

**KARTILAJ DOKU HASARINI ONARMAK İÇİN
ALTERNATİF JEL FORMÜLASYONU
GELİŞTİRİLMESİ**

YÜKSEK LİSANS TEZİ

Mustafa BEKİROĞLU

Eskişehir 2019

**KARTİLAJ DOKU HASARINI ONARMAK İÇİN ALTERNATİF JEL
FORMÜLASYONU GELİŞTİRİLMESİ**

Mustafa BEKİROĞLU

YÜKSEK LİSANS TEZİ

Biyoteknoloji Bilim Dalı

İleri Teknolojiler Anabilim Dalı

Danışman: Doç. Dr. Gülay BÜYÜKKÖROĞLU

Eskişehir

Anadolu Üniversitesi

Fen Bilimleri Enstitüsü

Temmuz 2019

Bu tez çalışması BAP Komisyonunca kabul edilen 1801S014 no.lu proje kapsamında desteklenmiştir.

JÜRİ VE ENSTİTÜ ONAYI

Mustafa BEKİROĞLU'nun "KARTİLAJ DOKU HASARINI ONARMAK İÇİN ALTERNATİF JEL FORMÜLASYONU GELİŞTİRİLMESİ" başlıklı tezi 31/07/2019 tarihinde aşağıdaki jüri tarafından değerlendirilerek "Eskişehir Teknik Üniversitesi Lisansüstü Eğitim-Öğretim ve Sınav Yönetmeliği"nin ilgili maddeleri uyarınca, İleri Teknoloji Anabilim dalında Yüksek Lisