde, nanopartiküller uygun çözücü içerisinde çözülerek kapsüle olan östrojenin dışarıya alınması sağlanmış ve ardından UV spektrofotometrisi (280 nm'de) aracılığıyla enkapsülasyon verimi hesabı yapılmıştır. Yöntemin ayrıntıları şöyledir: Kalibrasyon grafiği oluşturmak için 17- β estradiol diklorometan (DCM)/metanol (60:40) karışımı içinde çözdürülerek 1 mg/mL derişiminde stok çözelti hazırlanmıştır. Stok çözelti DCM/metanol karışımı ile seyreltilerek E2'nin farklı konsantrasyonlarda standart çözeltisi elde edilmiştir. Daha önceden liyofilize edilerek kurutulan ve toz halde bulunan nanopartikülün miktarı hassas terazide tartılarak belirlenmiştir. Miktarı belirlenen partikül, Ependorf tüpüne koyulmuştur. Üzerine 2 mL DCM/metanol (60:40) karışımı eklenerek vortekslenmiş ve estradiolün çözünmesi sağlanmıştır. Elde edilen çözeltinin UV spektrofotometrisinde 280 nm dalga boyundaki absorbansı ölçülmüştür.

Kalibrasyon grafiğinden konsantrasyon belirlenmiş (Ek.1) ve ardından % enkapsülasyon verimi hesaplanmıştır.

İkinci yöntemde ise; enkapsülasyon çözeltisindeki başlangıç estradiol konsantrasyonu ve enkapsülasyon sonrasındaki çözeltide kalan estradiol konsantrasyonu arasındaki fark ölçülmektedir. Yöntemde nanopartikül üretiminin son aşaması olan yıkama/santrifügasyon aşamasında E2 yüklü nanopartiküllerin süpernatant ve yıkama suları toplanmıştır. Elde edilen karışım iyice vortekslelendikten sonra alınan 20µL numune, HPLC (Dionex Ultimate 3000) C18 kolonuna beslenmiştir. HPLC sisteminde, mobil faz olarak amonyum nitrat tamponu/asetonitril (30:70) kullanılmıştır ve estradiolün akış hızı 1.0 mL/dk'dır. Kolona beslenen estradiolün 280 nm'de alıkonma süresi olan 4.2.dk.'da çıkan pikin alanından konsantrasyona geçilerek kapsüllenmeyen estradiol miktarı belirlenmiştir (Ek.2) Yükleme çözeltisindeki estradiol miktarından, kapsüle olmayan estradiol miktarı çıkartılmış ve aradaki fark kapsüllenen estradiol miktarını vermiştir.

3.4. PLGA Nanopartikül İçeren ve İçermeyen (Boş) Kitosan/Hidroksiapatit Süpergözenekli Doku İskelelerinin Sentezi ve Karakterizasyonu

3.4.1 Kitosan/hidroksiapatit süpergözenekli doku iskelesi sentezi ve karakterizasyonu

Kitosan/hidroksiapatit süpergözenekli hidrojel (SPH) doku iskeleleri, daha önce grubumuz tarafından optimize edilmiş olan, mikrodalga ısıma ile çarpaz bağlanma ve süpergözenekli hidrojel üretiminde kullanılan gaz köpükleştirme yönteminin bir araya getirilmesiyle oluşturulmuş bir yöntemle sentezlenmiştir. (Durukan, 2012). Yöntemin ayrıntıları ise şöyledir. 0.2 g kitosan 0.1 M asetik asit çözeltisi içinde yaklaşık 1 gün süreyle manyetik karıştırıcı ile karıştırılmak suretiyle çözünmüştür.

Elde edilen %2'lik kitosan çözeltisinden 10 mL alınarak üzerine ticari toz hidroksiapatit (500 mg) eklenmiş ve karıştırılmıştır. Ardından sırasıyla gaz köpükleştirici ajan NaHCO_3 (30 mg) ve çarpaz bağlayıcı glioksal (20µL) eklenerek hazırlanan karışım homojenize edilmiştir ve 24 gözlü Petri kaplarının gözlerine eşit şekilde dağıtılarak 90 watt gücüne ayarlanmış mikrodalga fırına (Milestone) yerleştirilmiştir. Mikrodalga işlemi köpükleşme bitene kadar (2.5-3 dk) devam etmiştir. Mikrodalga fırında gaz köpükleştirme yöntemi ile yapı içerisinde

gözenekler oluşurken, eş zamanlı olarak jelleşme de meydana gelmiştir. Jelleşme işleminden sonra Petri kaplarında bulunan hidrojel etil alkol içinde bir miktar bekletilerek şekilleri bozulmadan kaplardan çıkartılabilmeleri sağlanmıştır. Çıkartılan hidrojel saf suda şişirilerek yapılarındaki safsızlıkların uzaklaşması sağlanmıştır. Saf sudan alınan örnekler dondurarak kurutma (freze-drying) işlemine tabi tutulmuşlardır. Bu yöntemde iskeleler önce -20°C 'de 1 gece, daha sonra -80°C 'de 3 gün süre ile liyofilize edilmiştir. Elde edilen doku iskeleleri % 96'lık etanolde 1 gece boyunca stabilize edilmiştir. Etanolü yapıdan uzaklaştırmak için iskeleler, 1 gün liyofilizatörde (Christ, Almanya) kurutulmuştur.

Kitosan/HA süpergözenekli doku iskelelerinin karakterizasyon çalışmaları daha önce grubumuz tarafından gerçekleştirilmiştir (Durukan, 2012). Tez çalışması kapsamında iskelelerin SEM görüntüleri alınmıştır.

3.4.2. PLGA nanopartikül içeren kitosan doku iskelesi sentezi ve karakterizasyonu

Distile suda sonikatör (Bandelin, Almanya) kullanılarak dağıtılan ve süspanse hale getirilen 17- β estradiol yüklü PLGA nanopartiküller, iki şekilde kitosan-HA doku iskeleleri ile birleştirilmiştir:

1. Önceden hazırlanmış doku iskelelerine nanopartiküller enjekte edilerek,
2. Nanopartiküller, iskele üretimi sırasında kitosan çözeltisine katılarak eş zamanlı üretim-yükleme şeklinde yüklenmiştir.

3.4.2.2. FTIR analizi

PLGA nanopartiküllerin kitosan doku iskelelerine yüklendiklerini göstermek amacıyla nanopartikül içeren ve içermeyen (boş) doku iskelelerinin $400-4000\text{ cm}^{-1}$ dalga boyu aralığında FTIR (Thermo Fisher Scientific, Nicolet iS10, Waltham, MA, ABD) ile spektrumları alınmış ve karşılaştırılmıştır.

3.4.2.2. SEM analizi

PLGA nanopartikül içeren ve içermeyen kitosan doku iskelelerinden alınan kesitler altın-paladyum ile kaplanmış ve Zeiss (Evo-50, Almanya) taramalı elektron mikroskobu ile incelenmiştir.

3.5. Salım Sistemlerinin Hazırlanması

17- β estradiol yüklü nanopartiküller liyofilize edilerek kurutulduktan sonra 1mg estradiol içeren 2 mg toz haldeki partikül, 10 mL fosfat tampon çözeltisine (PBS, pH: 7.4) eklenmiştir. Doku iskelelerinden salım çalışmalarında ise 2 mg partikül içeren 11x4 mm boyutlarındaki iskele 10 mL PBS ortamına eklenerek salım çalışması yürütülmüştür. Ayrıca 2 mg siklodekstrin+E2 kompleksi (E2/siklodekstrin=46.9 mg E2/1g siklodekstrin) bulunan 11x4 mm boyutlarındaki kitosan/HA doku iskelelerine emdirilerek salım çalışması 10 mL PBS (pH:7.4) ortamında yürütülmüştür. İn-vitro salım çalışmaları 37°C'de ve 70 rpm hızındaki çalkalamalı etüvde yürütülmüştür. Nanopartiküllerden salım çalışmasında, belirlenen zamanlarda salım ortamından numune alınmadan önce 20,000g'de 15 dk boyunca santrifüj işlemi yapılmış ve partiküllerin çökmesi sağlanmıştır. Salınan 17- β estradiol miktarını belirlemek için, hazırlanan salım ortamlarından ilk gün 1.,2., 6. ve 24. saatlerde, salım süresi sonuna kadar ise hergün 900 μ L numune alınmış ve yerine alınan miktar kadar taze PBS eklenmiştir. Alınan numuneler üzerine 100 μ L metanol eklenerek salınan 17- β estradiol miktarı Bölüm 3.3.5.'de anlatılan yöntemle HPLC ile tayin edilmiştir. Analiz için alınan örneklerdeki 17- β estradiolün konsantrasyonları ölçülmüş ve kümülatif salım verileri elde edilerek salım profilleri oluşturulmuştur. Salım çalışmaları üç paralel örnek ile yürütülmüştür.

3.6. Hücre Kültür Çalışmaları

Sunulan tez çalışmasında, 17- β estradiol yüklü nanopartikül-doku iskelesi sisteminin kemik doku mühendisliğinde kullanım potansiyelinin araştırılması amacıyla in-vitro koşullarda adipoz kökenli sıçan mezenkimal kök hücreler kullanılarak hücre kültür çalışmaları gerçekleştirilmiştir. Adipoz kökenli kök hücreler, Ege Üniversitesi Biyomühendislik Bölümü Kök Hücre Laboratuvarı tarafından izole edilmiştir. AdMSC'lerin karakterizasyon çalışmaları kapsamında grubumuz tarafından Kocaeli, Üniversitesi Kök Hücre Merkezinde akış sitometrisi analizi yaptırılarak yüzey antijenleri belirlenmiştir. Uygulanan protokolde AdMSC'ler yüzeyden kaldırılarak süspanse edilmiştir. Santrifüjden sonra yıkama tamponunda süspanse edilen hücrelere 300 μ L floresan izotiyosiyanat (FITC)-konjuge antikorlar eklenerek oda sıcaklığında 45 dk inkübasyon gerçekleştirilmiştir. Akış sitometri analizi için FACSCalibur (BD Biosciences, San

Diego, USA) cihazı kullanılmıştır. Hücrelerin immüno-fenotiplemesinde CD29, CD90, CD54, CD45, CD106, MHC sınıf 1 ve MHC sınıf 2 antijenlerine uygun sıçan antikoları ve antikolar için önerilen izotip kontrolleri kullanılmıştır.

3.6.1. Hücre kültür koşulları

Çalışmada 4 grup oluşturulmuştur. Bunlardan ilki kontrol grubu olarak belirlenen nanopartikül içermeyen kitosan/HA doku iskeleleri (Kitosan/HA), ikincisi 17- β estradiol yüklü nanopartiküllerin doku iskelesine üretim aşamasında yapıya katılmasıyla oluşan sistem (Kitosan/HA+Np), üçüncüsü doku iskeleleri hazırlandıktan sonra nanopartiküllerin yapıya emdirme yoluyla katılmasıyla oluşan sistem (Kitosan/HA-Np), dördüncüsü ise suda çözünen formda bulunan estradiolün doku iskelesine emdirilmesiyle oluşan sistemdir (Kitosan/HA+E2).

Hücre kültürü çalışması için, 9x2 mm boyutlarında olan her bir doku iskelesinde 35 μ g E2 olacak şekilde 0.7 mg partikül yüklenmiştir. Konsantrasyonu 25 mg/mL olan suda çözünen E2 ise PBS ortamında seyreltilerek her bir iskelede 35 μ g E2 olacak şekilde doku iskelelerine 75 μ L emdirilmiştir.

Hücre kültür çalışmaları boyunca steril ortam gerektiren tüm işlemler laminar akış kabini (Bioair, Type II Laminer Akış Kabini, İtalya) yürütülmüştür.

Hücre kültürü çalışmaları, her biri 1.5 cm çapa sahip, tabanı Parafilm ile kaplanmış, 24-gözlü polistiren hücre kültür kaplarında (TCPS, Orange Scientific, Belçika) gerçekleştirilmiştir. Hücrelerin TCPS'e yapışmasını engellemek amacıyla, kap tabanını kaplayacak şekilde kesilmiş Parafilm kapların içerisine yerleştirilmiş ve önce 30 dk %70'lik etanol içerisinde, ardından da 45 dk UV ile sterilize edilmiştir. Hücre kültür çalışmalarında kullanılacak olan doku iskeleleri (çap, 9 mm; kalınlık, 2 mm) %75'lik etanolde çöktürülerek sterilize edilmiştir. Sterillenen doku iskeleleri, Parafilm ile kaplanmış 24 gözlü kültür kaplarına yerleştirilmiştir. Hücre ekiminden önce iskeleler Dulbecco PBS (pH:7.4) ile 1.5 saat muamele edilerek etanolün uzaklaşması sağlanmıştır.

AdMSC hücreleri, %10 fetal sıgır serumu (FBS), %1 penisilin-streptomisin ve %0.1 amfoterisin B içeren Minimum Essential Medium Alpha Modification (α -MEM) ile flasklarda kültüre edilmiştir. Hücreler, flasklarda doyumluğa (confluency)

ulaştıklarında (3.pasajda), %0.25'lik tripsin enzimi ile gerçekleştirilen tripsinizasyon işlemi ile yüzeyden kaldırılmışlardır. FBS içeren α -MEM eklenmesi ile de tripsin inhibe edilmiştir. Elde edilen hücre süspansiyonu 1000 rpm'de 5 dk boyunca santrifüjlenmiştir. Bu işlem sonrasında süpernatant dökülmüş ve taze besi ortamı ile tekrar süspanse edilen hücreler, hemositometrik sayım sonrasında, hücre yoğunluğu 9×10^4 hücre/doku iskelesi olacak şekilde, her bir doku iskelesine 60 μ L hücre süspansiyonu enjekte edilerek hücre ekimi gerçekleştirilmiştir. Doku iskeleleri üzerine 1'er mL ortam eklenerek hücre kültür kaplarında, 37°C sıcaklığa, %95 neme ve %5 CO₂'ye sahip inkübatörde (Heraus Instruments, Almanya) kültür edilmiştir. Kültür ortamı ikinci gününde osteojenik farklılaşma ortamıyla değiştirilmiştir. Daha sonra ise 3 günde bir ½ oranında farklılaşma ortamı ile değiştirilmiştir. Farklılaşma ortamı, %10 FBS, %1 penisilin-streptomisin ve %0.1 amfoterisin B içeren α -MEM ortamına 10^{-8} M dekzametazon, 10 nM β -gliserofosfat, 50 mg/mL askorbik asit eklenmesiyle oluşturulmuştur.

3.6.2. MTT analizi

Adipoz kökenli mezenkimal kök hücrelerin mitokondriyal aktiviteleri, 2., 4., 7., 10., 14. ve 21. günlerde 3-[4,5-dimetiltiazol-2-il]-difeniltetrazolyum bromür (MTT) ile kantitatif olarak tayin edilmiştir. Canlı hücrelerin mitokondrisi tetrazolyum bileşenini indirgeyerek formazan kristallerine dönüştürmektedir. Oluşan bu kristaller çözündüğünde ortaya çıkan mor renkli çözeltinin absorbans değeri belirlenir. Elde edilen bu absorbans değeri, üremesini devam ettiren canlı hücre miktarı ile doğru orantılıdır. MTT analizi için öncelikle doku iskeleleri üzerindeki kültür ortamı uzaklaştırılmıştır. Ardından, her bir göze 600 μ L serumsuz besi ortamı ve 60 μ L MTT çözeltisi (2.5 mg/mL PBS) eklenmiştir. Hücreler bu şekilde 37°C'deki etüvde 3 saat boyunca inkübe edilmiştir. İnkübasyon sürecinden sonra, doku iskeleleri üzerindeki ortam uzaklaştırılmış ve iskeleler başka bir 24 gözlü kültür kabına aktarılmıştır. Her bir göze 400 μ L 0.04 M HCl içeren izopropanol çözeltisi eklenerek oluşan formazan kristallerinin çözünmesi sağlanmıştır. Elde edilen mor renkli çözeltiden 200 μ L alınarak, 690 nm referans olmak üzere 570 nm'de mikroparka okuyucu (Asys UVM 340, Avusturya) ile optik yoğunluk belirlenmiştir.

3.6.3. Taramalı elektron mikroskop (SEM) analizi

Adipoz kökenli mezenkimal kök hücrelerin, doku iskelelerindeki morfolojileri ve iskele içerisindeki yapışma ve yayılma potansiyellerinin görüntülenmesi için kültürün 4 ve 7. ve 14. günlerinde alınan örneklerle SEM (Zeiss Evo 4750, Almanya) incelemesi yapılmıştır. Öncelikle, doku iskeleleri üzerindeki kültür ortamı uzaklaştırıldıktan sonra, iskeleler ikişer kez PBS (pH: 7.4) ile yıkanmıştır. Daha sonra 1 mL %2.5'luk (v/v) gluteraldehit çözeltisi ile karanlıkta ve oda sıcaklığında 30 dk boyunca fiksasyon işlemi gerçekleştirilmiş ve örnekler analiz yapılana kadar PBS içinde 4°C'de saklanmıştır. SEM analizinden önce, doku iskeleleri PBS ile yıkanmıştır. İskelelerin, sırasıyla %30, %50, %70, %90 ve %100'lük (v/v) etanol çözeltilerinde 2'şer dk bekletilmesiyle gerçekleştirilen dehidrasyon işleminden sonra iskeleler hekzametildisilazan (HMDS) içerisinde de 5 dk bekletilmişlerdir. Örnekler, oda sıcaklığında kurutulduktan sonra, altın-paladyum ile kaplanmış ve SEM görüntüleri alınmıştır.

3.6.4. ALP aktivitesinin tayini

Hücrelerin, osteojenik farklılaşması, alkalen fosfataz (ALP) aktivitesinin tayini ile belirlenmiştir. Hücre kültür çalışmasının 7., 14. ve 21. günlerinde doku iskeleleri üzerindeki kültür ortamı uzaklaştırılmış ve iskeleler bir kez 1'er mL PBS ile yıkanmıştır. İskeleler, başka bir kültür kabına aktarılarak test yapılincaya kadar -80°C'de muhafaza edilmiştir. İskeleler liyofilizatörde kurutulduktan sonra parçalanarak Ependorf tüplerine alınmıştır. Örneklerle 250 µL Triton X-100 çözeltisi (% 1'lik (v/v) çözelti, PBS içinde) eklenmiş ve 4°C'de 30 dk inkübe edilmiştir. Ardından, 4°C'de, 12,000 rpm hızda 10 dk boyunca santrifüjleme işlemi gerçekleştirilmiştir. Bu şekilde elde edilen Triton lizatından 50 µL alınarak, 125 µL ALP çözeltisine (56 mM 2-amino 2-metil-1,3-propanol ve 1 mM magnezyum klorür içeren 10 mL p-nitrofenil fosfat (pNPP)) eklenmiş ve 37°C'de 30 dk boyunca inkübasyon yapılmıştır. Oluşan tepkime, her bir örneğe 50 µL 2.5 M sodyum hidroksit (NaOH) çözeltisi eklenerek sonlandırılmıştır. Mikroplaka okuyucu (Asys UVM 340, Avusturya) kullanılarak, 405 nm dalga boyunda p-nitrofenolün absorbanı ölçülmüştür.

3.6.5. Gerçek zamanlı polimeraz zincir reaksiyonu (RT-PCR) analizleri

Doku iskeleleri üzerinde östrojen varlığında üreyen ve farklılaşan, adipoz kökenli mezenkimal kök hücrelerinin kollajen I ve osteokalsin ekspresyon seviyeleri, RT-PCR (Light Cycler® Nano, Roche, İsviçre) ile belirlenmiştir. Analiz için, kültürün 7., 14. ve 21. günlerinde kültür kaplarından alınan doku iskeleleri üzerindeki besi ortamı uzaklaştırılmış ve örnekler -80°C'de saklanmıştır. Ardından RNA izolasyonu yapılmıştır. Bunun için örnekler, DNAase ve RNAase içermeyen Ependorflara alınarak steril iğne ile parçalanmıştır. Her bir örneğin üzerine 1mL Trizol eklenerek 25-30 s vortekslenmiş ve örnekler 2 sa 4°C'de bekletilmiştir. Hücrelerden RNA izole etmek amacıyla, örneklerin üzerlerine 200 µL kloroform eklenerek çalkalanmış ve oda sıcaklığında 2-3 dk inkübe edilmiştir. Sonrasında, örnekler 4°C'de 10 dk 12,000 g'de santrifüjlenmiştir. Oluşan sıvı faz yeni bir RNase içermeyen Ependorf tüpe aktarılmıştır. Kloroform basamağı proteinden ve fenolden kaynaklanan kirliliği önlemek amacıyla 2 kez tekrarlanmıştır. Daha sonra sıvı faza 400 µL izopropanol eklenerek ve hafifçe vorteksledikten sonra 45 dk-20°C'de inkübe edilmiştir. Ardından, örnekler 4°C'de 10 dk boyunca 12,000 g'de santrifüjlenmiştir. Oluşan süpernatant atılarak pellet 1 mL %75'lik etanol (otoklavlanmış ultra saf su ile hazırlanmıştır) ile yıkanmış ve hafifçe vortekslenmiştir. Örnekler, 4°C'de 5 dk boyunca 7,500 g'de santrifüjlendikten sonra süpernatant atılmış ve pelletler kurutulmuştur. Her bir pelletin üzerine 20 µL RNase içermeyen su eklenmiş ve örnekler -80°C'de saklanmıştır.

RT-PCR analizi, iki basamaklı olarak önce BM cDNA sentez kiti daha sonra FastStart Essential DNA Green Master (Roche) kullanılarak gerçekleştirilmiştir. İlk aşamada RNAase içermeyen su ve BM cDNA sentez kiti kullanılarak cDNA sentezi gerçekleştirilmiştir. cDNA sentezi reverse transkripsiyon ile 5 dk 65°C, 60 dk 50°C ve 5 dk 85°C'de gerçekleştirilmiştir. İkinci aşamada FastStart Essential DNA Green Master (Roche) kiti kullanılarak forward-reverse primerler ve ilk aşamada elde edilen cDNA örneği kullanılarak RT-PCR analizi gerçekleştirilmiştir. Ardından RT-PCR'ın ilk aktivasyon basamağı 95°C 10 dk, 45 döngüde denatürasyon ile çoğalma basamağı 95°C'de 20 sn, primerlerin ortamda bulunan hedef cDNA bileşeni ile birleşip ayrılma basamağı 60°C'de 20 sn ve uzatma basamağı 72°C'de 20 sn'de gerçekleştirilmektedir.

“Housekeeping gen” olarak kullanılan β -aktin, kollajen I ve osteokalsin genlerinin primer dizileri (Qiagen, BK, Türkiye) Çizelge 3.1’de verilmiştir.

Çizelge 3.1. Polimeraz zincir reaksiyonu için primer dizileri.

	Forward primer
	5'-CAA GAT GTG CCA CTC TGA CT-3'
Kollajen I	Reverse primer
	5'-TCT GAC CTG TCT CCA TGT TG-3'
	Forward primer
	5'-CTTTCTGCTCACTCTGCTG-3'
Osteokalsin	Reverse primer
	5'-TATTGCCCTCCTGCTTGG -3'
	Forward primer
	5'-GTGCTATGTTGCCCTAGACTTCG-3'
β -aktin	Reverse primer
	5'-GATGCCACAGGATTCCATACCC-3'

3.6.6. İstatiksel analiz

Çalışma sonuçları GraphPad Software InStat programı kullanılarak istatistiksel açıdan değerlendirilmiştir. Veriler üç deney için ortalama $\pm$ standart sapma değerleri ile birlikte sunulmuştur. Farklı grupların istatistiksel olarak karşılaştırılması için Student's t-testi kullanılmış ve p-değerinin 0.05'den az olduğu durumlar anlamlı kabul edilmiştir.

4. DENEYSEL SONUÇLAR VE TARTIŞMALAR

Çalışmanın bu bölümünde, tez kapsamında gerçekleştirilen deneysel çalışmalardan elde edilen sonuçlar sunulmuş ve elde edilen bulgular üzerinde tartışmalar yapılmıştır. İlk olarak, PLGA nanopartiküllerin seçimi ve hazırlanmasına yer verilmiş, ardından 17- β estradiol yüklü PLGA nanopartiküllerin ve PLGA nanopartikül yüklü doku iskelelerinin karakterizasyon çalışmalarının sonuçları tartışılmıştır. İlerleyen bölümlerde PLGA nanopartiküllerden ve doku iskelelerinden 17- β estradiolün salım kinetiği açıklanmıştır. Son olarak ise, adipoz kökenli mezenkimal kök hücrelerin doku iskeleleri ile etkileştirilmesiyle gerçekleştirilen hücre kültürü çalışmalarının sonuçlarına yer verilerek gerekli tartışmalar yapılmıştır.

4.1. PLGA Nanopartiküllerin Hazırlanması

Kemik doku mühendisliği yaklaşımı ile kemik rejenerasyonunda doku iskelesi ile hücrelerin yanında hücre büyümesini ve mineralize kemik doku oluşumunu destekleyen biyosinyallere ihtiyaç vardır. Steroid bir hormon olan östrojen kemik metabolizmasının düzenlenmesine büyük oranda katılmaktadır. Kemik oluşumunu artırarak, kemik yıkımını azaltmaktadır ve kemik döngü (turnover) hızını yavaşlatmaktadır (Seyisoğlu, 1999). Ayrıca, literatürde östrojenin mezenkimal kök hücrelerin osteojenik farklılaşmasını etkilediği yönünde az sayıda çalışma yer almaktadır. Bu nedenlerle östrojen, kemik doku mühendisliğinde rejeneratif etki sağladığı düşünülen bir biyosinyaldir.

17- β estradiol (E2), östrojenik kuvvetinin en yüksek olmasından dolayı östrojen kaynağı olarak rejeneratif tıp alanında kullanılmaktadır. E2, hidrofobik yapıda olup, suda çözünürlüğü 5mg/L'dir (Guyton, 2005). Östrojenin biyoyararlanımını ve sudaki çözünürlüğünü arttırmak için nano-mikro partiküller, lipozomlar ve siklodekstrinler kullanılmaktadır. Sunulan tez kapsamında da PLGA nanopartiküle yüklenmiş 17- β estradiol'ün kitosan/HA doku iskelesinden kontrollü ve uzun süreli salımının incelenmesi ve bunu takiben adipoz kökenli mezenkimal kök hücrelerinin osteoblastik farklılaşmasına olan etkisinin araştırılması amaçlanmıştır.

PLGA, FDA tarafından onaylı polilaktik asit (PLA) ve poliglikolik asit (PGA) polimerlerinin birleşmesiyle oluşan poliester bir kopolimerdir. PLGA, oldukça yavaş

bir biçimde bozunarak vücutta şeker metabolizmasının bir ara ürünü olan laktik asite dönüştüğü için normal hücre fonksiyonlarını etkilememektedir. Çalışmada uygun özelliklerinden dolayı PLGA'nın (PLA: PGA) 50:50 ve 65:35 bileşimlerine sahip iki kopolimeri kullanılmıştır.

Emülsiyon-çözücü buharlaştırma tekniği nanopartikül üretiminde sıklıkla kullanılan bir yöntemdir. Bu yöntemde polimer ve biyoaktif ajan, etil asetat gibi hidrofobik biyoaktif ajanları da çözebilen organik çözücü içerisinde çözülmemektedir. Oluşan karışım, surfaktan içeren sulu çözelti içerisine eklenerek emülsiyon oluşumu sağlanmaktadır. Daha sonra organik çözücü sıcaklık/basınç artırılarak ya da sürekli karıştırarak buharlaştırılmaktadır (Soppimath et al., 2001). Söz konusu yöntem hem kolay olması, hem farklı birçok maddeye uygulanabilir olması, hem de yüksek verimli sonuçlar elde edilebilmesi nedeniyle sıklıkla tercih edilmektedir (Kutlu, 2011). Bu nedenle tez çalışmasında da emülsiyon-çözücü buharlaştırma tekniği ile PLGA nanopartikül üretimi gerçekleştirilmiştir.

Küçük boyutlarda partikül eldesi ve homojen dağılım için yüksek hızlı homojenizatör ile karışım sağlanmaktadır (Soppimath et al., 2001). Homojenizatörün hızı arttırıldıkça birim zamanda daha çok kayma gerilimine maruz kalan partiküllerin boyutları küçülmekte, dolayısıyla oldukça küçük boyda nanopartiküller elde edilebilmektedir (Lee et al., 2004). Ayrıca, yüksek hızlı homojenizatör kullanılarak biyoaktif ajanın nanopartiküle enkapsülasyonu gerçekleştirilmektedir. Bu bilgiler doğrultusunda, tez çalışmasında yüksek hızlı homojenizatör kullanılmış ve 15,000 rpm'de 8 dk karıştırma yapılarak nanometre boyutunda partiküller üretilmiştir.

Nanopartikül üretiminde homojen partikül boyutu eldesi için stabilizatörler kullanılmaktadır, ancak kullanılan stabilizatörlerin oluşan partikül yüzeyinden uzaklaştırılması oldukça zordur. Yüzeyden uzaklaştırılamayan stabilizatörün, biyolojik sistemlerde toksik etkiye neden olmakta ve polimerin bozunma rejimini etkilemektedir. Didodesil dimetil amonyum bromür (DMAB), partikül hazırlanmasında sık kullanılan yüzey aktif bir maddedir. Yapılan çalışmalar, DMAB'nin, partiküllerin boy dağılımlarını dar bir aralıkta tuttuğunu belirtmiştir (Kutlu, 2011).

Grubumuz tarafından daha önce emülsiyon çözücü buharlaştırma yöntemi ile PLGA nanaopartiküllere, PLGA/ilaç oranı (w/w;10) olacak şekilde, hidrofobik bir ilaç (5-Fluorouracil) yüklenmiş ve ortamda bulunan ilacın miktarı ile partiküllerce kapsüle edilen ilaç miktarı arasında bir doğru orantı kurulamadığı, aynı zamanda ortamda bulunan ilaç miktarı ile ortama salınan ilaç miktarı arasında da doğrusal bir ilişki olmadığı sonucuna varılmıştır (Kutlu, 2011). Literatür incelemesi yapıldığında da benzer sonuçlara ulaşılmıştır (Birnbaum et al., 2007). Bu nedenle yapılan çalışmada PLGA/17- β estradiol oranının (w/w;10) olmasına karar verilmiştir.

4.2. PLGA Nanopartiküllerin Karakterizasyonu

4.2.1. Boy ve boy dağılımı

Partikül boyutu, nanopartikülün fiziksel stabilitesine, ilaç salımına, biyodağılım ve hücresel alıma doğrudan etki ettiği için önemli bir parametredir (Mittal et al., 2007). Polimerin molekül ağırlığı arttıkça partikül boyutu da artmaktadır. Molekül ağırlığının artmasıyla polimer çözeltisinin viskozitesi de artmaktadır. Dolayısıyla emülsiyon oluşma fazında, aynı karıştırma hızında yüksek molekül ağırlığındaki polimerin düşük molekül ağırlıklı polimere oranla daha büyük emülsiyon taneleri oluşturmaya neden olmaktadır.

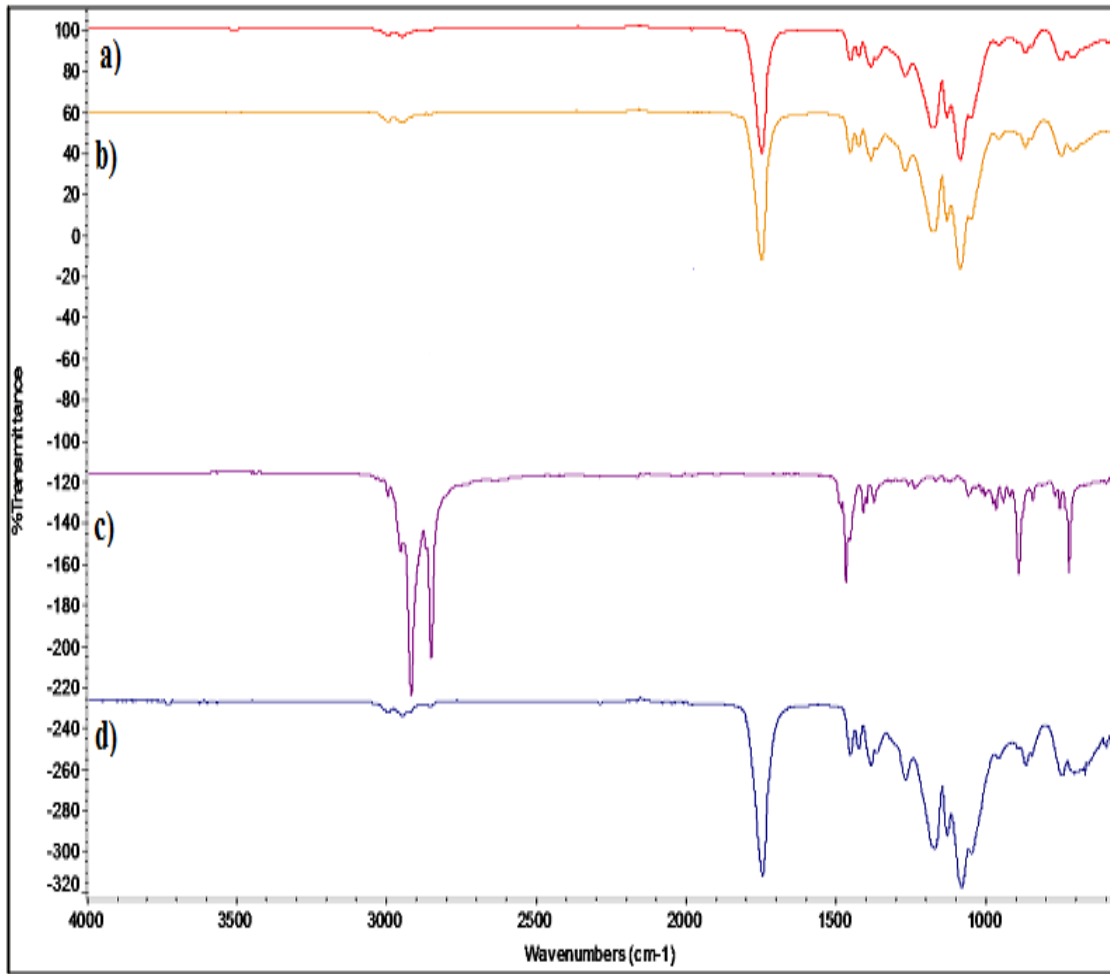
Emülsiyon çözücü buharlaştırma yöntemi ile üretilen boş ve β -estradiol yüklü PLGA nanopartiküllerin boy ve boy dağılımı Çizelge 4.1.'de verilmiştir. Çizelgedeki verilerden anlaşılabileceği gibi, üretilen nanopartiküllerin boyutlarının kullanılan PLGA kopolimerinin bileşimine bağlı olarak büyük farklılıklar göstermediği, ancak 50:50 PLA/PGA oranına sahip PLGA kopolimerinden üretilen nanopartiküllerin molekül ağırlığının daha düşük olmasından dolayı boyutlarının küçük olduğu gözlenmiştir. Ayrıca, aynı kopolimerden üretilen nanopartiküllerin çoklu dağılım endekslerinin de (PDI) daha düşük olduğu gözlenmiştir. Bu değerlerin sıfıra yakın olması partiküllerin eş boy dağılımını göstermektedir. Çizelge 4.1'deki boş ve 17- β estradiol yüklü partiküller karşılaştırıldığında, 17- β estradiol yüklenen partiküllerde gözlenen boyut artışının literatürle (Mittal et al., 2007) uyumlu olduğu görülmektedir.

Çizelge 4.1. Farklı bileşimlerdeki PLGA kopolimerlerinden üretilen boş ve 17- β estradiol (E2) yüklü nanopartiküllerin boy ve boy dağılım değerleri.

PLA/PGA	Ortalama Çap (nm)	Çoklu Dağılım Endeksleri (PDI)
50:50 (boş)	196.0 $\pm$ 3.8	0.015 $\pm$ 0.024
65:35 (boş)	200.0 $\pm$ 4.7	0.320 $\pm$ 0.018
50:50 (E2 yüklü)	235.0 $\pm$ 5.2	0.088 $\pm$ 0.020
65:35 (E2 yüklü)	240.0 $\pm$ 6.2	0.370 $\pm$ 0.020

4.2.2. FTIR analizi

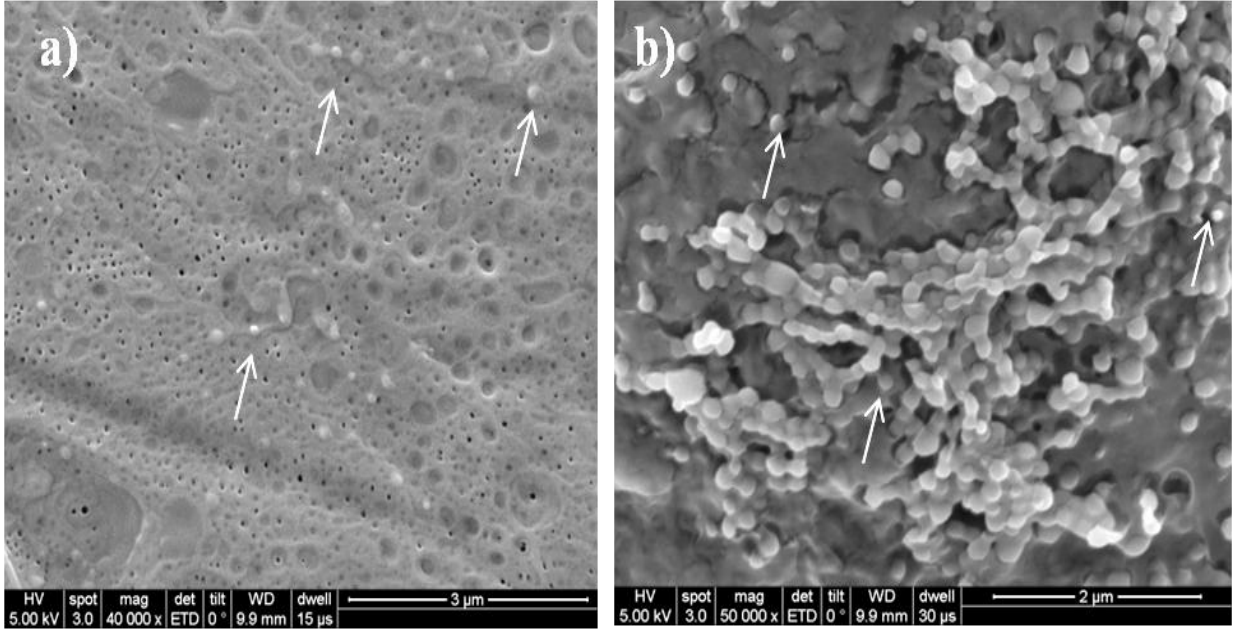
β -estradiol yüklü PLGA nanopartiküllerin kimyasal yapılarının analiz edilebilmesi ve nanopartiküllerin hazırlanma aşamasında kullanılan DMAB stabilizatörünün üretim sonrası partiküllerden uzaklaştırılıp uzaklaştırılmadığını belirlenebilmesi için 65:35 (PLA:PGA) bileşimindeki PLGA kopolimeri ile hazırlanan boş PLGA nanopartiküllerin, 17- β estradiol yüklü PLGA nanopartiküllerin, saf DMAB'nin ve PLGA kopolimerinin 400-4000 cm^{-1} dalga boyu aralığında FTIR spektrumları alınmıştır. Şekil 4.1.'de yer alan spektrumlarda DMAB'ye ait alifatik C-H piklerinin (2940-2835 cm^{-1}) üretilen partiküllere ait spektrumlarda yer almadığı gözlenmiştir. Dolayısıyla toksik bir sürfaktan olan DMAB'nin üretim sonrası uygulanan yıkama işlemi ile partiküllerden tamamen uzaklaştırıldığı kanıtlanmıştır.



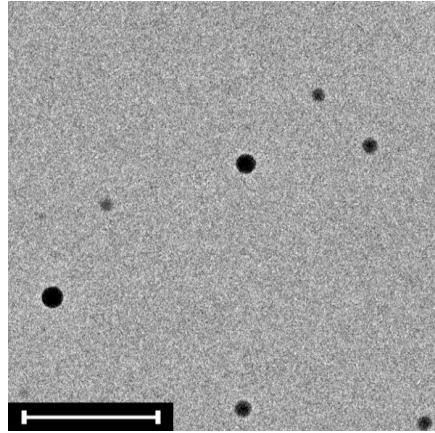
Şekil 4.1. Nanopartikül üretiminde kullanılan malzemelere ve nanopartiküllere ait FTIR spektrumları. a) PLGA nanopartikül; b) E2 yüklü PLGA nanopartikül; c) DMAB; d) PLGA polimeri.

4.2.3. SEM ve TEM analizi

Boş ve 17- β estradiol yüklü PLGA nanopartiküllerin büyüklükleri ve yüzey morfolojileri SEM ve TEM fotoğrafları ile ayrı ayrı incelenmiştir (Şekil 4.2. ,4.3.).



Şekil 4.2. 65:35 bileşimine sahip a)boş (X40.000) ve b) 17- β estradiol yüklü PLGA nanopartiküllerin (X50.000) SEM görüntüleri.



Şekil 4.3. 65:35 bileşimine sahip PLGA nanopartiküllerin TEM fotoğrafı (Bar:500nm).

Elde edilen görüntüler, üretilen nanopartiküllerin küresel bir morfolojiye sahip olduklarını ve yüzeylerinde herhangi bir pürüzün yer almadığını göstermektedir. Fotoğraflar, partikül boyutu açısından incelendiğinde, Çizelge 4.1.'deki sonuçları desteklemektedir.

4.2.4. 17- β estradiol enkapsülasyon veriminin hesaplaması

PLGA nanopartiküllerin, üretim sırasında ortamda bulunan 17- β estradiol'ün ne kadarını kapsüle edebildiğini belirlemek için Bölüm 3.3.'de açıklanan şekilde 2

farklı yöntem denenmiştir. İlk yöntemde, nanopartiküller uygun çözücü içerisinde çözülerek kapsüle olan biyoaktif ajanın dış ortama alınması sağlanmış ve ardından UV spektrofotometrisinde (280 nm’de) absorbans ölçülmüştür. Ek.1’de verilen kalibrasyon grafiği aracılığıyla dalga boyundan konsantrasyon hesaplanmıştır. Eşitlik 4.1. kullanılarak enkapsülasyon verimi hesaplanmıştır.

$$\text{Enkapsülasyon verimi (\%)} = \frac{\text{yüklenen E2 miktarı (mg)}}{\text{başlangıçtaki E2 miktarı (mg)}} \times 100 \quad (4.1)$$

İkinci yöntemde ise, kapsülasyon çözeltisindeki başlangıç estradiol konsantrasyonu ve kapsülasyon sonrasında çözeltide kalan estradiol konsantrasyonu arasındaki fark ölçülmektedir. HPLC ile yapılan ölçüm sonucu elde edilen kromatogramda 4.2.inci dk’da çıkan estradiol pikinin (Ek. 2) alanından kalibrasyon grafiği (Ek.2) aracılığıyla konsantrasyon hesabı yapılmıştır. Yüklenen E2 miktarı Eşitlik 4.2 ile bulunarak ardından Eşitlik 4.1 kullanılarak enkapsülasyon verimi hesaplanmıştır.

$$\text{Yüklenen E2 miktarı} = \text{başlangıçtaki E2 miktarı} - \text{yıkamayla uzaklaştırılan E2 miktarı} \quad (4.2)$$

PLGA nanopartiküllerin enkapsülasyon verimi 50:50 ve 65:35 PLGA bileşimleri için Çizelge 4.2.’de verilmiştir.

Çizelge 4.2. Farklı bileşimlerdeki PLGA kopolimerlerinden üretilen nanopatiküllere yüklenmiş 17-β estradiolün enkapsülasyon verimleri.

PLA/PGA	Enkapsülasyon Verimi (%) (UV)	Enkapsülasyon Verimi (%) (HPLC)
50:50	28.5 ± 1.2	30.2 ± 4.3
65:35	49.8 ± 5.4	53.5 ± 6.3

Çizelgeden de görüldüğü gibi 65:35 bileşimindeki PLGA nanopartiküllerin enkapsülasyon verimi daha yüksek bulunmuştur. Bu nedenle, çalışmanın devam eden kısmında 65:35 bileşime sahip PLGA kopolimeri ile hazırlanan nanopartiküller kullanılmıştır.

Farklı yöntemler kullanılarak elde edilen sonuçlar arasındaki fark, uygulanan yöntemlerin hassasiyetine bağlı olarak açıklanabilir. Ancak, her iki yöntemle de elde edilen enkapsülasyon verimleri uyum içerisinde. Yapılan çalışmada elde edilen enkapsülasyon verim değerlerinin literatürle (Hariharan et al., 2007) benzer olduğu gözlenmektedir.

4.3. Kitosan/ Hidroksiapatit (HA) Süpergözenekli Doku İskelelerinin Üretimi

Kitosan/HA süpergözenekli doku iskeleleri, gaz köpükleştirme tekniği ve mikrodalga ısıma ile çapraz-bağlama yöntemi (Durukan, 2012) bir araya getirilerek sentezlenmiştir. Bu yöntem ile eş zamanlı köpükleşme ve jelleşme, hızlı (~2dk) ve etkin bir şekilde gerçekleşmektedir.

Gaz köpükleştirme tekniğinde köpükleştirici ajan olarak sodyum bikarbonat (NaHCO_3) kullanılmaktadır. NaHCO_3 , asidik kitosan çözeltisi ile etkileştirildiğinde yapısı bozunarak karbondioksit baloncukları meydana gelmektedir. Doku iskelesi içerisinde hapsedilen CO_2 baloncukları sayesinde içsel bağlantılı gözenekler oluşmaktadır (Chen et al., 1999). Tez kapsamında uygulanan yöntemde, gaz köpükleştirme ve eş zamanlı olarak mikrodalga ısıması ile çapraz bağlayıcı ajan varlığında jelleşme sağlanmaktadır. Böylece, köpükleşme ile oluşan gaz baloncukları polimer ağ içerisine kalıcı şekilde hapsedilmekte ve gözeneklerin çökmesi engellenmektedir. Kitosan ve glioksal arasındaki çapraz bağlanma reaksiyonu, Schiff baz reaksiyonu ile kitosanın serbest amin grupları ile glioksalın aldehit grupları arasında gerçekleşmektedir (Durukan, 2012). Mikrodalga ısıma ile çapraz bağlanma reaksiyonunda, ısınmanın moleküler düzeyde olması ve tüm moleküllerin eşit derecede ısınması, reaksiyon karışımının, çapraz bağlanmanın başlayacağı sıcaklık ve pH koşullarına daha kısa sürelerde ulaşmasını sağlamaktadır. Bu sayede mikrodalga ile çapraz bağlanma reaksiyonu daha hızlı ve verimli bir şekilde gerçekleşmektedir. Köpükleşme süreci, kitosan ve çapraz bağlayıcı ajan glioksal arasındaki reaksiyonun bağlı olduğu pH'dan ve sıcaklıktan etkilenmektedir (Park et al., 2006, Beşkardeş et al., 2012).

Doku iskelesinin mekanik dayanımını ve osteokondüktivitesini arttırmak için iskelelere ticari formdaki toz HA eklenmiştir. Kitosan çözeltisine HA eklenmesi ile jelleşme ve köpükleşme proseslerinin önemli derecede etkilenmediği ve aynı zamanda jelleşme süresi ile son sıcaklığın değişmediği gözlenmiştir.

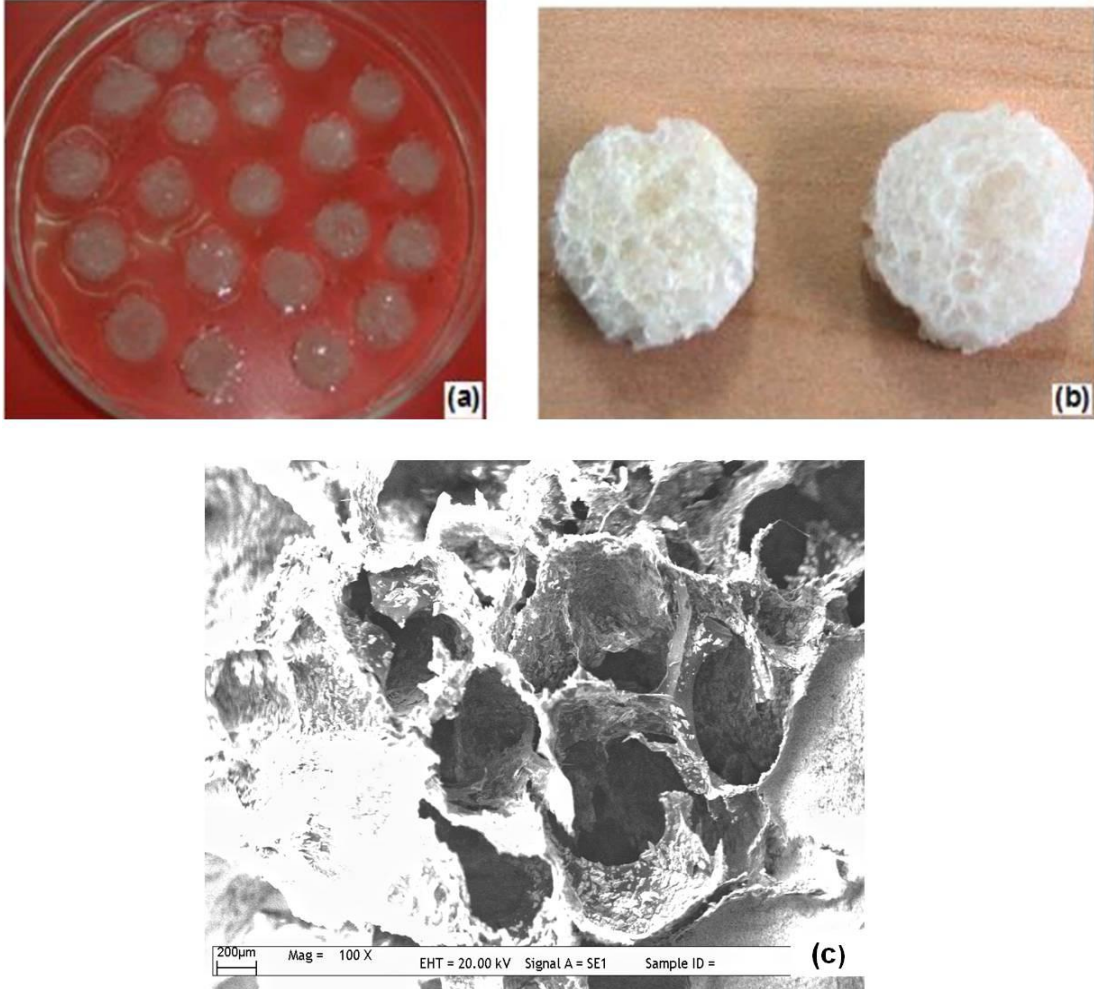
Kitosan/HA süpergözenekli doku iskelelerinin karakterizasyon çalışmaları daha önce grubumuz tarafından yapılmış ve sentezlenen iskelelerin kemik doku mühendisliği açısından uygun kriterlere sahip olduğu belirlenmiştir. Çizelge 4.3.'de kitosan/HA doku iskelelerinin temel özellikleri verilmiştir. Çalışma kapsamında üretilen kitosan/HA iskelelerin SEM görüntüleri alınmıştır. Görüntülerden iskelelerin 400-600 µm boyutlarında gözenek boyutuna sahip olduğu gözlenmiştir (Şekil 4.4c). İçsel bağlantılı gözenekli doku iskelesi, gözeneklerinin oluşturduğu kanallar sayesinde hücre kültürü çalışmalarında besi ortamından hücrelerin daha etkin bir şekilde yararlanmasını ve besin/atık maddelerinin difüzyonunun artmasını sağlayarak hücre yapışmasını desteklemektedir (Şekil 4.4 a ve b). Ayrıca, bu sayede daha iyi şişme özellikleri göstermektedir. Doku iskelesi yapısında bulunan HA, sentezlenen doku iskelelerinin gözeneklerinin korunmasını sağlamakta ve gözenek dayanımını arttırmaktadır.

Literatürde kanselöz kemik için sıkıştırma dayanım aralığı 2-12 N/mm² olarak verilmiştir (Hutmacher, 2007). Tez çalışmasında kullanılan doku iskelelerinin elastik modül değeri literatür bilgilerine yakın değerdedir (Çizelge 4.3.). Doku iskelesinin termal bozunma başlangıç sıcaklığı 247°C'de olarak bulunmuştur. Literatürde kitosan için belirtilen termal bozunma başlangıç sıcaklığı 230°C olup (Zawadski ve Kaczmarek, 2010) bulgularımızla uyumludur. Doku iskelelerinin termal bozunma sıcaklıklarının 200°C'nin üzerinde oluşu, otoklav ile sterillenebilmelerine olanak sağlaması açısından önemlidir.

Çizelge 4.3. Kitosan/HA doku iskelelerinin temel özellikleri.

Doku İskelesi	Ortalama gözenek çapı (µm)	Elastik Modülü (N/mm ²)	Şişme oranı*	Termal bozunma başlangıç sıcaklığı (°C)
Kitosan/HA	400-600	0.93±0.74	44.58 ± 2.70	247

*İskelenin şişme oranı örneğin yaş ağırlığı ile kuru ağırlığı arasındaki farkın kuru ağırlığa bölünmesi ile elde edilmiştir.



Şekil 4.4. Kitosan/HA doku iskelelerinin a) distile su içindeki görüntüleri b) doku iskelesinin kuru haldeki (sol), şişme sonrası (sağ) görüntüsü c) SEM fotoğrafı (x100).

4.4. PLGA Nanopartikül Yüklü Kitosan/HA Doku İskeleleri

4.4.1. Nanopartiküllerin doku iskelesine yüklenmesi

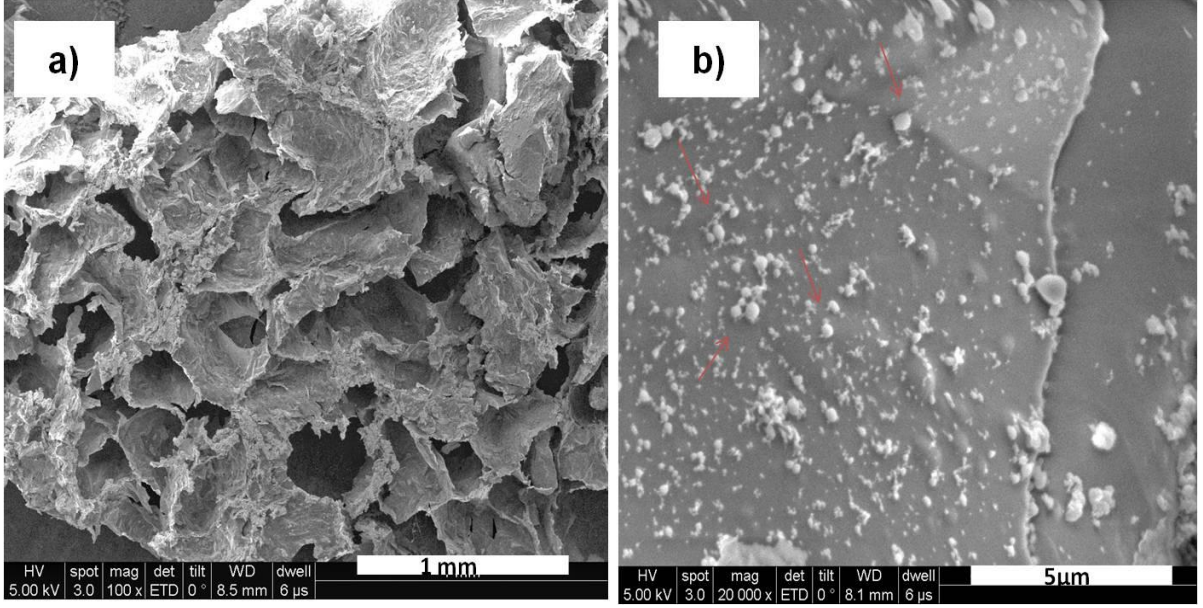
PLGA nanopartiküllerin kitosan/HA doku iskelelerine yükleme şeklinin ve yükleme miktarının belirlenebilmesi için literatür bilgileri ışığında denemeler yapılmıştır. Sonuçta salım çalışmaları ve hücre kültürü çalışmaları için PLGA nanopartikül yüklü doku iskeleleri üretilmiştir.

Sulu fazda bulunan 17- β estradiol yüklü PLGA nanopartiküller, iki şekilde kitosan/HA doku iskeleleri ile birleştirilmiştir. Birinci yöntemde, önceden hazırlanmış doku iskelelerine nanopartiküller emdirilerek, ikincisinde ise, iskele üretimi sırasında kitosan çözeltisine katılarak eş zamanlı üretim-yükleme şeklinde yüklenmiştir.

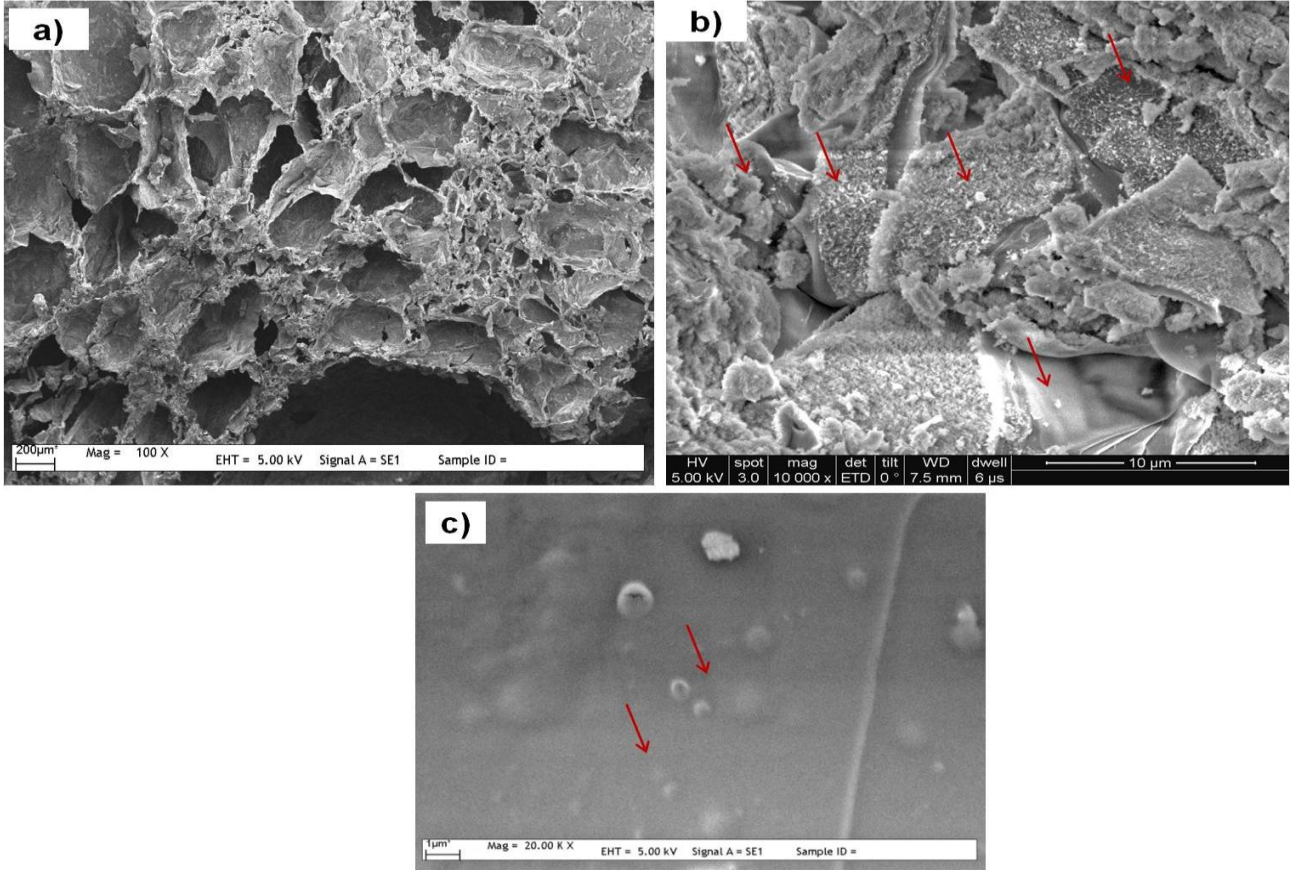
4.4.2. PLGA nanopartikül yüklü doku İskelelerinin karakterizasyon çalışmaları

4.4.2.1. SEM analizi

PLGA nanopartiküllerin, Kitosan/HA doku iskeleleri içerisinde nasıl bir dağılım gösterdiklerini ve yapıdaki morfolojilerini tespit edebilmek amacıyla SEM görüntüleri alınmıştır (Şekil 4.5 ve 4.6).



Şekil 4.5. 17-β estradiol içeren 65:35 PLGA nanopartiküllerin emdirilerek yüklendiği doku iskelelerinin farklı büyütmelerdeki SEM görüntüleri: a)X100, b)20, 000.

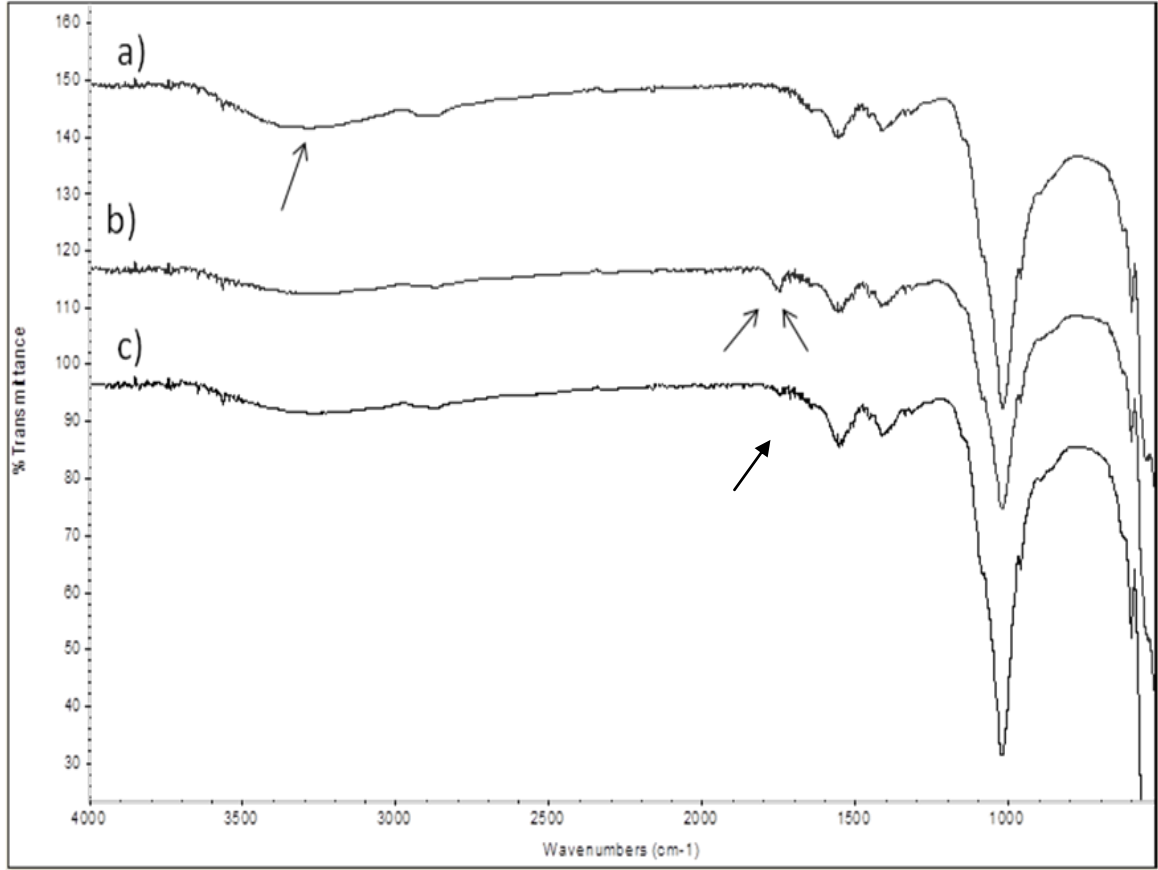


Şekil 4.6. 17-β estradiol içeren 65:35 PLGA nanopartiküllerin yapıya jelleşme aşamasında katılarak yüklendiği doku iskelelerinin farklı büyütmelerdeki SEM görüntüleri: a) X100, b) X10, 000, c) X20, 000. Nanopartiküllerin dağılımı ok ile gösterilmiştir.

SEM fotoğraflarından, doku iskelesine her iki şekilde yüklenen partiküllerin de yapıya başarıyla katıldıkları ve yapı içerisinde homojen bir dağılım gösterdikleri anlaşılmaktadır. Ayrıca, partiküllerin morfolojilerinin düzgün olduğu gözlenmektedir. Dolayısıyla, partiküllerin yapısının kitosan jel içerisinde karışırken ve mikrodalga ışımasından dolayı bozulmadığı tespit edilmiştir. Nanopartiküllerin iskeledeki dağılıma potansiyelleri incelendiğinde daha çok hidroksiapatit üzerinde ve gözenek duvarlarında yoğunlaştıkları gözlenmektedir. Bu durum göz önüne alındığında hidroksiapaptitin yapısında bulunan OH^- ile PLGA yapısında bulunan COOH^- gruplarının elektrostatik etkileşim içinde olduğu düşünülebilir. Şekil 4.5.'den anlaşılabacağı gibi önceden hazırlanmış doku iskelelerine emdirilen nanopartiküller yoğun olarak doku iskelesinin üst yüzeyine tutunmaktadırlar.

4.4.2.2. FTIR analizi

Nanopartikül içeren doku iskeleleri hazırlandıktan sonra PLGA nanopartiküllerin kitosan doku iskelelerine yerleşip yerleşmediğini belirleyebilmek amacıyla FTIR spektrofotometresi ile kalitatif olarak inceleme yapılmıştır. Boş kitosan doku iskelesi ve PLGA nanopartikül içeren kitosan doku iskelelerine ait spektrumlar Şekil 4.7.'de görülmektedir.



Şekil 4.7. Nanopartikül içeren ve içermeyen kitosan doku iskelelerine ait FTIR spektrumları. a) Boş kitosan/HA doku iskelesi, b) PLGA nanopartikül emdirilen kitosan/HA doku iskelesi, c) Nanopartikül üretim aşamasında yüklenmiş kitosan/HA doku iskelesi.

Şekil 4.7. incelendiğinde PLGA'ya ait karakteristik pik olan 1759 cm⁻¹'deki C=O gerinim piki, PLGA nanopartikül emdirilmiş kitosan/HA doku iskelelerinde açıkça gözlenmektedir. Böylece PLGA nanopartiküllerin her iki yöntemle de kitosan doku iskelelerine yerleştirilebildiği görülmektedir. Nanopartikülün doku iskelesi üretimi aşamasında yüklendiği kitosan/HA doku iskelesinin yapısında gözlenen C=O pikinin ise şiddeti daha düşüktür. Spektrumlar incelendiğinde, kitosana ait 3280 cm⁻¹ 'deki yayvan N-H gerinim pikinin PLGA nanopartiküllerin yapıya katılmasıyla azaldığı gözlenmektedir. Bu durum doku iskelesi yapısına katılan PLGA 'nın COOH grupları ile kitosanın NH₂ grupları arasındaki elektrostatik etkileşimin sonucudur.

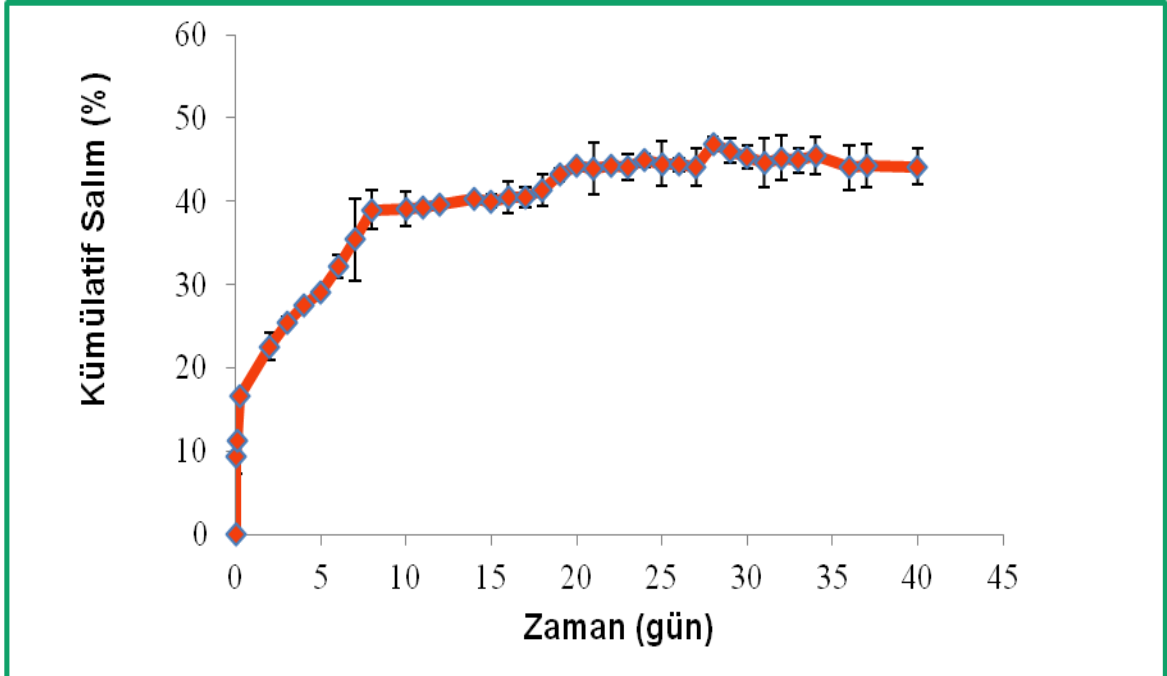
İlgili literatürde PLGA ile kitosanın yan grupları arasında kimyasal bir bağlanmanın olmadığı durumlarda, fiziksel bir etkileşim olduğu belirtilmiştir. PLGA doku iskelelerinde kitosan mikrokürelerin yüklendiği bir çalışmada FTIR analizi

aracılığıyla PLGA ile kitosan arasındaki etkileşim incelenmiştir (Niu et al., 2009). Kitosan mikroküreler varlığında PLGA doku iskelelerine ait spektrumda, PLGA 'ya ait C=O ve kitosana ait N-H baskın piklerinin ve her iki polimerde de bulunan O-H pikinin miktarlarında azalmalar görülmüştür. Sonuç olarak PLGA'nın $-OH^-$ ya da PLGA'nın $-COOH^-$ grupları ile kitosanın $-NH_2^+$ grupları arasında elektrostatik etkileşim olduğu ifade edilmiştir.

4.5. İn-Vitro Salım Çalışmaları

4.5.1. PLGA nanopartiküllerden 17- β estradiol salımı

PLGA nanopartiküllerden salınan E2 miktarının belirlenebilmesi için, nanopartiküllerin yer aldığı rezervuarlardan belirli aralıklarla örnekler alınmış ve eksilen hacim kadar ortama taze PBS eklenmiştir. Alınan örnekler üzerine metanol eklenerek PBS içerisinde bulunan estradiolün çözünmesi sağlanmıştır. Yirmi μL örnek HPLC kolonuna beslenerek E2'nin alıkonma zamanı olan 4.2.inci dk'daki pikin alanı bulunmuş ve 17- β estradiol için HPLC kromatogramı ve kalibrasyon grafiği EK.2'de verilmiştir. Elde edilen verilerden kümülatif salım grafiği çizilmiştir (Şekil 4.8.).



Şekil 4.8. 65:35 bileşimine sahip PLGA nanopartiküllerden 17- β estradiolün kümülatif salımı.

17- β Estradiol yüklü nanopartiküllerin in-vitro salım çalışması PBS ortamında 40 gün boyunca sürdürülmüştür. Şekil 4.8.'de verilen kümülatif salım (%) grafiğinden de anlaşıldığı gibi ilk 24 saatte 17- β estradiol salımı ani patlama (burst effect) etkisi göstermiştir ve nanopartiküllerce kapsüllenene E2 miktarının %17'si salınmıştır. İlk 10 gün boyunca salım, hızlanan bir şekilde artmıştır. Daha sonra ise, doğrusal bir profil sergilemiştir. Kırk günlük salım süresinin sonunda nanopartiküllere yüklenen 17- β estradiolün % 45'inin difüzyon mekanizması ile salındığı belirlenmiştir.

PLGA nanopartiküllerden salım mekanizması Bölüm 2.4.3'de açıklandığı gibi difüzyon mekanizması ve matris bozunması şeklinde gerçekleşmektedir. Polimer degradasyonu salım profilini etkileyen önemli bir parametredir. Kopolimerin laktik asit içeriğinin yüksek olması, dolayısıyla polimer matrisin hidrofobik olması durumunda bozunma süresi uzamaktadır. Böylece bozunma tam olarak gerçekleşmediğinden salım büyük oranda difüzyon mekanizması ile olmaktadır. Ayrıca, nanopartiküllerin salım ortamında birleşerek topaklandıkları gözlenmiştir. Dolayısıyla yapının iç kısımlarında bulunan estradiolün difüzyon yolu uzamakta ve böylece salınan E2 miktarı sınırlanmaktadır. Enkapsüle olan E2 miktarının %100'nün salınamaması da bu şekilde açıklanabilir.

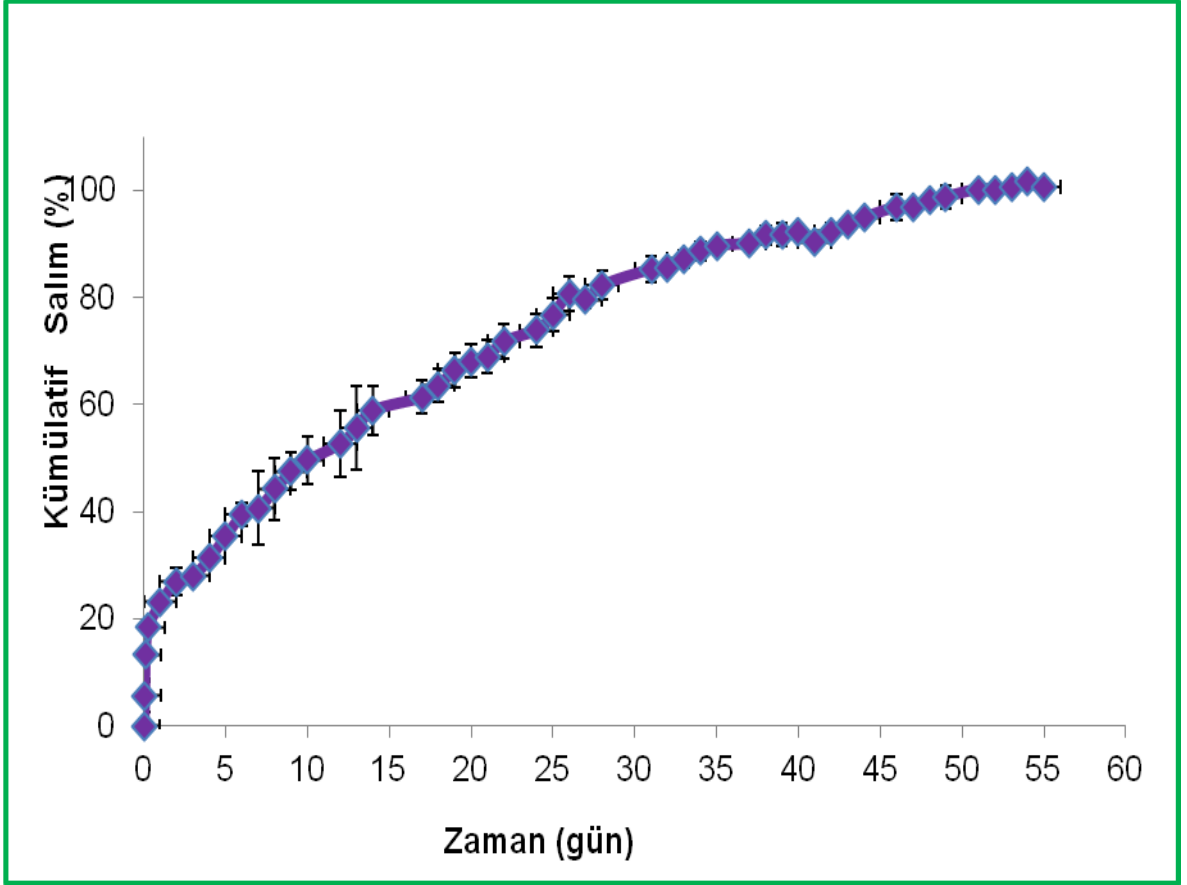
Yapılan değerlendirmeler sonucu elde edilen salım profilinin literatürde yer alan salım profilleri ile benzer olduğu gözlenmiştir. Mittal ve arkadaşlarının (2007) yaptığı çalışmada 65:35 bileşimine sahip PLGA nanopartiküllerden 17- β estradiol salımının 25 günde % 33 olduğu belirlenmiştir. Salım süresince, ani salımı takip eden doğrusal salım gözlenmiştir.

4.5.2. PLGA nanopartikül yüklü doku iskelelerinden salım çalışmaları

PLGA/17- β estradiol oranı 10 (w/w) olacak şekilde nanopartiküllere enkapsüle edilen 17- β estradiol'ün, nanopartiküller kitosan/HA doku iskelelerine yüklendikten sonraki salım profilini belirlemek amacıyla da salım çalışmaları yapılmıştır. Bunun için nanopartikül yüklü 11X4 mm boyutlarında kesilen doku iskeleleri ile 10 mL PBS (pH:7.4) içeren rezervuarlarda salım çalışmaları yürütülmüştür. β -estradiol yüklü PLGA nanopartiküller, kitosan-HA doku iskelelerine yukarıda açıklanan her iki yöntemle de yüklenmiş ve oluşturulan iki sistemden de ayrı ayrı salım çalışması yapılmıştır.

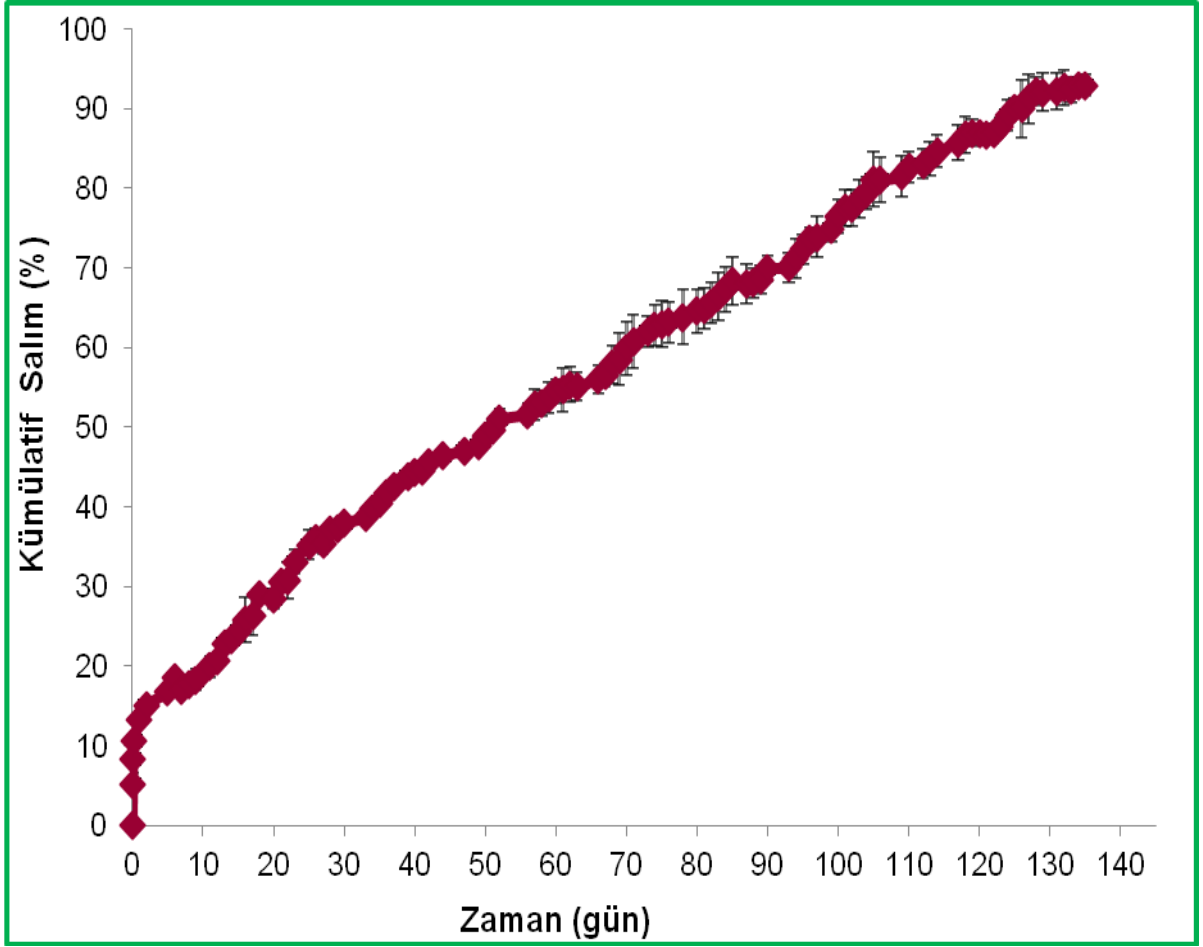
Nanopartiküllerin kitosan doku iskelelerine yüklenmesiyle 17- β estradiol'ün difüzyon mesafesinde bir artış meydana gelmiştir. Ayrıca, doku iskelesinin gözenekleri, 17- β estradiol'ün partikülden çıkıp ortama salımı sırasında bariyer vazifesi görmüştür. Bu nedenle kitosan/HA doku iskelelerine yüklenen PLGA nanopartiküllerden gerçekleşen 17- β estradiol salımının, doğrudan partiküllerden gerçekleşen salıma oranla daha kontrollü ve daha uzun sürede olması beklenen bir durumdur.

Hazırlanmış doku iskelelerine nanopartiküllerin emdirilmesiyle oluşturulan doku iskelelerinden salım çalışması 55 gün sürmüştür. Bölüm 3.6.'da anlatılan yöntemle salınan miktar analizleri yapılmıştır. Analizler sonucu elde edilen verilerden oluşturulan kümülatif salım profilinden 17- β estradiol'ün %100'ünün salındığı belirlenmiştir. Şekil 4.9.'da verilen kümülatif salım (%) grafiğinden anlaşıldığı gibi ilk 24 saatte 17- β estradiol salımı ani patlama (burst effect) etkisi göstermiş ve nanopartiküllerce kapsüllen E2 miktarının %18'i salınmıştır. Salınan miktar ilerleyen günlerde kontrollü bir şekilde artmıştır. E2'nin günlük salım miktarı ise ortalama 1.05 μ g 17- β estradiol/mg nanopartikül olarak bulunmuştur (Ek.3). Doku iskelelerine emdirilen nanopartiküller, doku iskelelerinin gözenekleri sayesinde homojen bir şekilde dağılmıştır ve böylelikle nanopartiküllerin topaklaşmaları engellenmiştir. Dolayısıyla nanopartiküle yüklenmiş 17- β estradiolün salımı kontrollü bir şekilde artarak devam etmiş ve 55 gün sonunda yapıdaki estradiolün tamamı salınmıştır (Şekil 4.9).



Şekil 4.9. 65:35 bileşimine sahip PLGA nanopartiküllerin emdirilerek yüklendiği kitosan/HA doku iskelelerinden estradiolün kümülatif salımı.

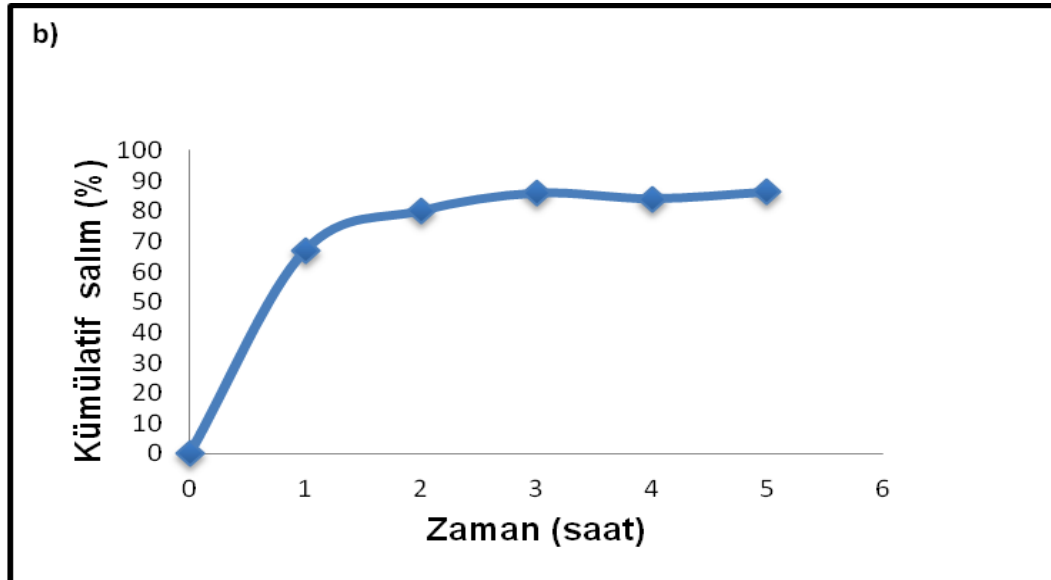
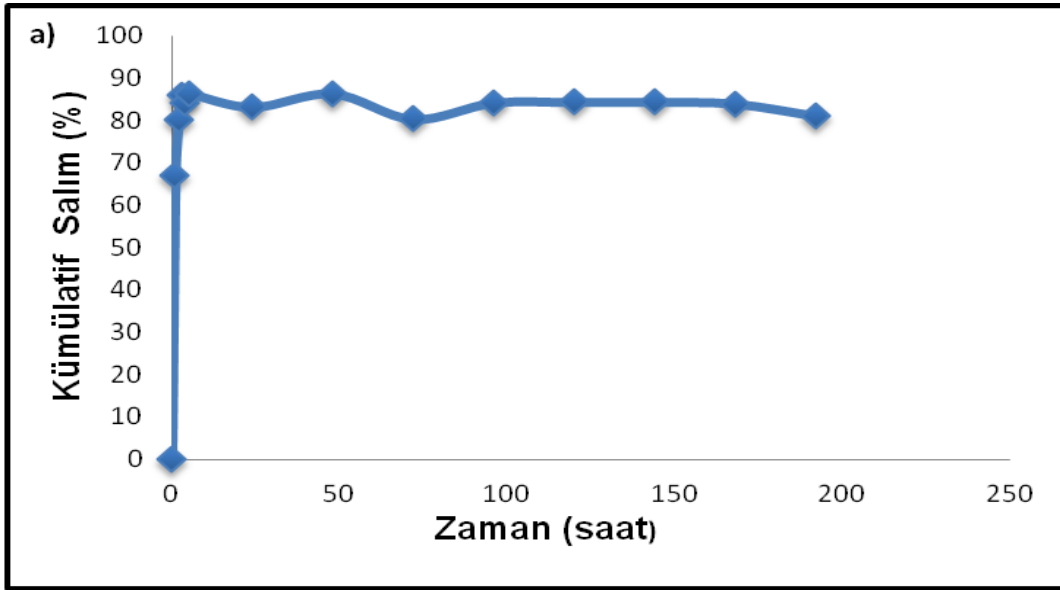
Nanopartiküller ayrıca, iskele üretimi sırasında kitosan çözeltisine katılarak eş zamanlı üretim-yükleme şeklinde yüklenmiş ve salım çalışması yapılmıştır. 135 gün sürdürülen çalışmada PLGA nanopartiküllere enkapsüle edilen E2 miktarının % 92'sinin salındığı ve günlük E2 salım miktarının ise ortalama 0.5 µg 17-β estradiol/mg nanopartikül olduğu kümülatif salım profilinden belirlenmiştir. (Şekil 4.10.'da verilen kümülatif salım (%) grafiğinden anlaşıldığı gibi ilk 24 saatte nanopartiküllerce kapsüllenen E2 miktarının %10'u ani patlama ile salınmıştır. İlerleyen günlerde ise kontrollü bir şekilde artmıştır. PLGA nanopartiküller, doku iskelesinin yapısına üretim aşamasında doğrudan katıldıklarından dolayı yapının derinliklerine de yüklenmişlerdir. Dolayısıyla 17-β estradiol'ün difüzyon süresi, partiküllerin doku iskelesine emdirildiği durumdan daha uzun olmaktadır. Ayrıca, doku iskelesinin gözenekleri, 17-β estradiol'ün nanopartikülden çıkıp ortama salımı sırasında bariyer vazifesi görmüştür. Bu nedenlerden dolayı salım, nanopartiküllerden salıma ve partiküllerin doku iskelesine emdirilerek yüklendiği duruma göre daha yavaş ve kontrollü olmaktadır.



Şekil 4.10. 65:35 bileşimine sahip PLGA nanopartiküllerin üretim aşamasında yüklendiği kitosan/HA doku iskelelerinden 17- β estradiolün kümülatif salımı.

4.5.3. Kitosan doku iskelelerine yüklenen suda çözünür formda 17- β estradiol salımı

17- β estradiolün sudaki çözünürlüğünü arttırmanın diğer bir yolu da siklodekstrine tutturmaaktır. Siklodekstrinler, lipofilik iç boşluk ve hidrofilik dış yüzeye sahip olmaları nedeniyle birçok hidrofobik molekülle inklüzyon kompleksi oluşturma yeteneğine sahiptir (Kanjickal et al., 2005). Siklodekstrin molekülünün içindeki boşluğun başka bir molekül tarafından doldurulmasıyla oluşan komplekse “inklüzyon kompleksi” denilmektedir (Başbağ, 2010). Ticari olarak bulunan siklodekstrin+E2 kompleksinde, E2 siklodekstrine tutturularak çözünürlüğü arttırılmıştır. Siklodekstrin+E2 kompleksi'nin sudaki çözünürlüğü 25 mg/mL'dir. Çalışma kapsamında 2 mg E2+siklodekstrin kompleksi PBS içerisinde çözündürülmüş ve kitosan/HA doku iskelelerine emdirilerek salım çalışması 10 mL PBS (pH:7.4) ortamında yürütülmüştür.



Şekil 4.11. Kitosan/HA doku iskelesinden suda çözünür formda 17- β estadiol salımı a) 8 günlük, b) 5 saatlik salım.

Şekil 4.11 a'da verilen salım profili incelendiğinde 17- β estradiolün ilk 5 saatte ani patlama etkisi gösterdiği ve % 80'inin salındığı belirlenmiştir. İlk 5 saatlik salım profiline bakıldığında (Şekil 4.11b) ise, en hızlı salımın ilk 1 saatte gerçekleştiği görülmektedir. Siklodekstrin aracılığıyla 17- β estradiolün hidrofilitesi arttığından dolayı PBS ortamı ile etkileştirildiğinde hızla ortama difüze olmuştur.

4.6. Hücre Kültür Çalışmaları

Hücre kültür çalışmaları, kitosan/HA doku iskeleleri, 17- β estradiol içeren nanopartiküllerin üretim aşamasında katıldığı kitosan/HA doku iskeleleri (Kitosan/HA+Np), 17- β estradiol yüklü nanopartikül emdirilmiş kitosan/HA doku iskeleleri (Kitosan/HA-Np) ve suda çözünen formda bulunan 17- β estradiol emdirilen kitosan/HA (Kitosan/HA+E2) şeklinde oluşturulan dört farklı grup ile yürütülmüştür.

Hücre kültür çalışmalarında adipoz kökenli mezenkimal kök hücrelerin (AdMSC) mitokondriyal aktiviteleri, hücre morfolojileri ve osteojenik farklılaşmaları incelenerek 17- β estradiol varlığının AdMSC'lerin osteojenik farklılaşması üzerindeki etkisi araştırılmıştır.

Hücre kültürü çalışmaları için doku iskelelerinde olması istenen E2 miktarının belirlenmesi için literatür bilgileri ve yapılan salım çalışmaları sonucu esas alınmıştır. Yapılan çalışmalarda E2'nin 10^{-6} - 10^{-12} M konsantrasyon aralığında, hücreler üzerine etkisi incelenmiş ve 10^{-7} M konsantrasyonun yaygın olarak farklılaşmada etkin rol oynadığı görülmüştür (Zhao et al., 2001; Hong et al, 2009; Hong, 2007).

Çalışma kapsamında, 9x2 mm boyutlarında olan her bir doku iskelesinde toplam 35 μ g E2 olacak şekilde 0.7 mg partikül yüklenmiştir. Kümülatif salım profilinden, 11x 4 mm boyutlarındaki bir doku iskelesi başına günlük ortalama salınan E2 miktarı kitosan/HA-Np doku iskelelerinden 1.05 μ g 17- β estradiol/mg nanopartikül, kitosan/HA+Np doku iskelelerinden ise 0.5 μ g 17- β estradiol/mg nanopartikül olarak bulunmuştur. Değerler göz önüne alındığında 9x2 mm boyutundaki bir doku iskelesinden günlük salınan E2 miktarının mg partikül başına ng seviyelerinde olduğu öngörülmektedir.

4.6.1. Adipoz kökenli mezenkimal kök hücrelerin karakteristikleri

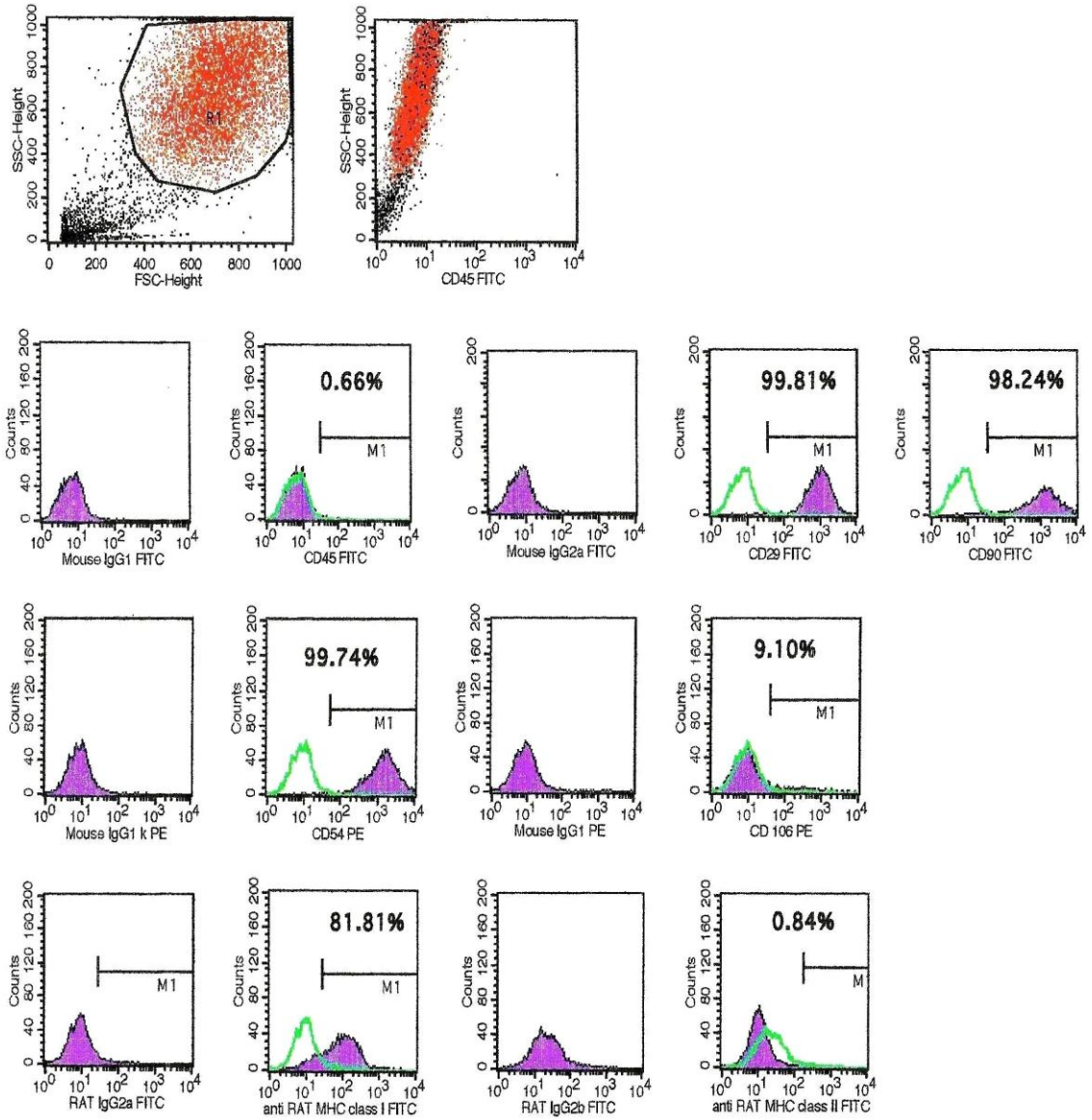
Akış sitometri analizi, hücrelerin akmakta olan bir akışkanın içindeyken karakteristiklerinin ölçülmesidir. Bu analiz ile süspansiyon halindeki hücreler lazer ışığı ile aydınlatılmakta olan bir bölmeden geçirilir; hücrelerin ışığın önünden geçerken verdikleri sinyaller toplanarak analiz edilir. Oluşan sinyallerin kaynağı, hücrenin büyüklük, granülarite gibi fiziksel özellikleri olabildiği gibi, hücreye

bağlanan çeşitli fluorokromlar da olabilir. Böylece hücrenin yüzey antijenleri, DNA içeriği, enzim aktiviteleri, hücre membran potansiyeli ve canlılığı gibi çeşitli özellikleri hakkında bilgi toplanabilir (Karaboz, 2008).

Mezenkimal kök hücrelerde bulunması ve bulunmaması gereken yüzey antijenlerinden bazıları şu şekilde belirlenmiştir: fenotip pozitif antijenler ($\geq 95\%$): CD105, CD73, CD90, CD29 ve fenotip negatif antijenler ($\leq 2\%$): CD45, CD34, CD14 ve CD79 (Karaöz, 2009).

Tez kapsamında kullanılan sıçan kökenli AdMSC'lere ait akış sitometri analiz sonuçları Şekil 4.12.'deki grafikler incelendiğinde hücrelerin CD29, CD90, CD54 ($\geq 95\%$) ve MHC sınıf 1 ($> 82\%$) işaretleyicileri için pozitif olduğu görülmüştür. CD29 (integrin- $\beta 1$) MSC yüzeyinde varlığı kanıtlanmış hücre-matris reseptörlerindendir. CD90 (Thy-1) immünoglobulin ailesine aittir ve MSC'ler için en iyi bilinen yüzey antijenlerindendir. Hücre-hücre etkileşimlerinde görev alan CD54 antijeni (ICAM-1) ise diğer pozitif antijenler gibi %99'un üzerinde bir oran ile işaretlenmiştir. CD45, CD106 ve MHC sınıf 2 antijenleri için oldukça düşük işaretlenme oranları bulunmuştur ($\leq 1\%$) (Şekil 4.12). CD45 (protein tirozin fosfataz, reseptör, C) hematopoetik ve endotel hücrelere özgü bir antijendir, bu nedenle MSC'lerin bu antijeni eksprese etmemesi beklenir. CD106 (VCAM-1) hücre-hücre etkileşimlerinde görev alan bir reseptördür ve bazı çalışmalarda MSC'ler için pozitif antijen olduğu belirtilmiştir. MHC sınıf 1 ve 2, bağışıklık düzenleyici reseptörlerdir ve literatürle uyumlu bir şekilde, hücreler MHC sınıf 1 için pozitif, MHC sınıf 2 için negatif bulunmuştur (Docheva, 2008). Tüm sonuçlar birlikte değerlendirildiğinde hücrelerin yüksek saflıkta olduğunu söylemek mümkündür.

AdMSC'lerin kültürdeki morfolojileri optik mikroskop ve floresan mikroskobu ile incelenmiş ve görüntüleri alınmıştır (Ek.4).

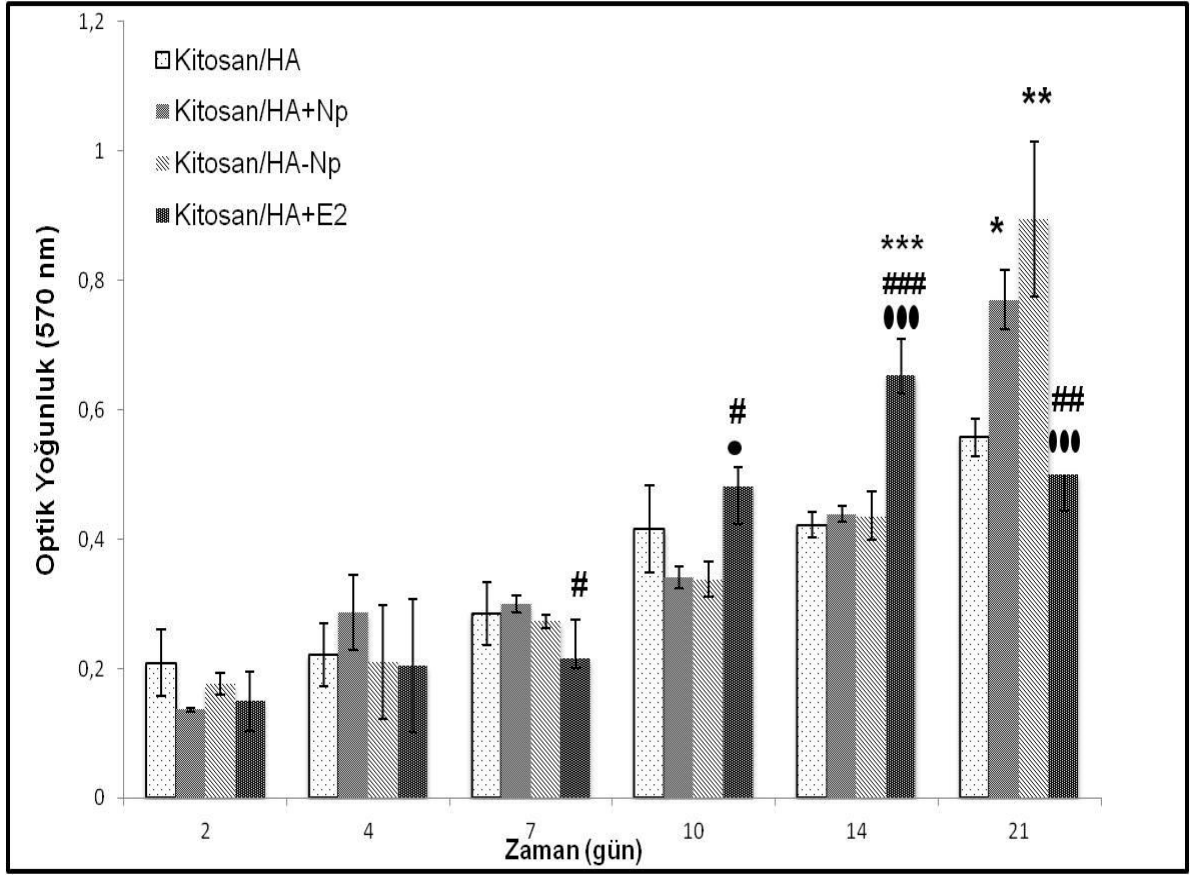


Şekil 4.12. Sıçan kökenli AdMSC'lere ait akış sitometri analiz sonuçları.

4.6.2. MTT analizi

Adipoz kökenli mezenkimal hücrelerin, doku iskelelerindeki mitokondriyal aktiviteleri kültürün belirli günlerinde yapılan MTT analizi ile belirlenmiştir. Canlı hücrelerin mitokondrisi tetrazolyum bileşenini indirgeyerek formazan kristallerine dönüştürmektedir. Oluşan bu kristaller çözündüğünde ortaya çıkan mor renkli çözeltinin absorbands değeri belirlenir. Elde edilen bu absorbands değeri, üremesini devam ettiren canlı hücre miktarı ile doğru orantılıdır. MTT analizi sonucu elde

edilen veriler 570 nm’de belirlenen optik yoğunluk değerleri olarak Şekil 4.13’de verilmiştir.



Şekil 4.13. Kitosan/HA doku iskeleleri, kitosan/HA+Np doku iskeleleri, kitosan/HA-Np doku iskeleleri ve kitosan/HA+E2 doku iskeleleri üzerinde kültüre edilmiş AdMSC'lere ait MTT sonuçları (İstatistiksel olarak anlamlı farklılık, n=3, kontrol grubu kitosan/HA iken * p<0.05, ** p<0.01, *** p<0.001; kontrol grubu kitosan/HA+Np iken # p<0.05, ## p<0.01, ### p<0.001; kontrol grubu kitosan/HA-Np iken • p<0.05, ●●● p<0.001) .

Yapılan MTT analizi sonucunda kültürün ikinci haftasına kadar AdMSC'lerin mitokondriyal aktivitelerinin değişmediği, daha sonrasında ise artan bir şekilde devam ettiği anlaşılmaktadır. Literatür araştırması yapıldığında elde edilen sonuçların yapılan çalışmalarla ve verilen bilgilerle uyumlu olduğu belirlenmiştir. Carvalho ve arkadaşları (2012) AdMSC'lerin kitosan doku iskeleleri üzerinde osteojenik farklılaşma potansiyellerini araştırmışlar ve optik yoğunluğun, kültürün ikinci haftasına kadar sabitken osteojenik indüklenmenin başladığı ikinci haftada en yüksek değerlere ulaştığını, üçüncü haftada ise düştüğünü gözlemişlerdir. AdMSC'lerin, β -Trikalsiyum fosfat/HA üç boyutlu doku iskeleleri üzerinde

osteojenik farklılaşmasının araştırıldığı bir başka çalışmada ise AdMSC'lerin kültür süresince canlılıkları MTT analizi ile belirlenmiş ve kültürün 14. gününden itibaren belirgin bir artış gözlenmiştir (Marino et al., 2010).

Şekil 4.13.'den anlaşılacağı gibi kültürün ilk 7 gününde farklı gruplar üzerinde bulunan hücrelerin mitokondriyal aktiviteleri arasında anlamlı bir farklılık bulunmamıştır. Kitosan/HA+Np ve Kitosan/HA-Np doku iskelelerine ekilen hücrelerin MTT değerleri 21. güne kadar artmakta ve 21. günde kültürdeki en yüksek değere ulaşmaktadır. Bu değer 17- β estradiol içermeyen kitosan/HA grubu ile karşılaştırıldığında, istatistiksel olarak anlamlı farklılık bulunmuştur (kitosan/HA-Np, $p<0.01$; kitosan/HA+Np, $p<0.1$).

Kitosan/HA+E2 doku iskeleleri üzerine ekilen hücrelerin optik yoğunlukları, kültürün 10. gününde diğer gruplara göre daha yüksektir. Bu grubun MTT değeri, 14. günde en yüksek değerine ulaşmıştır. Daha sonrasında ise azalmıştır. Kültürün 14. gününde kitosan/HA+E2 doku iskelelerine ekilen hücrelerin MTT değerleri ile diğer üç gruba ekilen hücrelerin MTT değerleri arasındaki farklılık oldukça anlamlı bulunmuştur ($p<0.001$).

17- β estradiol'ün mezenkimal kök hücrelerinin çoğalmasını arttırdığı literatürde belirtilmiştir (Qu et al., 1998). MTT değerlerine göre 17- β estradiol'ün hücre canlılığına ve çoğalmasına etkisi, kültürün ikinci haftasından itibaren gözlenmektedir. Bu etki ilk olarak, kültürün 10. günde, kitosan/HA+E2 doku iskelelerinde görülmektedir. Bunun nedeni ise, Bölüm 4.5.3.'de anlatıldığı gibi kitosan/HA+E2 doku iskelelerinden E2 salımının, E2 içeren diğer gruplara göre daha hızlı olmasıdır. Kitosan/HA+Np ve Kitosan/HA-Np doku iskelelerinin yapısında bulunan 17- β estradiolün salımı ise kontrollü ve yavaş olmaktadır. Bu nedenle bu gruplardan salınan 17- β estradiol, kültürün ilerleyen günlerinde etkisini göstermiş ve optik yoğunluk 21. günde oldukça yüksek bir değere ulaşmıştır. Kitosan/HA-Np ve Kitosan/HA+Np gruplarının arasında ise anlamlı bir fark gözlenmemiştir.

Sonuç olarak, adipoz kökenli mezenkimal kök hücrelerin 4 farklı doku iskelesine de yapıştığı ve çoğaldığı ancak, hücrelerin aktivitelerinin en yüksek olduğu

örneklerin, 17- β estradiol içeren örnekler olduğu görülmektedir. Bu durum 17- β estradiol'ün adipoz kökenli MSC üremesini arttırdığını kanıtlamaktadır.

4.6.3. Taramalı elektron mikroskop (SEM) analizi

Hücrelerin doku iskeleleri üzerine yapışması ve yayılması, hücre çoğalması ve farklılaşması açısından önemlidir. Bu nedenle adipoz kökenli mezenkimal kök hücrelerin östrojen varlığında ve yokluğunda kitosan/HA doku iskelelerindeki yapışma ve yayılmaları SEM ile görüntülenmiştir.

SEM görüntüleri incelendiğinde AdMSC'lerin kitosan/HA doku iskelelerinin yüzeyine yapıştıkları ve yayıldıkları açıkça görülmektedir (Şekil 4.14, 4.15, 4.16 ve 4.17). Doku iskelesinin büyük boyutlarda ve içsel bağlantılı gözeneklere sahip olması nedeniyle, hücreler doku iskelesinin iç bölgelerine doğru yayılmaya devam etmişlerdir (Şekil 4.14g). Hücrelerin nano boyutlardaki uzantıları ile gözenek duvarları boyunca köprüler oluşturarak üç boyutlu şekilde çoğaldıkları görülmektedir. Hücreler, birbirleriyle etkileşmek üzere HA taneciklerini dayanak olarak kullanarak bu tanecikler üzerinde ve arasında hücreler köprüleri oluşturmuştur. SEM görüntülerinden, MTT sonuçları ile paralel bir şekilde kültürün 14. gününde hücre yoğunluğunun, 4. gününe oranla arttığı anlaşılmaktadır. Ayrıca, 14. günde AdMSC'lerin osteojenik farklılaşmasına işaret olarak, hücre membranlarında mineral birikimleri gözlenmiştir (Şekil 4.14.f 4.15h, 4.16f-g, 4.17e).

SEM görüntülerinde, 4 farklı doku iskelesi üzerinde bulunan AdMSC'lerin, osteoblast benzeri morfolojiye sahip olduğu görülmektedir. Doku iskelesi yapısındaki $-NH_2$ gruplarının varlığı osteogenezi desteklemektedir (Curran, 2006). Literatür bilgileri incelendiğinde AdMSC'lerin uygun farklılaşma ortamı sağlandığında kitosan yüzeyler üzerinde osteoblast benzeri morfolojiye dönüştükleri görülmüştür (Carvalho et al., 2012; Zhu et al., 2009). Literatür bilgileri, çalışma kapsamında incelenen SEM görüntülerini desteklemekte olup, AdMSC'lerin osteojenik farklılaşmaya gittiklerini vurgulamaktadır.

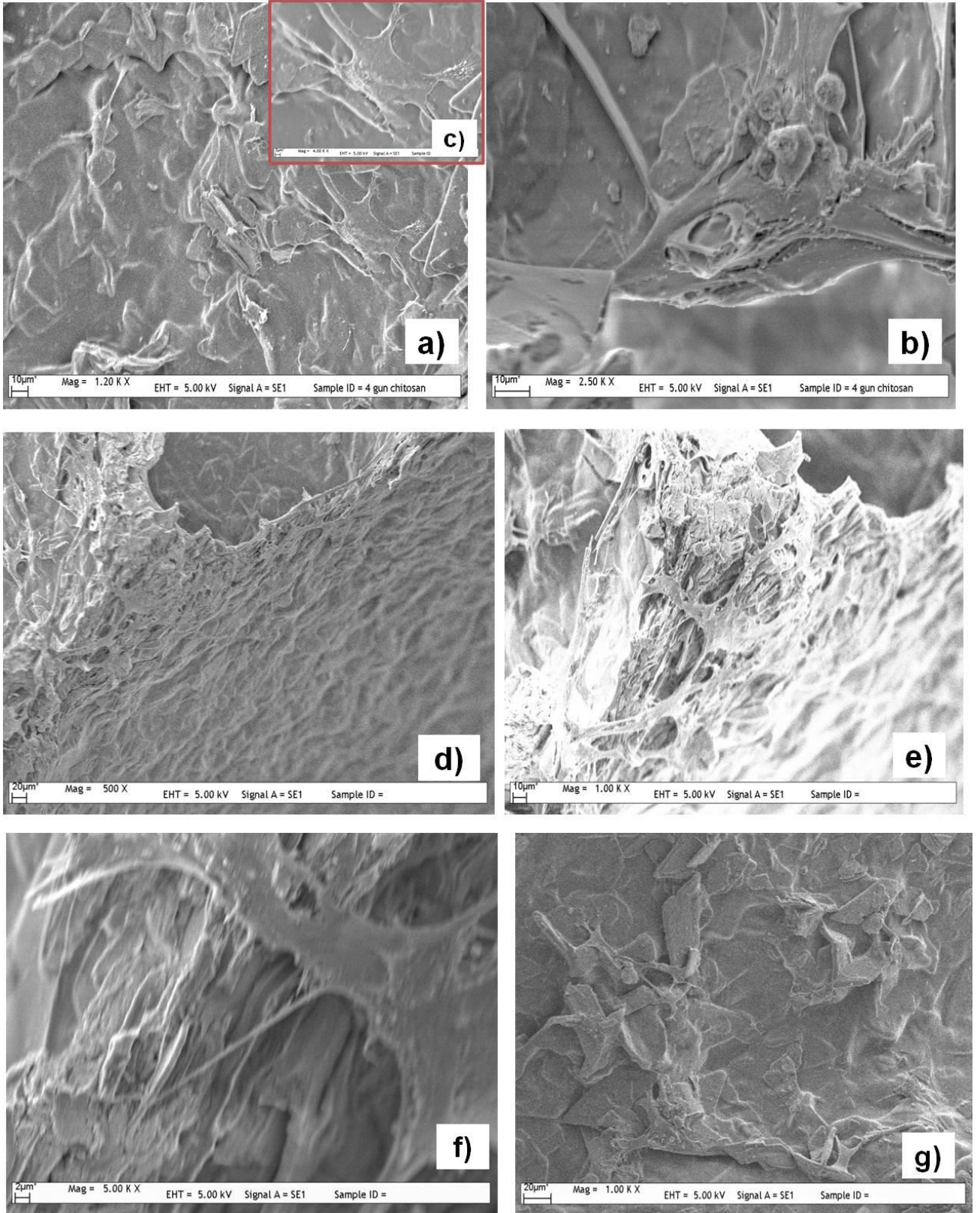
Kültürün 4. gününde 4 farklı doku iskelesi üzerine ekilen AdMSC morfolojileri Şekil 4.14a, 4.15a, 4.16a ve 4.17a'da görülmektedir. Doku iskelesi üzerinde hücre yoğunluğunun az olmasından dolayı hücreler tek tek dağılmışlardır.

Görüntülerden, AdMSC'lerin östrojen içeren ve içermeyen kitosan/HA doku iskelelerine yapıştıkları ve yayıldıkları açıkça görülmektedir. Hücreler sitoplazmik uzantıları ile hidroksiapatitlere yönelmekte ve onlara tutunmaktadırlar. HA'nın osteoindüktif yapısı nedeniyle hücre farklılaşmasına katkısı olmaktadır. Kitosan/HA-Np grubunda hücrelerin nanopartiküllerin yoğun olduğu bölgelerde toplanıp yayılmadıkları görülmektedir (Şekil 4.16a ve 4.16b). Bu durum, hücrelerin estradiol'ün etkisi ile gelişen farklı sinyal yolları ile üremeye değil de farklılaşmaya yönelmiş olabileceğini düşündürmektedir.

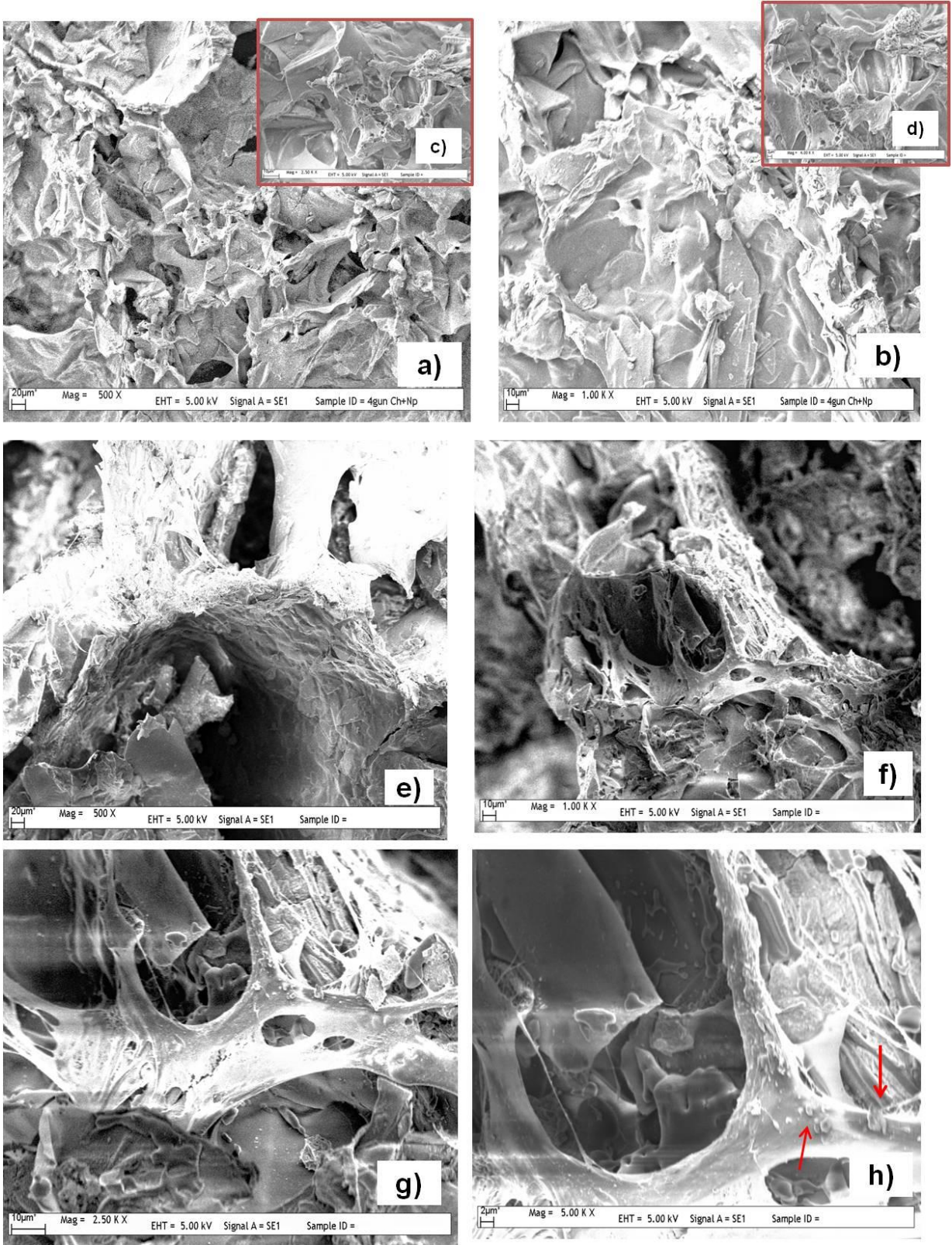
Kültürün 14. gününde ise, MTT değerleri ile uyumlu bir şekilde hücre yoğunluğunun arttığı görülmektedir. Hücreler kendi ekstraselüler matrislerini üretmişlerdir. Kitosan/HA-Np grubunda hücre yoğunluğunun diğer gruplara göre daha fazla olduğu görülmektedir. Bu grupta, hücrelerin oluşturduğu ECM yapısının doku iskelesini, iskelenin gözeneklerini kapatmayacak şekilde kapladığı görülmektedir (Şekil 4.16). Kitosan/HA+Np grubunda da hücrelerin oluşturdukları ECM'nin iskele yüzeyini kaplamaya başladığı gözlenmiştir.

Ayrıca 14. günde hücrelerin mineralize oldukları görülmüştür. 17- β estradiol içeren gruplarda mineralizasyonun daha fazla olduğu Şekil 4.14f, 4.15h, 4.16f, 4.16g ve 4.17e'de açıkça görülmektedir. Kitosan/HA-Np grubunda ise büyük boyutlarda mineraller görülmektedir. Ayrıca Şekil 4.15 ve 4.16'dan kitosan/HA-Np ve kitosan/HA+Np gruplarında hücrelerin PLGA nanopartiküllerin yoğun olarak toplandığı yere doğru yöneldiği de gözlenmiştir (Şekil 4.15f ve 4.16d). Kitosan/HA+E2 grubunda da hücre yoğunluğu az olmasına karşın hücreler mineralize olmuştur. 17- β estradiolün mineralizasyonu arttırdığı görüntülerden açıkça anlaşılmaktadır.

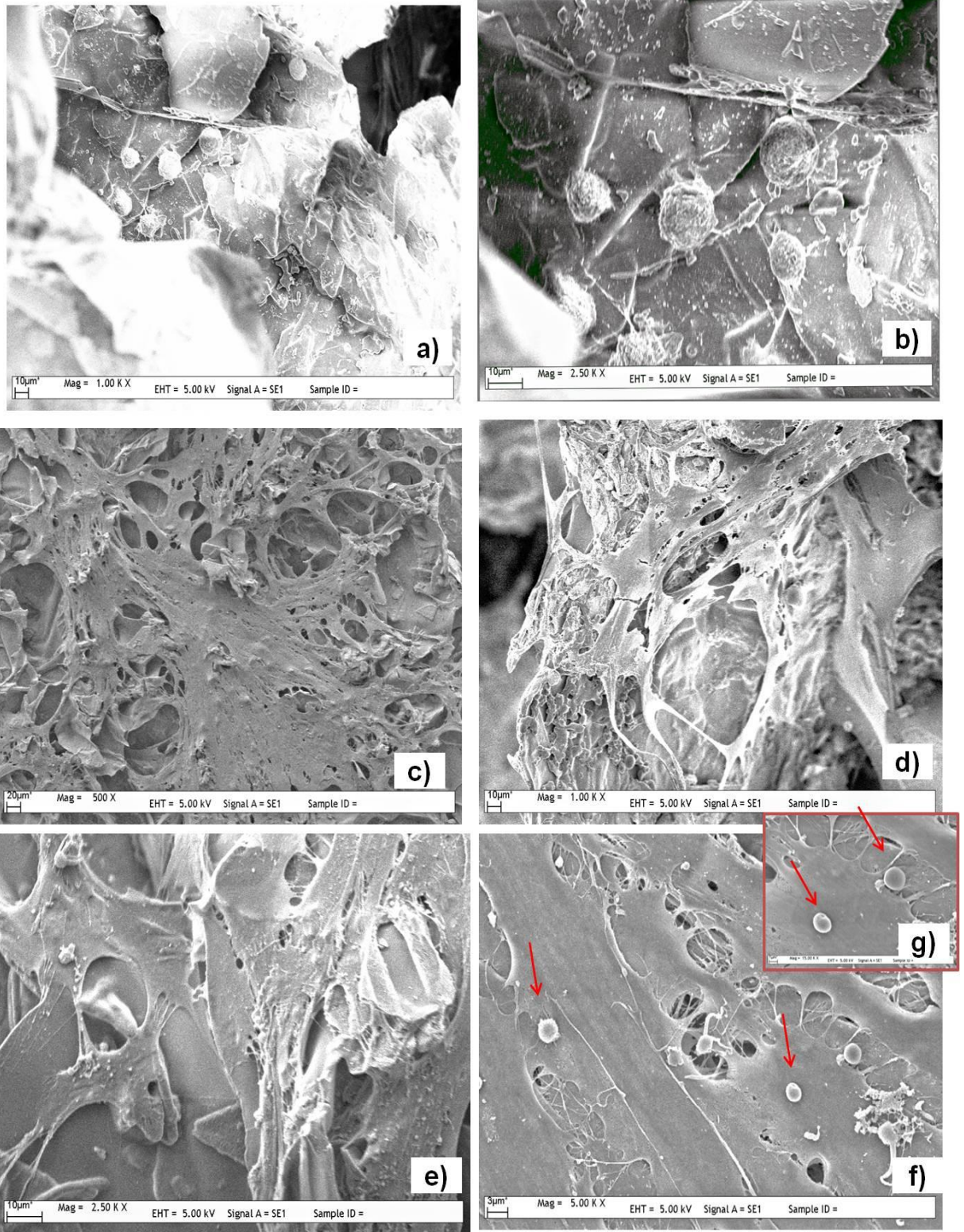
Sonuç olarak östrojenin, MTT sonuçları ile paralel olarak AdMSC hücrelerinin kitosan/HA yüzeyde çoğalmasını arttırdığı, osteojenik farklılaşma sürecini hızlandırdığı ve mineralizasyonu arttırdığı SEM görüntüleri ile de desteklenmiştir.



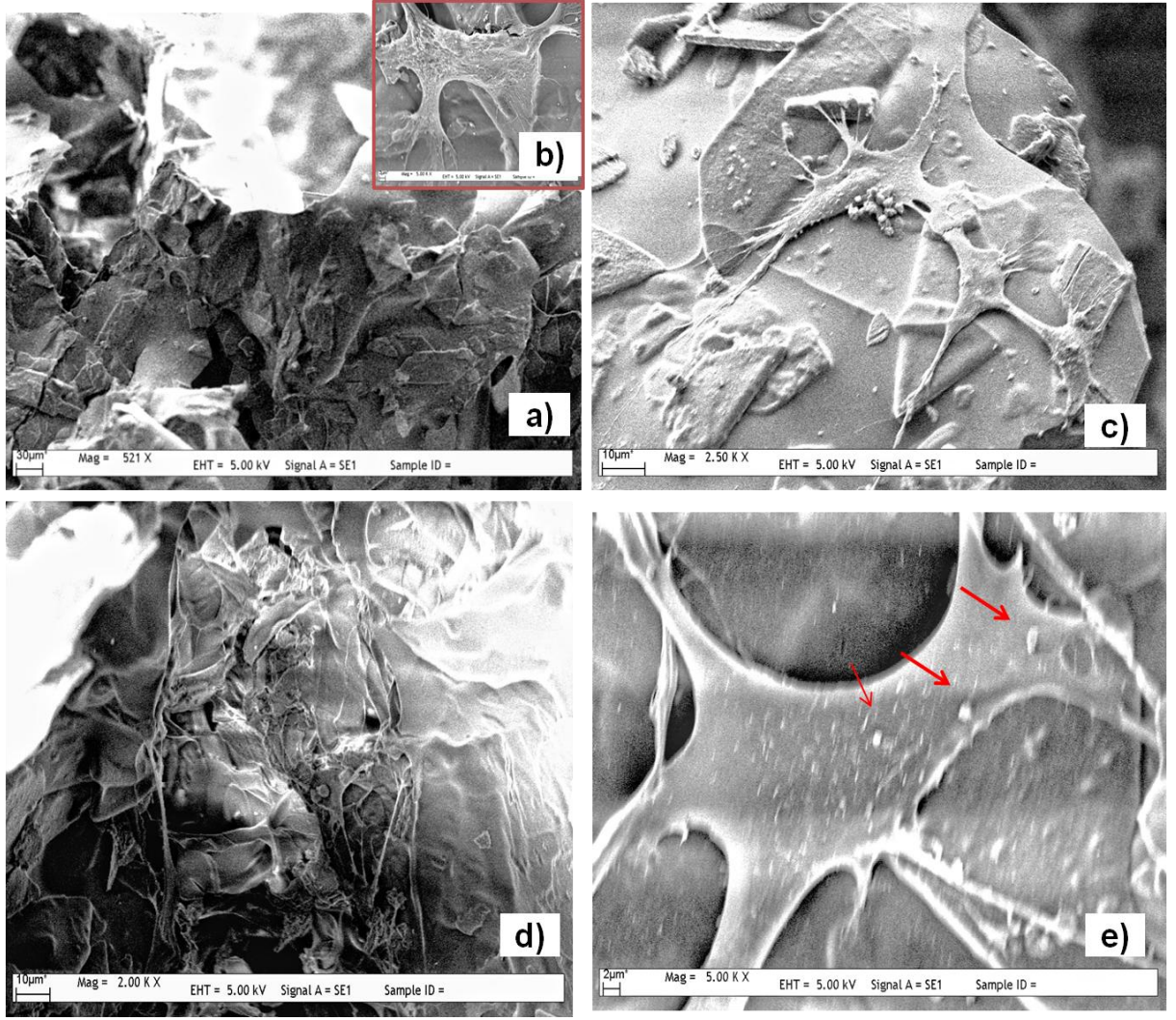
Şekil 4.14. Kitosan/HA doku iskelelerinde kültüre edilen AdMSC'lere ait SEM görüntüleri. a) 4.gün, 1000X, b) 4.gün 2500X, c) 4.gün, 4000X, d)14. gün, 500X, e) 14. gün, 1000X, f)14. gün, 5000X, g) 14. gün, yan kesit 1000X.



Şekil 4.15. Kitosan/HA+Np doku iskelelerinde kültüre edilen AdMSC'lere ait SEM görüntüleri: a) 4. gün, 500X, b) 4.gün, 1000X, c) 4.gün 2500X, d) 4.gün 4000X e) 14.gün, 500X, f) 14.gün, 1000X, g) 14. gün, 2500X, h) 14. gün 5000X. Mineralizasyonun varlığı ok ile gösterilmiştir.



Şekil 4.16. Kitosan/HA-Np doku iskelelerinde kültüre edilen AdMSC'lere ait SEM görüntüleri: a) 4. gün, 1000X, b) 4.gün, 2500X, c) 14.gün 500X, d) 4.gün 1000X e) 14.gün, 2500X, f) 14.gün, 5000X, g) 14. gün, 15000X. Mineralizasyonun varlığı ok ile gösterilmiştir.

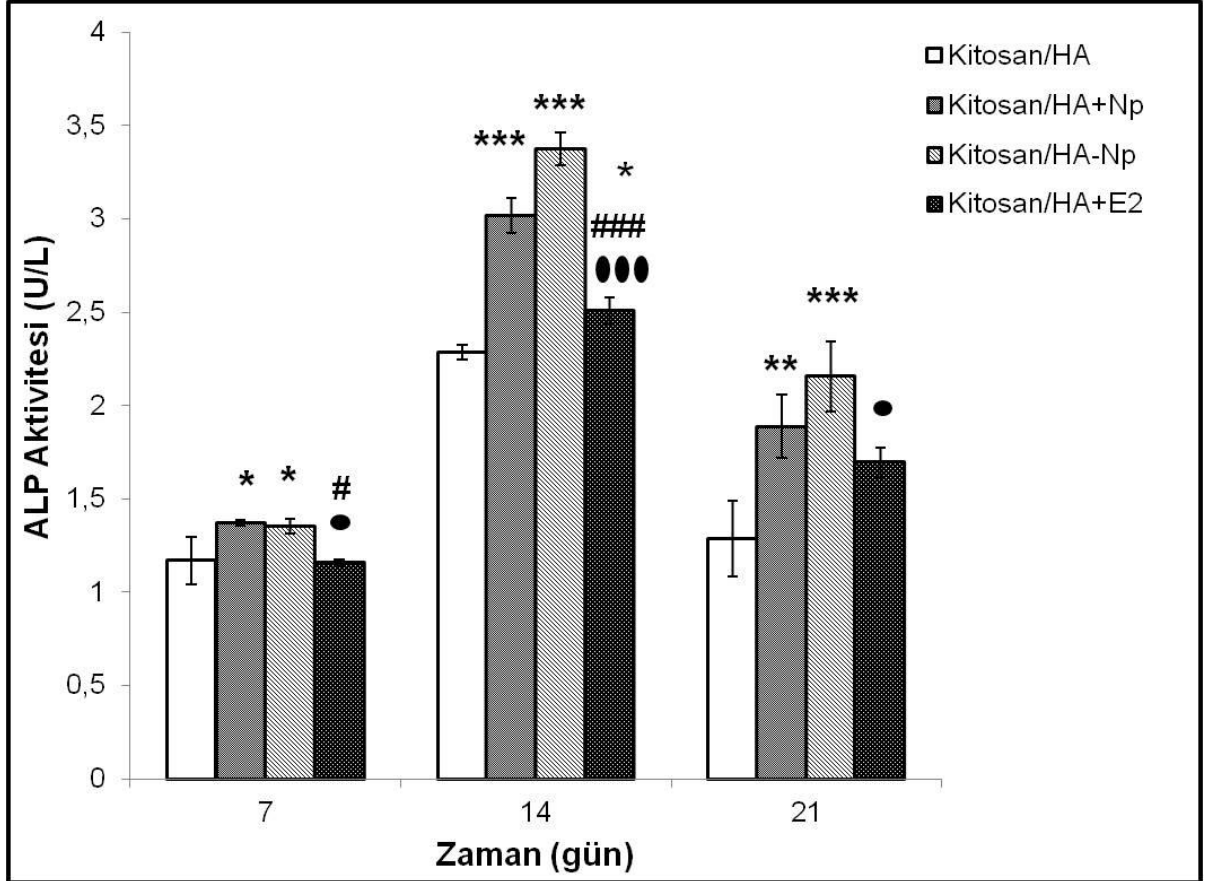


Şekil 4.17. Kitosan/HA+E2 doku iskelelerinde kültüre edilen AdMSC'lere ait SEM görüntüleri: a) 4. gün, 500X, b) 4.gün, 5000X, c) 14.gün 2500X, d) 14.gün 2000X e) 14.gün, 5000X. Mineralizasyonun varlığı ok ile gösterilmiştir.

4.6.4. ALP aktivitesi

Alkalen fosfataz (ALP) kemik metabolizmasıyla ve osteoblastların farklılaşmasıyla bağlantılı olan kemik matris enzimidir. Kemik oluşum sürecinde belirteç olarak kullanılan ALP, kemik sialoproteini II, osteonektin ve kemik morfojenik proteini-2 (BMP-2) öncü olarak sentezlenirken, osteopontin ve osteokalsin sonraki evrelerde sentezlenmektedir (Koç, 2008). Bu nedenle ALP aktivitesi, osteoblast farklılaşması ve osteojenik özelliklerinin belirlenmesinde en sık incelenen parametredir (Ohbayashi et al. 1999). Literatür bilgileri incelendiğinde AdMSC'lerin osteojenik farklılaşma potansiyellerinin araştırıldığı çalışmalarda ALP aktivitelerinin 14. günde en yüksek değere ulaştığı, daha sonra ise bir miktar azaldığı gözlenmiştir

(Carvalho et al., 2012; Marino et al., 2010). Osteoblastik hücrelerde östrojen, ALP ekspresyonunu artırarak mitojenik etki göstermektedir (Compston, 2001). 17- β estradiolün mezenkimal kök hücrelerin osteojenik farklılaşmasına olan etkisinin araştırıldığı çalışmalarda E2'nin, hücrelerin ALP aktivitelerini arttırdığı gözlenmiştir (Hong et al., 2006, 2007).



Şekil 4.18. Kitosan/HA doku iskeleleri, kitosan/HA+Np doku iskeleleri, kitosan/HA-Np doku iskeleleri ve kitosan/HA+E2 doku iskeleleri üzerinde kültüre edilmiş AdMSC'lere ait ALP sonuçları (İstatistiksel olarak anlamlı farklılık, n=3, kontrol grubu kitosan/HA iken * p<0.05, ** p<0.01, *** p<0.001; kontrol grubu kitosan/HA+Np iken # p<0.05, ## p<0.01, ### p<0.001; kontrol grubu kitosan/HA-Np iken • p<0.05, ●●● p<0.001) .

Kitosan/HA, nanopartikül yüklü kitosan/HA ve siklodekstrin+E2 yüklü kitosan/HA doku iskeleleri üzerinde çoğalan AdMSC hücrelerinin erken dönem farklılaşması ALP aktivitesinin ölçümüyle incelenmiştir. Kültürün 7., 14. ve 21. günlerine ait örneklerle yapılan ALP analizi sonucu elde edilen ALP aktivitesi grafiği Şekil 4.18.'de verilmiştir. Kültürün 7. gününde kitosan/HA+Np ve kitosan/HA-Np grupları yaklaşık aynı değere sahiptirler ve bu değer kontrol grubu olan kitosan/HA

grubundan yüksektir ($p<0.05$). Kültürün 14. gününde ise bütün grupların ALP değerleri artmıştır. Kitosan/HA+Np ve kitosan/HA-Np doku iskelelerinin ALP aktivitesi kontrol grubu olan kitosan/HA grubuna göre oldukça fazladır ($p<0.001$).

Sonuç olarak, 4 grup iskelenin erken osteoblastik farklılaşma belirtici olan ALP aktivite artışını desteklediği, ancak en yüksek ALP değerlerinin tez kapsamında geliştirilen 17- β estradiol içeren PLGA nanopartiküllerin emdirilerek yüklendiği kitosan/HA doku iskelelerinden elde edildiği belirlenmiştir.

4.6.5. Gerçek zamanlı polimeraz zincir reaksiyonu (RT-PCR) analizleri

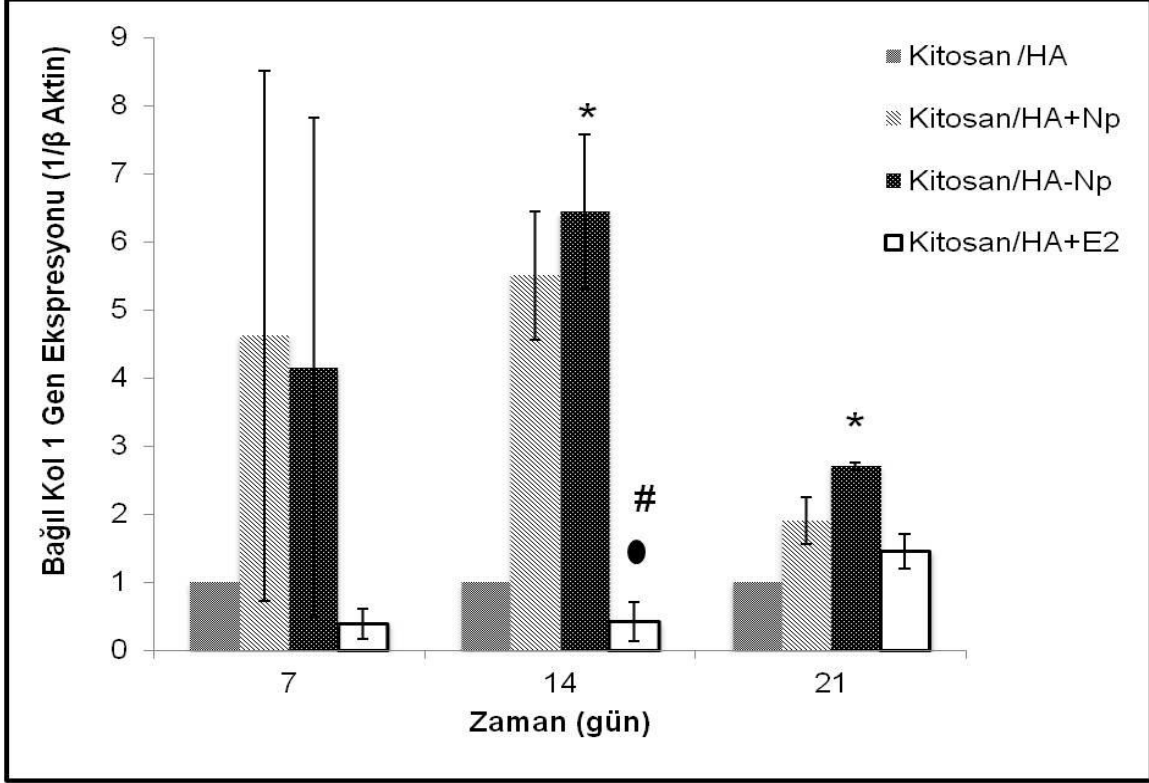
RT-PCR, DNA'nın spesifik bir parçasının in-vitro ortamda hızlı bir şekilde çoğaltılmasını sağlayan bir tekniktir (Gibson et al., 1996). PCR'ın çalışma prensibi izole edilen hedef genetik materyallerin (DNA veya RNA), spesifik kısa zincirli oligonükleotit primerler yardımıyla sayısal olarak çoğaltılmasıdır (amplifikasyon).

Çift zincirli DNA'ya bağlandıkları zaman floresan veren Cyber green gibi boyalar kullanılarak çoğalmaya bağlı DNA artışı floresan miktarı ile ölçülmektedir. RNA molekülü ile gerçekleştirilen PCR çalışmalarında, öncelikle komplementer DNA (cDNA) sentezine ihtiyaç duyulmaktadır. Bunun için ters transkriptaz (Revers Transcriptase) enzimi ile mRNA'nın kalıbı oluşturulmakta ve elde edilen cDNA doğrudan PCR işleminde kullanılmaktadır.

PCR'ın gerçekleşmesi için; kalıp olarak kullanılacak DNA örneği, çoğaltılacak bölgeye uygun şekilde tasarlanmış primer dizisi, deoksinükleotid trifosfatlar (dNTPs), yüksek sıcaklığa dayanıklı AVM polimeraz enzimi, uygun pH ve tampon çözelti gerekmektedir.

Tipik bir PCR üç temel basamakta gerçekleşir: İlk aşamada DNA molekülünün çift zincirli yapısı yüksek sıcaklık (çoğunlukla 94°C-97°C arasında) yardımıyla birbirinden ayrılır (denatürasyon). Denatürasyonu takiben daha düşük sıcaklıklarda oligonükleotid primerler, ayrılmış olan tek zincirli DNA üzerinde kendi eşlenikleri olan bölgelere bağlanırlar. Bu olay çoğunlukla 47°C-60°C arasında gerçekleşir. Son aşamada sıcaklık 72°C'ye kadar artırılarak DNA polimeraz enziminin tamamlayıcı DNA zincirini uzatması sağlanır.

Osteoblastik farklılaşma sırasında hücreler ALP, tip I kollajen (KOL I), kemik sialoproteini ve osteokalsin (OCN) gibi belirteçleri salgılamaktadırlar. Tez çalışmasında osteoblast belirteci olan OCN ve kollajen I için RT-PCR sonuçları mRNA ekspresyonunda kitosan iskeledeki değerin kat artışı olarak gösterilmiştir (Şekil 4.19 ve 4.20).



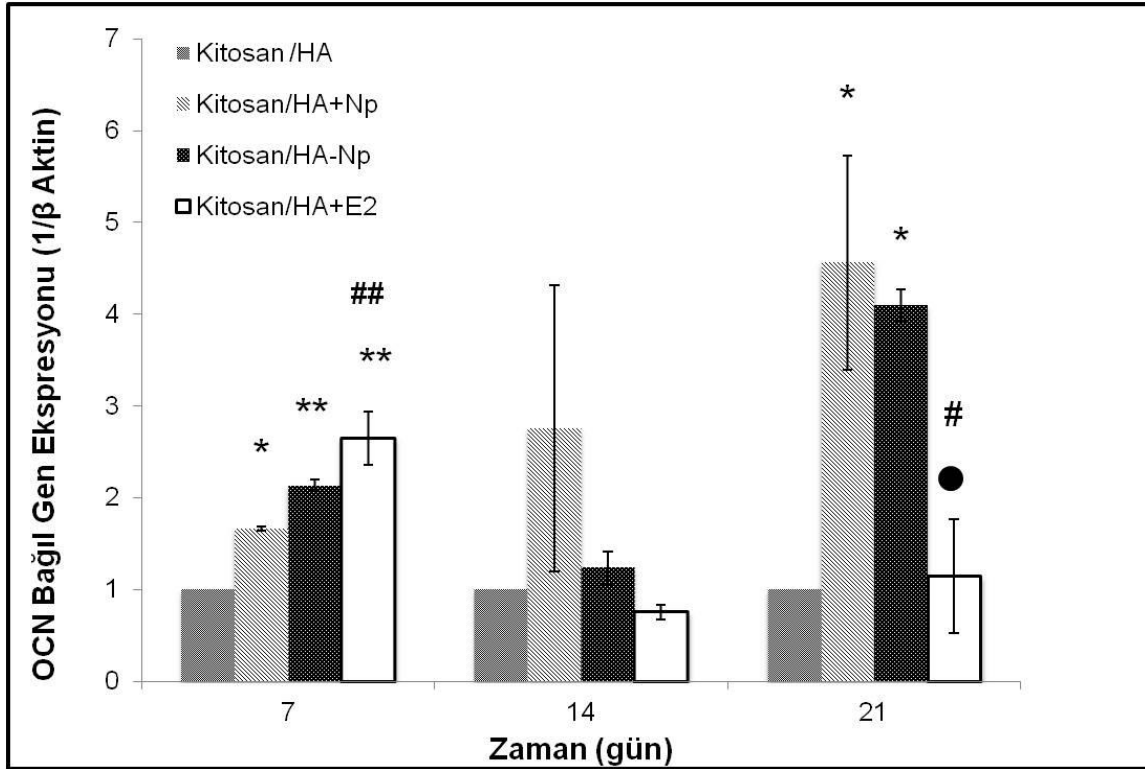
Şekil 4.19. Kitosan/HA doku iskeleleri, kitosan/HA+Np doku iskeleleri, kitosan/HA-Np doku iskeleleri ve kitosan/HA+E2 doku iskeleleri üzerinde kültüre edilmiş AdMSC'lere ait bağıl tip I kollajen gen ekspresyonu (İstatistiksel olarak anlamlı farklılık, n=2, kontrol grubu kitosan/HA iken * p<0.05; kontrol grubu kitosan/HA+Np iken # p<0.05; kontrol grubu kitosan/HA-Np iken • p<0.05).

Organik matrisin yaklaşık % 90'nı oluşturan kollajen sentezi osteoblastlar tarafından gerçekleştirilir. Kollajenin organizmada en fazla bulunan çeşidi kollajen tip-I'dir ve bağ dokusunda geniş bir alan teşkil etmektedir. Kollajen kemiğin temel yapılarından biridir ve mekanik dayanımını sağlar.

Şekil 4.19 incelendiğinde doku iskeleleri üzerindeki kollajen tip I gen ekspresyonu 7. günde kitosan/HA grubuna göre kitosan/HA+Np grubunda 4,5 kat, kitosan/HA-Np grubunda da 4 kat fazladır. Kollajen I ekspresyonu 14. günde kitosan/HA-Np grubunda en fazladır. 21. günde ise tüm gruplarda değerler düşmüştür. 21. günde

en yüksek kollajen tip I sentezinin kitosan/HA-Np grubunda olduğu görülmektedir. Elde edilen sonuçlar SEM fotoğraflarında 14. günde gözlenen ECM artışını desteklemektedir.

Literatür bilgileri incelendiğinde benzer sonuçlar elde edildiği görülmüştür. Qu ve arkadaşlarının (2008) yaptığı bir çalışmada östrojenin, kök hücrelerin osteoblastik farklılaşmasına olan etkisini incelemek amacıyla tip I kollajen mRNA seviyeleri RT-PCR analizi ile belirlenmiş ve mRNA seviyesinin 17. güne kadar arttığı, daha sonra ise düştüğü gözlenmiştir.



Şekil 4.20. Kitosan/HA doku iskeleleri, kitosan/HA+Np doku iskeleleri, kitosan/HA-Np doku iskeleleri ve kitosan/HA+E2 doku iskeleleri üzerinde kültüre edilmiş AdMSC'lere ait bağıl osteokalsin gen ekspresyonu (İstatistiksel olarak anlamlı farklılık, n=2, kontrol grubu kitosan/HA iken * p<0.05, ** p<0.01; kontrol grubu kitosan/HA+Np iken # p<0.05, ## p<0.01; kontrol grubu kitosan/HA-Np iken ● p<0.05) .

Osteokalsin, kemik dokusunda mineralizasyon ve kalsiyum iyon dengesini sağlamada görevli olan küçük bir proteindir. Kemğin temel iki bileşeni olan kollajen ve hidroksiapatite bağlanabilmektedir. Serumda yüksek oranda bulunan osteokalsin kemik mineral yoğunluğunun artışına işarettir (Koç, 2008).

Yedinci gün OCN gen ekspresyonları östrojen içeren gruplarda kitosan/HA grubuna göre fazladır. OCN ekspresyonu en yüksek değere kitosan/HA+E2 grubunda ulaşmıştır. Bölüm 4.5.3.'de anlatıldığı gibi suda çözünür E2'nin doku iskelelerinden salımı, E2 içeren diğer gruplara göre daha hızlı olduğundan dolayı bu grupta E2'nin etkisi daha erken ortaya çıkmaktadır. OCN ekspresyonun 7. günde E2 içeren grupta fazla olması, östrojenin OCN sentezini arttırdığına işaret etmektedir.

Literatür çalışmaları incelendiğinde OCN'nin 14. günden itibaren arttığı görülmüştür. Östrojenin osteojenik farklılaşmaya olan etkisinin araştırıldığı çalışmalarda da östrojenli gruplarda OCN belirteci ilk kez 10. günde görülmüştür (Hong et al., 2007) Östrojenin OCN ekspresyonundaki artışa etkisi ise 14. günden itibaren etkili olmuştur (Qu et al, 1998; Hong et al., 2009).

OCN ekspresyonunda 14. günde belirgin bir artış gözlenmezken, 21. günde kitosan/HA grubuna göre, kitosan/HA+Np grubu 4.5 kat ve kitosan/HA-Np grubu ise 4 kat fazladır. Geç dönem osteojenik farklılaşmanın bir belirteci olan OCN ekspresyon seviyelerindeki artışın nanopartikül yüklü gruplarda daha fazla olması bu gruplarda farklılaşmanın ve matris mineralizasyonun daha fazla desteklendiğini göstermektedir.

5. GENEL SONUÇLAR

Sunulan tez çalışmasının amacı, kemik rejenerasyonuna yönelik olarak, östrojenik etkisi en yüksek östrojen çeşidi olan 17- β estradiol içeren PLGA nanopartikül yüklü kitosan/HA doku iskelesi sistemi oluşturmak ve oluşturulan sistemin kemik defekti bölgesine implante edilmesine bağlı olarak etken maddenin lokal olarak, kontrollü ve uzun dönemde salımının gerçekleştirilmesidir. Bu amaç doğrultusunda; öncelikle 17- β estradiol yüklü PLGA nanopartikül sentezlenmiş ve 17- β estradiol'ün polimerik matrsten salım profili incelenmiştir. Daha sonra, 17- β estradiol yüklü PLGA nanopartiküller içsel bağlantılı gözeneklere sahip kitosan/HA doku iskelelerine yüklenmiştir. Üretilen sistemin, adipoz kökenli mezenkimal kök hücreler (AdMSC) üzerindeki etkileri incelenmiş ve elde edilen önemli sonuçlar aşağıda özetlenmiştir.

- 50:50, 65:35; PLA/PGA bileşimlerine sahip Poli (laktik-ko-glikolik asit)'in (PLGA) kopolimerlerinden boş ve PLGA/17- β estradiol ağırlıkça oranı 10 olacak şekilde 17- β estradiol yüklü nanopartiküller emülsiyon-çözücü-buharlaştırma yöntemiyle sentezlenmiştir. Ortalama 200 nm çaplarında ve küresel formda nanopartiküller üretilmiştir. Nanopartiküllerin karakterizasyonları, SEM, TEM ve Zetasizer kullanılarak yapılmıştır. PLGA nanopartiküller tarafından kapsüllenen 17- β estradiol miktarı HPLC ve UV spektrofotometre kullanılarak belirlenmiş ve 17- β estradiol'ün enkapsülasyon verimleri 50:50 PLGA ve 65:35 PLGA için sırasıyla %29 ve %52 olarak bulunmuştur. β -estradiol salım çalışmalarına, enkapsülasyon verimi yüksek olan 65:35 bileşimindeki PLGA kopolimerleri ile devam edilmiştir.
- PLGA nanopartiküllerden 17- β estradiol'ün salımı 40 gün boyunca sürdürülmüştür. Salım profilinden 17- β estradiol'ün ilk 24 saatte % 17'sinin ani patlama ile salındığı, 40 gün sonunda ise % 45'inin difüzyon mekanizması ile salındığı belirlenmiştir.
- Kitosan/HA süpergözenekli doku iskeleleri, gaz köpükleştirme tekniği ve mikrodalga ısıtma ile çapraz-bağlama yöntemi bir araya getirilerek sentezlenmiştir. Sonuçta 400-600 μ m arasında değişen makrogözenekli ve

HA ile mekanik dayanımı ve osteokondüktivitesi arttırılmış içsel bağlantılı kitosan doku iskeleleri üretilmiştir.

- Literatür taraması ve yapılan denemeler sonucunda 11x4 mm doku iskelesi başına 2 mg nanopartikül olacak şekilde sulu fazda bulunan 17- β estradiol yüklü PLGA nanopartiküller, kitosan/HA doku iskelelerine emdirilerek ve eş zamanlı üretim-yükleme şeklinde yüklenmiştir. SEM ve FTIR analizleri nanopartiküllerin her iki yöntemle de doku iskelesi yapısına başarıyla katıldıklarını göstermiştir.
- Önceden hazırlanmış doku iskelelerine nanopartiküllerin emdirilmesiyle oluşturulan doku iskelelerinden 17- β estradiol'ün ilk 24 saatte % 18'inin ani patlama ile olmak üzere 55 gün sonunda % 100'ünün salındığı ve E2'nin günlük salım miktarının ise ortalama 1.05 μ g 17- β estradiol/mg nanopartikül olduğu belirlenmiştir. Nanopartiküllerin doku iskelesi üretimi aşamasında yüklendiği iskelelerden ise ilk 24 saatte E2'nin %10'unun ani patlama ile salındığı ve 135 gün sonunda E2'nin % 92'sinin salındığı, günlük E2 salım miktarının ortalama 0.5 μ g 17- β estradiol/mg nanopartikül olduğu belirlenmiştir. Sonuçta 17- β estradiolün kontrollü ve uzun dönemde salımı gerçekleştirilmiştir. Suda çözünen estradiolün ise ilk 5 saatte % 80'inin salındığı ve bu nedenle kontrollü salımın gerçekleşmediği belirlenmiştir.
- Hücre kültürü çalışmaları için, 9x2 mm boyutlarında olan her bir doku iskelesine toplam 35 μ g E2 olacak şekilde 0.7 mg partikül yüklenmiştir.
- AdMSC'lerin karakterizasyonu amaçlı yapılan akış sitometrisi analizi sonucunda mezenkimal kök hücrelerde bulunması gereken pozitif yüzey antijenlerinden antijenlerinden CD29, CD90, CD54 ($\geq$ %95) ve MHC sınıf 1 ($>$ %82) işaretleyicilerinin için pozitif olduğu görülmüştür. Mezenkimal kök hücrelerde bulunmaması gereken negatif yüzey antijenlerinden CD45, CD106 ve MHC sınıf 2 antijenleri için oldukça düşük işaretlenme oranları bulunmuştur ($\leq$ %1). Tüm sonuçlar birlikte değerlendirildiğinde hücrelerin yüksek saflıkta olduğunu söylemek mümkündür.

- Adipoz kökenli mezenkimal kök hücrelerle (AdMSC) yürütülen hücre kültürü çalışmaları kapsamında yapılan MTT ve SEM analizleri sonucunda 17- β estradiol içeren nanopartikül yüklü kitosan/HA doku iskelelerinin hücre yapışmasını ve üremesini arttırdığı görülmüştür. Erken dönem hücre farklılaşmasının göstergesi olan ALP aktivitesinin tayini sonucunda, 17- β estradiol içeren nanopartikül yüklü kitosan/HA doku iskelelerinin, osteojenik farklılaşmayı diğer doku iskelelerine göre çok daha fazla desteklediği belirlenmiştir.
- AdMSC'lerin osteoblastik farklılaşması RT-PCR yöntemi ile de incelenmiştir. Bu amaçla kültürün 7., 14. ve 21. gününde kollajen I, osteokalsin ve β -aktin genlerinin ekspresyon seviyeleri belirlenmiştir. Kollajen I ekspresyonu nanopartikül yüklü gruplarda 7. ve 14. gün boyunca artış göstermiştir. Gruplar arasında en yüksek değerler 14. gün ve 21. günde kitosan/HA-Np grubunda gözlenmiştir. Geç dönem osteoblastik farklılaşma belirteci olan OCN ekspresyonu 7. günde E2 içeren tüm gruplarda kontrol grubuna göre yüksek çıkmıştır. Kitosan/HA+E2 grubunda ise en yüksek değerdedir. OCN ekspresyonu 21. günde nanopartiküllü gruplarda oldukça fazladır ve kitosan/HA-Np grubunda en yüksek değere ulaşmıştır.

Sonuç olarak, yapılan tez çalışması sonucunda 17- β estradiolün kontrollü ve uzun dönemde salımını sağlayan 17- β estradiol içeren PLGA nanopartikül yüklü kitosan/HA doku iskeleleri üretilmiştir. 21 gün süren hücre kültür çalışmaları sonucunda, oluşturulan özgün sistemin AdMSC'lerin üremesini ve osteojenik farklılaşmasını arttırdığı belirlenmiştir. Bu nedenlerle 17- β estradiol içeren PLGA nanopartikül yüklü kitosan/HA doku iskelelerinin kemik doku mühendisliği için oldukça uygun bir sistem olduğu tespit edilmiştir.

Yapılan tez çalışmasının in-vivo basamağı Hacettepe Üniversitesi Tıp Fakültesi Plastik Cerrahi Anabilim Dalı tarafından yürütülmüştür. Çalışmada kitosan/HA, kitosan/HA-Np ve kitosan/HA+E2 grupları ve bu iskelelere in-situ AdMSC ekilmiş olan gruplar kullanılmıştır. 12 hafta sürdürülen çalışma sonucunda AdMSC ekilmiş kitosan/HA-Np olan grupta diğer gruplara göre damarlanmanın daha zengin,

kollajen dizilimin düzenli ve kemikleşmenin daha belirgin olduğu gözlenmiştir (Çalış, 2013).

6. KAYNAKLAR DİZİNİ

- Barry F., Murphy J., 2004, Mesenchymal stem cells: clinical applications and biological characterization, *The International Biochemistry & Cell Biology*, 36, 568-584.
- Başbağ B., 2010, Siklosporin A Salımı İçin Alternatif Polimerik Taşıyıcıların Geliştirilmesi ve İn-Vitro Salım Kinetiğinin İncelenmesi, Yüksek Lisans Tezi, Hacettepe Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü, Ankara, 114s.
- Bayram N., 1995, Histoloji. Anadolu Üniv. Yayınları; 125-132.
- Beşkardeş I., 2008, Biyoseramik ve Biyosinyal Moleküllerle Desteklenmiş Poli(Kaprolakton) Doku İskeleleri: Sentez, Karakterizasyon ve Kemik Doku Mühendisliği Uygulamaları, Yüksek Lisans Tezi, Hacettepe Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü, Ankara, 113 s.
- Beşkardeş IG, Demirtaş TT, Durukan MD, Gümüşderelioğlu M., 2012, Microwave-assisted fabrication of chitosan-hydroxyapatite superporous hydrogel composites as bone scaffolds, *J Tissue Eng Regen Med*, 14 (10), 1002-1677.
- Birnbaum D., Kosmala J., Henthorn D., Peppas L., 2000, Controlled release of β -estradiol from PLGA microparticles: The effect of organic phase solvent on encapsulation and release, *J Control Release*, 65, 375-387.
- Björnström L. and Sjöberg M., 2003, Mechanisms of Estrogen Receptor Signaling convergence of genomic and nongenomic actions on target genes, *Molecular Endocrinology* 19 (4), 833–842.
- Blau, H.M. Brazelton T.R., Weimann J.M, 2001, The evolving concept review of a stem cell: entity or function?, *Cell*, 105, 829–841.
- Bonnie J., Deroo and Kenneth S. Korach, 2006, Estrogen receptors and human disease, *J Clinical Investigation*, 116 (3), 561-570.
- Calvo P, Remunan-Lopez C, Vila-Jato JL, Alonso MJ., 1997, Novel hydrophilic chitosan-polyethylene oxide nanoparticles as protein carriers, *J Appl Polymer Scien*, 63, 125-132.
- Caplan, A.I., 1991, Mesenchymal stem cells, *J Orthop Res*, 9, 641–50.
- Carvalho L., Breyner N., Hell R., Valerio P., Novikoff S., Goes A., 2012, Healing pattern in calvarial bone defects following bone regeneration in rats guided by chitosan scaffold and adipose tissue-derived mesenchymal stem cells, *The Open Tissue Eng and Regen Med J*, 5, 25-34.
- Chen, J., Park, H., Park, K., 1999, Synthesis of superporous hydrogels: hydrogels with fast swelling and superabsorbent properties, *J Biomed Mater Res*, 44, 53-62.

- Chen, Y., Mohanraj, V.J., Parkin, J.E., 2003, Chitosan-dextran sulfate nanoparticles for delivery of an anti-angiogenesis peptide, *Lett Peptide Sci*, 10, 621-629.
- Compston JE., 2001, Sex steroids and bone, *Physiological Reviews*, 81(1), 420-437.
- Curran JM, Chen R, Hunt JA., 2006, The guidance of human mesenchymal stem cell differentiation in-vitro by controlled modifications to the cell substrate, *Biomaterials*, 27, 4783–93.
- Çalış M., 2013, 17- β Östradiolün Kitosan/Hidroksiapatit Yapıdaki Doku İskelesine Yüklene Yağ Dokusundan Türetilmiş Mezenkimal Kök Hücreler Üzerindeki Osteojenik Etkisinin Deneysel Kritik Boyutlu Kemik Defekti Modelinde Araştırılması, Uzmanlık Tezi, Hacettepe Üniversitesi Tıp Fakültesi Plastik, Rekonstrüktif ve Estetik Cerrahi Anabilim Dalı, Ankara, 73 s.
- Çetin, D., 2010, Poli (2-hidroksi etil metakrilat) Bazlı Süpergözenekli Doku İskeleleri İle Kemik Rejenerasyonu, Yüksek Lisans Tezi, Hacettepe Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü, Ankara, 115 s.
- Demirtaş, T.T., Karakeçili A., Gümüşderelioğlu, M., 2008, Hydroxyapatite containing superporous hydrogel composites: synthesis and in-vitro characterization, *J Mater Sciences: Mater in Med*, 19 (2), 729-735.
- Docheva D., Haasters F., Schieker M., 2008, Mesenchymal stem cells and their cell surface receptors, *Current Rheumatology Reviews*, 4, 155–160.
- Doğan L., Güç D., 2004, Sinyal iletimi mekanizmaları ve kanser, *Hacettepe Tıp Dergisi*, 35, 34-42.
- Durukan M., 2012, Mikrodalga Destekli Kitosan/Hidroksiapatit Doku İskelesi Üretimi ve İn-Vitro Kemik Doku Mühendisliği, Yüksek Lisans Tezi, Hacettepe Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü, Ankara, 109 s.
- Eastel R., 2005, Role of oestrogen in the regulation of bone turnover at the menarche, *Journal of Endocrinology*, 185, 223-234.
- Ganong, W.F., 2003, Review of medical physiology, 21st Edition, McGraw-Hill Professional.
- Guyton, A.C., Hall, J.E., 2005, Guyton & Hall textbook of medical physiology, 11th Edition, Saunders/Elsevier.
- Gümüşderelioğlu M., 2011, Doku mühendisliği ders notları, Hacettepe Üniversitesi, Ankara.
- Gümüşderelioğlu, M., 2007, Ekim, Doku mühendisliğinde nanoteknoloji, Bilim ve Teknik Özel Eki, Tübitak Yayınları.
- Gürsoy, A.Z. (ed), 2002, Kontrollü salım sistemleri, İstanbul, TR.

- Hariharan S., Bhardwaj V., Bala I., Bakowsky U., Kumar R., 2007, Design of estradiol loaded PLGA nanoparticulate formulations: A potential oral delivery system for hormone therapy, *Pharm Research*, 23 (1), 184-196.
- Hirenkumar K., Siegel S., 2011, Poly lactic-co-glycolic acid (PLGA) as biodegradable controlled drug delivery carrier, *Polymers*, 3, 1377-1397.
- Hong L., Colpan A., Peptan I., 2006, Modulations of 17- β estradiol on osteogenic and adipogenic differentiations of human mesenchymal stem cells, *Tissue Engineering*, 12 (10), 2747-2753.
- Hong L., Colpan A., Peptan I., Daw J., George A., Evans C., 2007, 17-b estradiol enhances osteogenic and adipogenic differentiation of human adipose-derived stromal cells, *Tissue Engineering*, 13 (6), 1197-1203.
- Hong L., Krishnamachari Y., Seabold D., Joshi V., Schneider G., Salem A., 2011, Intracellular release of 17- β estradiol from cationic polyamidoamine dendrimer surface-modified poly (lactic-co-glycolic acid) microparticles improves osteogenic differentiation of human mesenchymal stromal cells, *Tissue Eng Part C*, 17 (3), 319-325.
- Hong, S.H., 2004 ,Expression of estrogen receptor-alpha and -beta, glucocorticoid receptor, and progesterone receptor genes in human embryonic stem cells and progesterone receptor genes in human embryonic stem cells and embryoid bodies, *Mol Cells*, 18 (3) 320-325.
- Hutmacher, D.W., Schantz, J.T., Lam, C.X.F., Tan, K.C., Lim, T.C., 2007, State of the art and future directions of scaffold-based bone engineering from a biomaterials perspective, *J Tissue Eng Regen Med*, 1(4), 245 –260.
- Ito y., 1998, Tissue engineering by immobilized growth factors, *Materials Science and Eng C*, 6, 267-274.
- Ito Y., 2008, Covalently immobilized biosignal molecule materials for tissue engineering, *Soft Matter*, 4, 46-56.
- Karaboz İ., Kayar E., Akar S., 2008, Flow sitometri ve kullanım alanları, *Elektronik Mikrobiyoloji Dergisi TR*, 06 (2), 01-18.
- Karaöz E., Aksoy A., Ayhan S., Sarıboyacı A.E., Kaymaz F., Kasap K., 2009, Characterization of mesenchymal stem cells from rat bone marrow: ultrastructural properties, differentiation potential and immunophenotypic markers. *Histochemistry and Cell Biology.*, 132(5), 533-546.
- Kanjickal, D., Lopina, S., Evancho-Chapman, M.M., Schmidt, S., Donovan, D., 2005, Improving Delivery of Hydrophobic Drugs from Hydrogels through cyclodextrins, *J Biomed Materials Research Part A*, 74A, 454–460.
- Khan Y., Yaszemski J., 2008, Tissue engineering of bone materials and matrix consideration, *J Bone and Surgery*, 90 (1), 36-42.

- Klinge, C.M., 2001, Estrogen receptor interaction with estrogen response elements, *Nucleic Acids Research*, 29, 2905-2919.
- Koç A., 2008, Mezenkimal Kök Hücrelerin ve Kompozit İskelelerin Kullanımıyla Kemik Doku Mühendisliği, Doktora Tezi, Ankara Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü, Ankara, 106 s.
- Kuiper, G.G., Enmark, E., Peltö-Huikko, M., Nilsson, S., Gustafsson, J-A., 1996, Cloning of a novel estrogen receptor expressed in rat prostate and ovary, *Proc Natl Acad Science USA*, 93, 5925–5930.
- Kurban S., 2007, Osteoprotegrin, RANK ve RANKL Ligandı, *Türk Biyokimya Dergisi*, 32 (4), 178-184.
- Kutlu, C., 2011, Beyin Tümörlerinin Tedavisi İçin Çift Etkili Doku İskelesi-Nanopartikül Sistemlerinin Geliştirilmesi, Yüksek Lisans Tezi, Hacettepe Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü, Ankara, 125s.
- Lee, S.H., Shin H., 2007, Matrices and scaffolds for delivery of bioactive molecules in bone and cartilage tissue engineering, *Advanced Drug Delivery Reviews*, 59, 339–359.
- Liu Yi , Wu J., Zhu Y., Han J., 2012, Therapeutic application of mesenchymal stem cells in bone and joint diseases, *Clinical and Experimental Med.*, 10, 1007-1028.
- Marino G., Rosso F., Cafiero G., Tortora C., Barbarisi M., Barbarisi A., 2010, β -Tricalcium phosphate 3D scaffold promote alone osteogenic differentiation of human adipose stem cells: in-vitro study, *J Mater Science: Mater in Med*, 21, 353-363.
- Mehra BJ, M.J., 2006, Repair and Grafting of Bone, in *Plastic Surgery M. SJ*, in *Plastic Surgery M. SJ*, Saunders Elsevier: Philadelphia, 639-718.
- Mescher A.L., 2009, Junqueira's basic histology: text and atlas, 12.Edition, McGraw-Hill Medical, USA, 141-160.
- Mishra B., Patel B., Tiwari S., 2010, Colloidal nanocarriers: a review on formulation technology, types and applications toward targeted drug delivery, *Nanomedicine: Nanotechnology, Biology and Medicine*, 6, 9-24.
- Mittal, G., Sahana, D.K., Bhardwaj, V., Kumar, M.N.V.R., 2007, Estradiol loaded PLGA nanoparticles for oral administration: Effect of polymer molecular weight and copolymer composition on release behavior in-vitro and in vivo, *J Control Release*, 119, 77–85.
- Mizuno H., 2009, Adipose-derived stem cells for tissue repair and regeneration: ten years of research and a literature review, *J Nippon Med School*, 76 (2), 56-66.
- Mohanraj VJ., Chen Y., 2006, Nanoparticles-A review, *Tropical J Pharm Research*, 5 (1), 563-573.

- Muzzarelli, R.A.A., 1977, Chitin, Pergamon Press, Oxford, 4-7; 358-360.
- Nappi C., Bifulca G., Tommaselli G., Gargano V., Di Carlo C., 2011, Hormonal contraception and bone metabolism: a systematic review, *Contraception*, 86 (6), 606-621.
- Niu X., Feng Q., Wang M., Guo X., Zheng Q., 2009, In-vitro degradation and release behavior of porous poly (lactic acid) scaffolds containing chitosan microspheres as a carrier for BMP-2-derived synthetic peptide, *Polymer Degradation and Stability*, 94, 176-182.
- Ohbayashi, E., Matsushima, K., Hosoya, S., Aabeyk, Y. and Yamazaki, M. 1999. Stimulatory effect of laser irradiation on calcified nodule formation in human dental pulp fibroblasts, *J Endodon.*, 25, 30-33.
- Park, H., Park, K., Kim, D., 2006, Preparation and swelling behavior of chitosan-based superporous hydrogels for gastric retention application, *J Biomed Mater Research A*, 76A, 144-150.
- Philip MS, Edward GL, Oursler M., David K., 1996, Estrogen actions in arteries, bone, and brain, *Science & Med*, 44-54.
- Qu Q., Heape P., Kapanen A., Dahllund J., Vaannen K., Harkönen P., 1998, Estrogen enhances differentiation of osteoblasts in mouse bone marrow culture, *Bone*, 22 (3), 201-209.
- Rada T., Reis R., Gomes M., 2009, Adipose tissue-derived stem cells and their application in bone and cartilage tissue engineering, *Tissue Eng: Part B*, 15 (2), 113-125.
- Rada, T., 2012, Osteogenic differentiation of two distinct subpopulations of human adipose-derived stem cells: an in-vitro and in vivo study, *J Tissue Eng Regen Med*, 6(1), 1-11.
- Ray, R., 2008, Sex steroids and stem cell function. *Mol Med.*, 14(7-8), 493-501.
- Riggs L., The mechanisms of estrogen regulation of bone resorption, *The J Clinical Investigation*, 106(10), 2000.
- Rogel M.R, Qiu H., Ameer G.A., 2008, The role of nanocomposites in bone regeneration, *J Materials Chemistry*, 18, 4233-4241.
- Roodman, G.D., 1999, Cell biology of the osteoclast, *Exp. Hematol.*, 27, 1229-1241.
- Ross JL, Cassorla FG, Skerda MC, Valk IM, Loriaux DL & Cutler GB Jr, 1983, A preliminary study of the effect of estrogen dose on growth in Turner's syndrome, *New England J Med*, 309, 1104-1106.
- Salgado A., Cauntinho O., Reis R., 2004, Bone tissue engineering, *Macromolecular Bioscience*, 4,743-765.

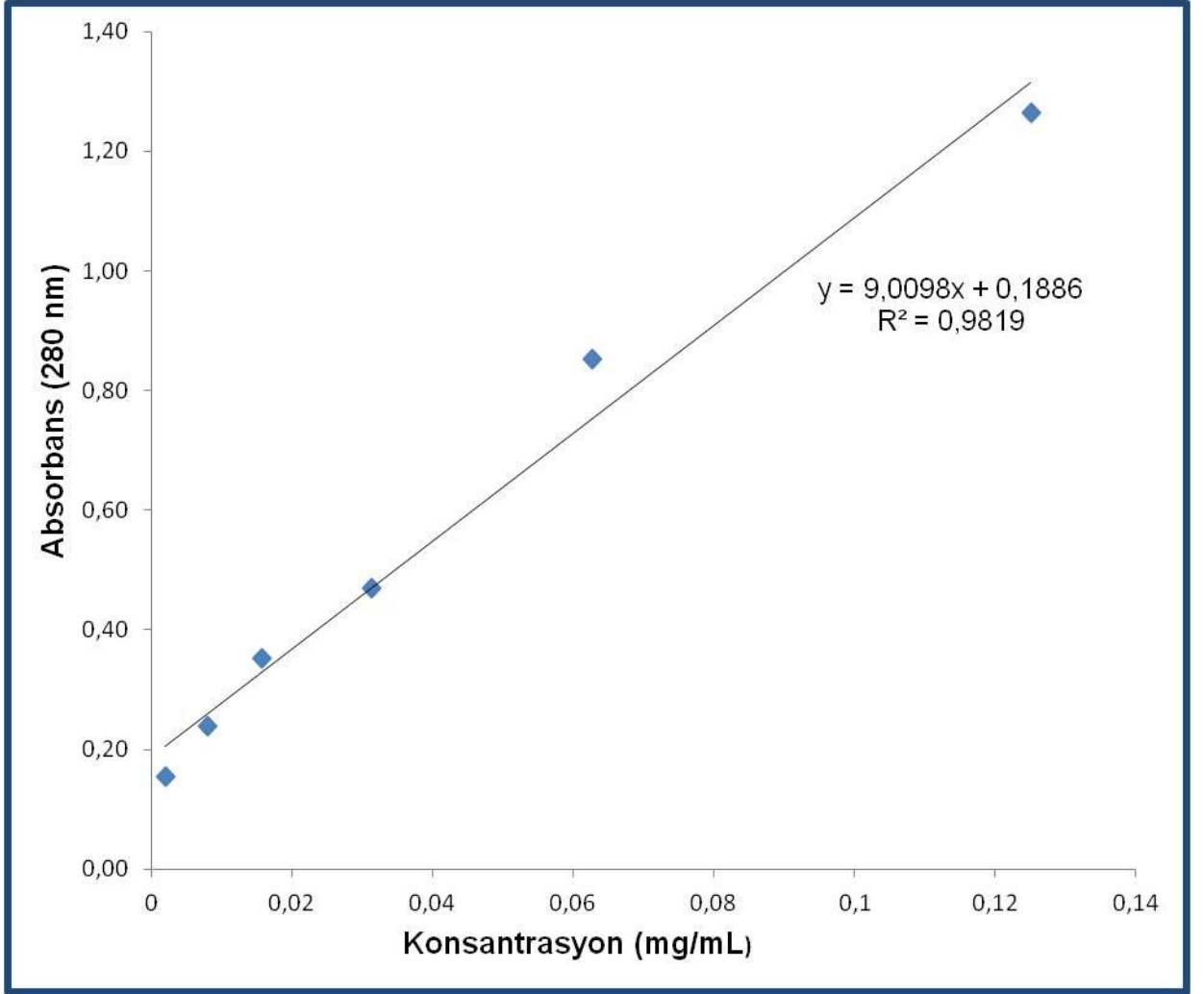
- Schäffler A., Büchler C., 2007, Concise review: adipose tissue-derived stromal cells-basic and clinical implications for novel cell-based therapies, *Cell & Molecular Biology*, 25(4), 818-827.
- Seyisoğlu H., 2007, Postmenopozal osteoporoz ve östrojen replasman tedavisi, *Cerrahpaşa Tıp Fakültesi Sürekli Tıp Eğitimleri Osteoproz Sempozyumu*, İstanbul, 73-81.
- Shao Z, Liu B., Peng Q., Liu W, 2007, Transplantation of osteoblast like cells to the distracted callus in the rabbit mandible, *Plastic and Reconstructive Surgery*, 119 (2), 500-507.
- Silva, G.A., Ducheyne, P., Reis, R.L., 2007, Materials in particulate form for tissue engineering: Basic concepts, *J Tissue Eng Regen Med*, 1, 4-24.
- Soppimath K., Aminabhavi T., Kulkarni A., Rudzinski W., 2001, Biodegradable polymeric nanoparticles as drug delivery devices, *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*, 75, 1-18.
- Stevanovic M., Uskokovic D., 2009, Poly(lactide-co-glycolide)-based micro and nanoparticles for the controlled drug delivery of vitamins, *Current Nanoscience*, 5, 1-14.
- Sunay Ö., 2010, Adipoz Kökenli Kök Hücre Yardımlı Distraksiyon Osteogenez, *Dokuz Eylül Üniversitesi Tıp Fakültesi Plastik Rekonstrüktif ve Estetik Cerrahi Anabilim Dalı Uzmanlık Tezi*, İzmir, 183 s.
- Şahin F, Saydam G, Omay SB., 2005, Kök hücre plastisitesi ve klinik pratikte kök hücre tedavisi, *Türk Hematoloji Onkoloji Dergisi*, 1(15), 48-56.
- Takayanagi H., 2005, Inflammatory bone destruction and osteoimmunology, *J Periodont Reserach.*, 40, 287–93.
- Thein-Han W.W., Misra R.D.K., 2009, Biomimetic chitosan–nanohydroxyapatite composite scaffolds for bone tissue engineering, *Acta Biomaterialia*, 5, 1182-1197.
- Tholpady, S.S., A.J. Katz, and R.C. Ogle, Mesenchymal stem cells from rat visceral fat exhibit multipotential differentiation in-vitro, *The Anatomical Record Part A*, 2003, 272(1), 398-402.
- Tobias J., Compstone JE., 1999, Does estrogen stimulate osteoblast activity in postmenopausal women?, *Bone*, 24, 121–130.
- Ugarte D., Morizonoc K., Elbarbarya A., Alfonso Z., Zuk P., Zhua M., Dragoo J., Ashjiana P., Thomasa B., Benhaima P., Chen I., Fraser J., Hedrivka M., 2003, Comparison of multi-lineage cells from human adipose tissue and bone marrow, *Cells, Tissues, Organs*, 174, 101-109.
- Woodbury, D., Schwarz, E.J., Prockop, D.J. and Black, I.B., 2000, Adult rat and human bone marrow stromal cells differentiate into neurons, *J Neuroscience Research*, 61, 364 -370.

- Zhao S., Zilberman Y., Wasserman K., Bain S., Sadovsky Y., Gazit D., 2001, Estrogen modulates estrogen receptor α and β expression, osteogenic activity, and apoptosis in mesenchymal stem cells (MSCs) of osteoporotic mice, *J Cel Biochemistry Supplement*, 36, 144-155.
- Zhou S., Turgeman G., Harris S., Leitman D., Komm B., Badine P., Gazit D., 2003, Estrogens activate bone morphogenetic protein-2 gene transcription in mouse mesenchymal stem cells, *Molecular Endocrinology*, 17 (1), 56-66.
- Zuk, P.A., 2001, Multilineage cells from human adipose tissue: implications for cell-based therapies, *Tissue Eng.*, 7(2), 211-28.
- Zuk, P.A., 2002, Human adipose tissue is a source of multipotent stem cells, *Molecular Biology Cell*, 13(12), 4279-95.

7. EKLER

Ek.1. UV KALİBRASYON GRAFİĞİ

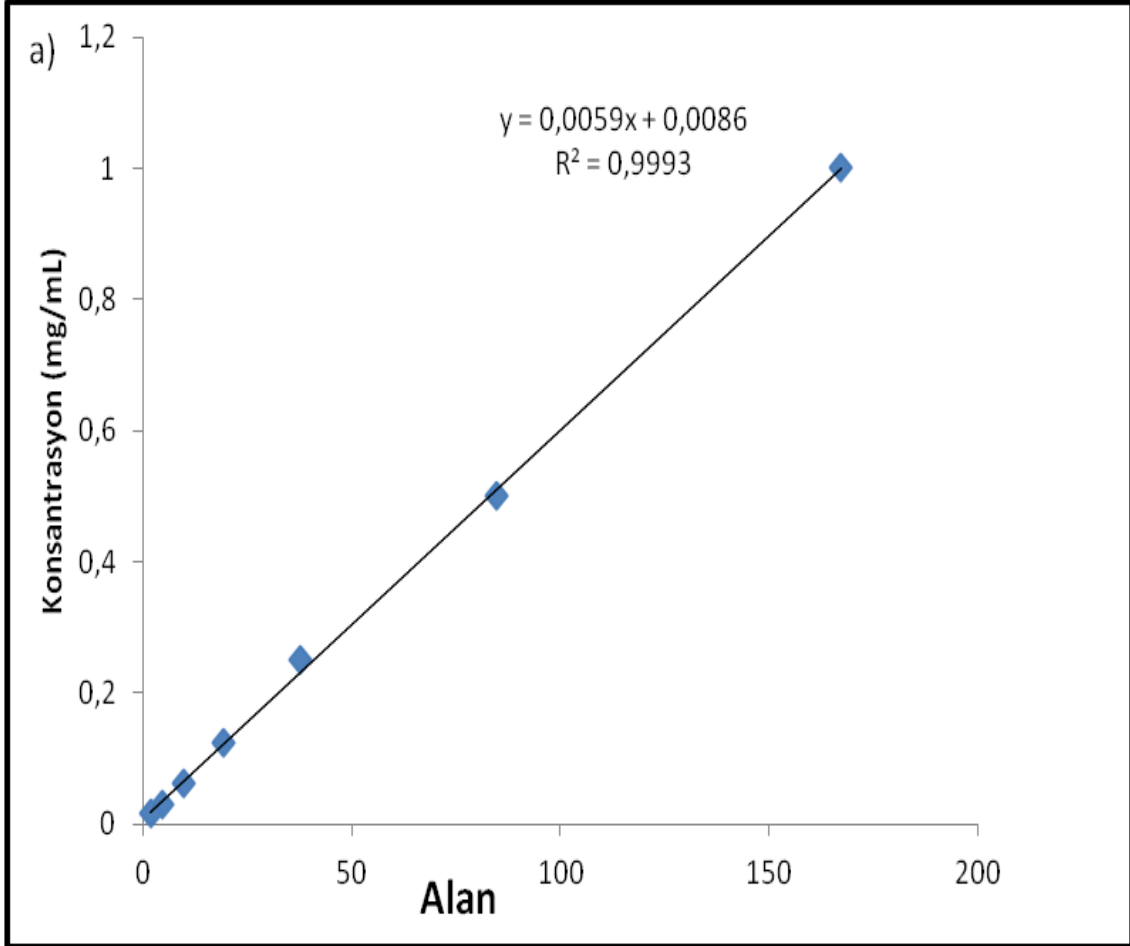
Bölüm 3.3.5’de anlatılan 17- β estradiol’ün enkapsülasyon verimi hesabında kullanılan UV kalibrasyon grafiği Şekil 7.1.’de verilmiştir.

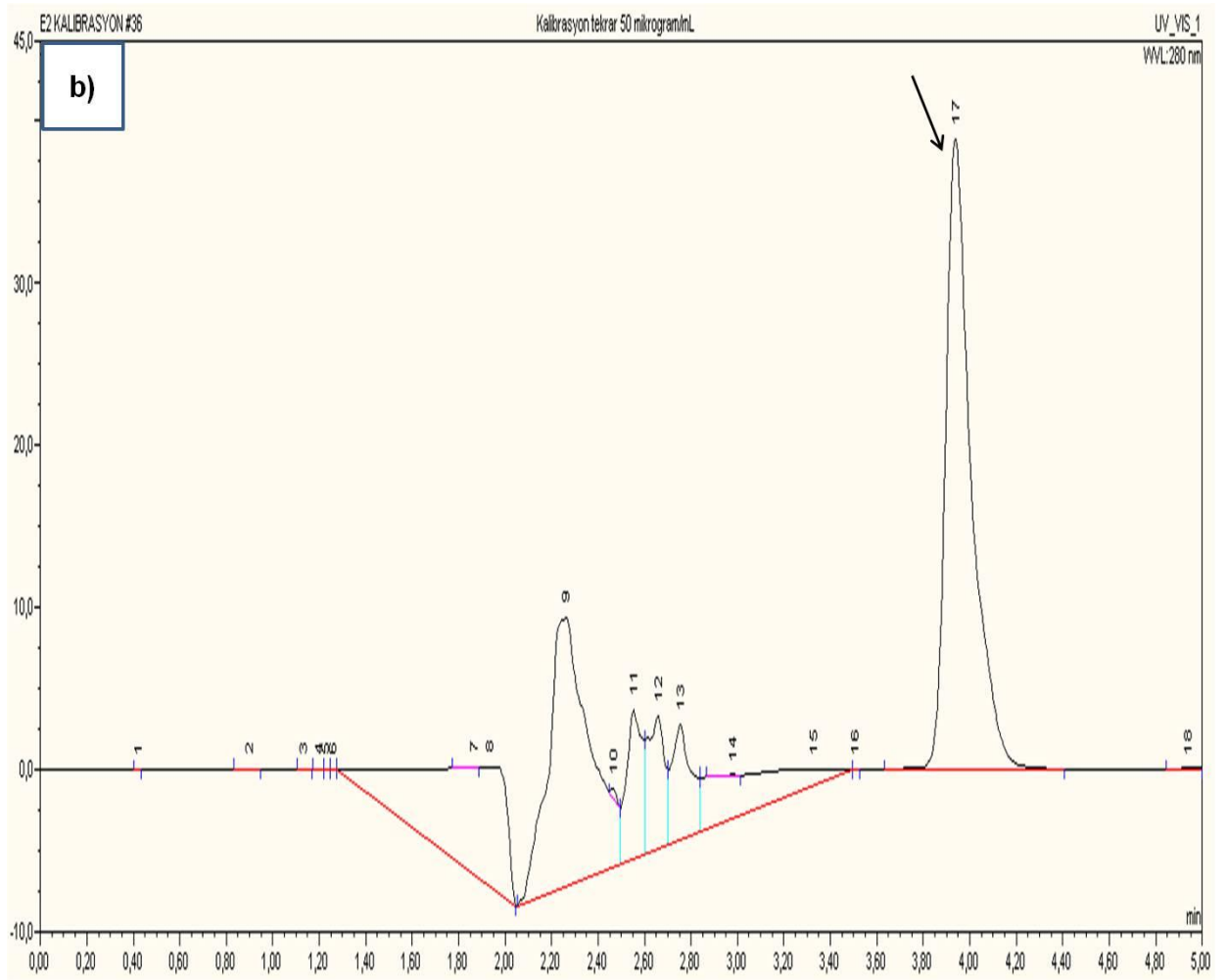


Şekil 7.1. 17- β estradiolün enkapsülasyon verimi hesabında kullanılan UV kalibrasyon grafiği.

EK.2. HPLC KALİBRASYON GRAFİĞİ VE E2 KROMATOGRAMI

Bölüm 3.3.5’de anlatılan 17- β estradiol’ün enkapsülasyon verimi hesabında kullanılan HPLC kalibrasyon grafiği ve örnek HPLC kromatogramı Şekil 7.2 a ve b’de verilmiştir.





Şekil 7.2.a) 17- β estradiol'ün enkapsülasyon verimi hesabında kullanılan HPLC kalibrasyon grafiği, b) 50 $\mu\text{g/mL}$ derişimindeki 17- β estradiol'ün 280 nm'de HPLC kromatogramı. 4.2. dk'da ok ile gösterilen pik E2'ye aittir.

EK.3 DOKU İSKELELERİNE EMDİRİLEREK YÜKLENEN PLGA NANOPARTİKÜLLERDEN E2 KÜMÜLATİF SALIM DEĞERLERİNİN HESAPLANMASI

17- β estradiol içeren PLGA nanopartikül yüklü kitosan/HA doku iskelelelerinden kümülatif salım değerlerinin hesaplanması amacıyla yapılan in-vitro salım deneylerinde, salım ortamı belirli aralıklarla taze tampon ile yenilenerek E2 içeren örnek ile salım ortamı arasındaki konsantrasyon farkı sabit tutulmaya çalışılmıştır. Örnek olarak, partiküllerin emdirme yöntemi ile yüklenmesiyle oluşan 1.doku iskelesine ait kümülatif salım hesaplamaları aşağıda sunulmuştur.

Salım ortamı: 10 mL PBS,

Yenilenen hacim: 900 μ L

Doku iskelesine yükleme: 300 μ L sulu fazda PLGA (2mg partikül)

Örnek t=2.gün

C=2.32 μ g/mL

Salınan E2 miktarı= 2.32 x 10= 23.16 μ g

Metanol seyreltmesi: 23.16 μ g X10/9=25.74 μ g

Atılan E2 miktarı= 25.74 μ g * 0.09=2.32 μ g

Toplam E2 miktarı= 23.16+2.32=28.8 μ g

Kümülatif salım (%)= (28.8 μ g /100 μ g E2) X100

salınan miktar (μ g E2/mg partikül)= 28.8 μ g/2 mg=14.4 μ g E2/mg partikül

17- β estradiol yüklü PLGA nanopartiküllerin emdirilerek yüklendiği kitosan/HA doku iskelelerinde 17- β estradiol salımına ait veriler Çizelge 7.1.'de verilmiştir.

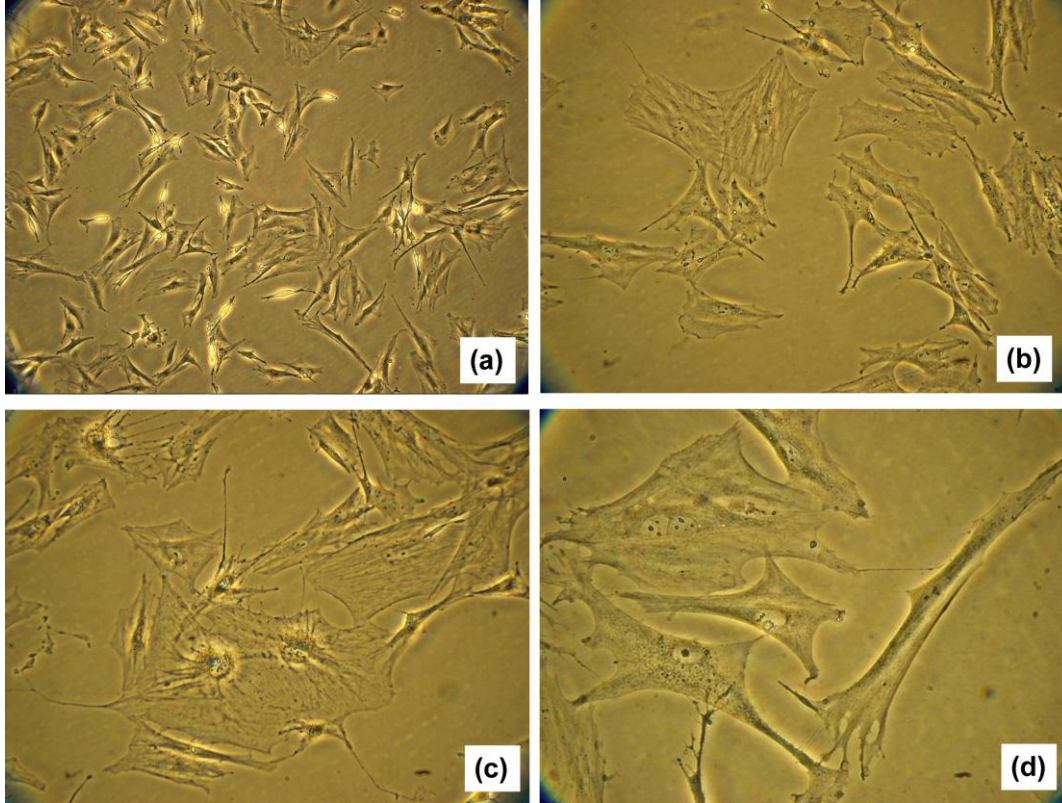
Çizelge 7.1. E2 yüklü PLGA nanopartiküllerin emdirilerek yüklendiği kitosan/HA doku iskelelerinde E2 salımına ait veriler.

t (gün)	Alan	C (µg/mL)	Salınan E2 (µg)	Metanol Seyreltmesi	Atılan E2 (µg)	Toplam E2 (µg)	% Salım	salınan miktar (µg /mg partikül)
0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00
0.04	0.08	0.35	3.52	3.91	0.35	3.52	3.52	1.76
0.08	0.20	1.65	16.48	18.32	1.65	16.84	16.84	8.42
0.25	0.21	1.74	17.39	19.32	1.74	19.39	19.39	9.69
1	0.24	1.98	19.77	21.97	1.98	23.51	23.51	11.76
2	0.27	2.32	23.16	25.74	2.32	28.88	28.88	14.44
3	0.24	2.02	20.21	22.46	2.02	28.24	28.24	14.12
4	0.26	2.20	22.04	24.49	2.20	32.09	32.09	16.05
5	0.27	2.34	23.38	25.97	2.34	35.63	35.63	17.82
6	0.30	2.65	26.48	29.43	2.65	41.08	41.08	20.54
7	0.32	2.83	28.25	31.39	2.83	45.49	45.49	22.75
8	0.32	2.83	28.32	31.47	2.83	48.39	48.39	24.20
9	0.31	2.71	27.13	30.15	2.71	50.03	50.03	25.02
10	0.31	2.72	27.19	30.22	2.72	52.81	52.81	26.40
12	0.32	2.88	28.84	32.04	2.88	57.17	57.17	28.59
13	0.34	3.00	30.05	33.39	3.00	61.26	61.26	30.63
14	0.32	2.80	28.02	31.13	2.80	62.24	62.24	31.12
17	0.30	2.66	26.61	29.56	2.66	63.63	63.63	31.81
18	0.30	2.61	26.13	29.03	2.61	65.81	65.81	32.91
19	0.30	2.64	26.39	29.32	2.64	68.69	68.69	34.34
20	0.29	2.55	25.49	28.32	2.55	70.43	70.43	35.21
21	0.27	2.37	23.69	26.32	2.37	71.18	71.18	35.59
22	0.28	2.42	24.23	26.92	2.42	74.08	74.08	37.04
24	0.28	2.38	23.84	26.49	2.38	76.12	76.12	38.06
25	0.28	2.43	24.32	27.02	2.43	78.98	78.98	39.49
26	0.30	2.59	25.85	28.73	2.59	82.95	82.95	41.47
27	0.25	2.10	21.04	23.38	2.10	80.72	80.72	40.36
28	0.26	2.24	22.40	24.89	2.24	84.19	84.19	42.09
31	0.27	2.30	22.96	25.51	2.30	86.99	86.99	43.49
32	0.24	2.04	20.43	22.70	2.04	86.75	86.75	43.38
33	0.24	2.00	20.03	22.25	2.00	88.39	88.39	44.20
34	0.23	1.96	19.56	21.73	1.96	89.93	89.93	44.96
35	0.22	1.80	17.96	19.95	1.80	90.28	90.28	45.14
37	0.19	1.55	15.48	17.20	1.55	89.60	89.60	44.80
38	0.19	1.47	14.74	16.38	1.47	90.40	90.40	45.20
39	0.18	1.45	14.53	16.15	1.45	90.20	90.20	45.10
40	0.18	1.43	14.26	15.85	1.43	91.38	91.38	45.69

41	0.15	1.12	11.15	12.39	1.12	90.13	90.13	45.07
42	0.16	1.20	12.03	13.36	1.20	91.37	91.37	45.69
43	0.15	1.16	11.59	12.88	1.16	92.47	92.47	46.24
44	0.17	1.28	12.81	14.23	1.28	94.88	94.88	47.44
46	0.15	1.16	11.59	12.88	1.16	95.25	95.25	47.63
47	0.15	1.16	11.59	12.88	1.16	96.05	96.05	48.03
48	0.16	1.17	11.70	13.00	1.17	97.32	97.32	48.66
49	0.15	1.12	11.24	12.48	1.12	97.24	97.24	48.62
51	0.16	1.24	12.38	13.76	1.24	100.32	100.32	50.16
52	0.15	1.08	10.83	12.03	1.08	100.03	100.03	50.02
53	0.14	1.02	10.17	11.30	1.02	100.76	100.76	50.38
54	0.14	1.04	10.42	11.58	1.04	101.95	101.95	50.97
55	0.12	0.81	8.09	8.99	0.81	100.35	100.35	50.17
56	0.13	0.89	8.94	9.93	0.89	101.89	101.89	50.94

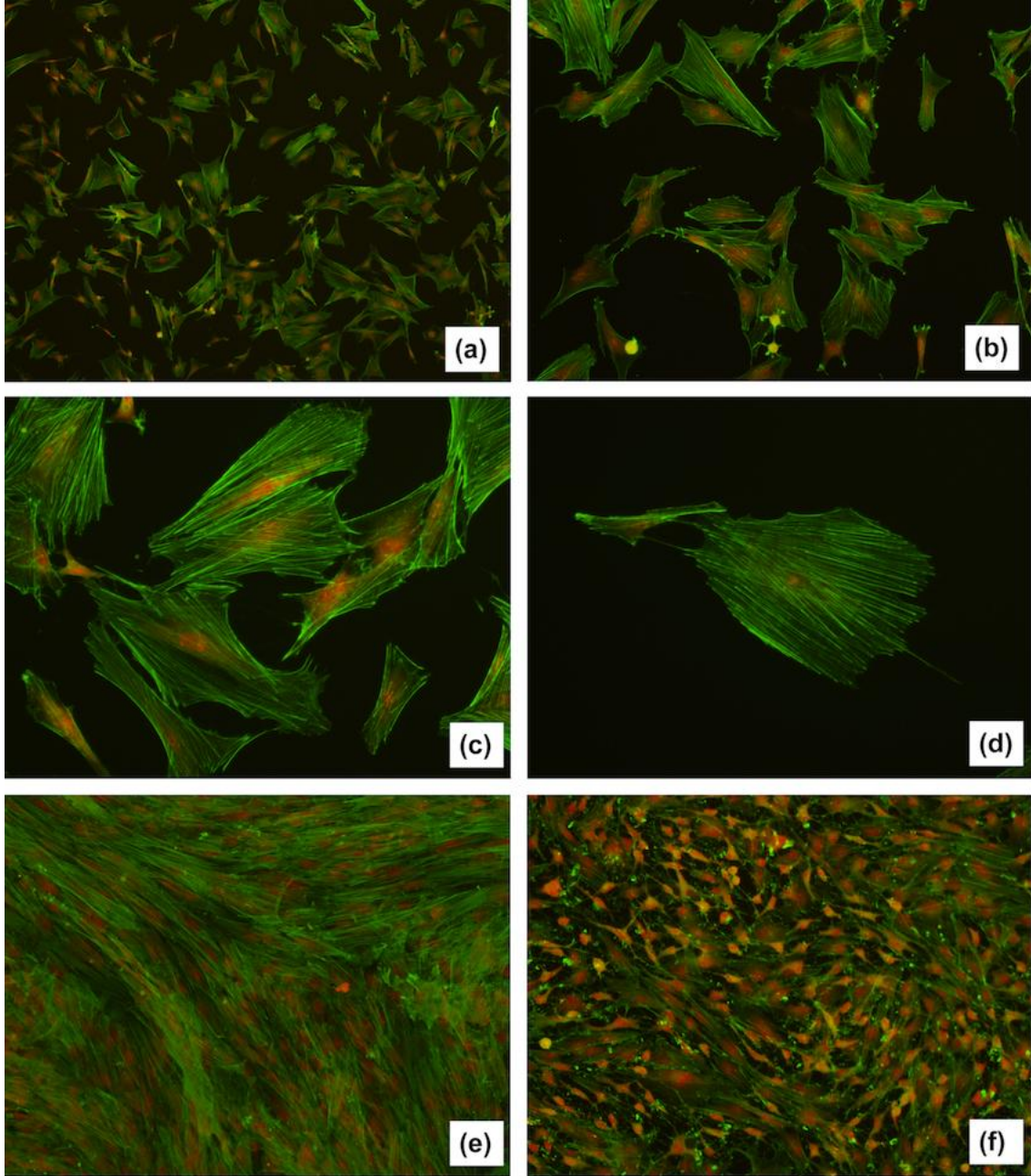
EK.4. ADİPOZ KÖKENLİ MEZENKİMAL KÖK HÜCRELERİN MORFOLOJİK İNCELEMESİ

Çalışmada kullanılan Adipoz Kaynaklı Mezenkimal Kök Hücrelerin (ADMSC'lerin) kültürdeki morfolojilerini incelemek amacıyla 3. pasajdaki hücreler invert mikroskop (Olympus, ABD) ile görüntülenmiştir. Kültürün 3. gününe ait fotoğraflar Şekil 7.3.'de verilmiştir.



Şekil 7.3.ADMSC'lere ait optik mikroskop görüntüleri: (a) 4X; (b) 10X; (c) 20X; (d) 40X.

Kültürün farklı günlerinde hücre iskeleti organizasyonunun görüntülenebilmesi için ikili floresan boyama yapılmıştır. Hücreler DPBS (pH: 7.4) ile yıkandıktan sonra % 2.5'lük (v/v) glutaraldehit çözeltisi kullanılarak fiksasyon işlemi gerçekleştirilmiştir. Hücrelerin filamentöz aktinleri (F-aktin), BSA/PBS çözeltisi içerisinde hazırlanmış %2.5'lik (v/v) Alexa Fluor 488 phalloidin (Invitrogen, ABD) ile 20 dakika, hücre çekirdeği ise 10 µg/mL propidyum iyodür (Sigma, Almanya) ile 5 dakika muamele edilerek boyanmıştır. Floresan mikroskobu (Olympus, ABD) kullanılarak elde edilen fotoğraflarda çekirdek kırmızı, F-aktin ise yeşil olarak görülmektedir.



Şekil 7.4. ADMSC'lerin floresan boyamasına ait görüntüler: 3.gün (a) 4X, (b) 10X, (c) 20X, (d) 20X; 13. gün (e) 4X; 33.gün (f) 4X.

Aktin filamentlerin, hücre şeklinin oluşmasında görev aldığı bilinmektedir. Kültürün 3. gününe ait fotoğraflarda hücrelerin gelişmiş bir hücre iskeletine sahip olduğu görülmektedir (Şekil 7.4a ve d). Kültürün 13. gününde ise hücre yoğunluğunun arttığı ve hücrelerin içsi bir morfoloji sergilediği dikkat çekmektedir (Şekil 7.4e). Ancak bu yapı kültürün ilerleyen günlerde kaybolmuştur (Şekil7.4f).

ÖZGEÇMİŞ

Adı Soyadı : Gülseren IRMAK

Doğum Yeri : ANKARA

Doğum Yılı : 16.09.1985

Medeni Hali : Bekar

Eğitim ve Akademik Durumu:

Lise : Ankara İbn-i Sina Lisesi (2003)

Lisans : Anadolu Üniversitesi Kimya Mühendisliği Bölümü (2009)

Yabancı Dil : İngilizce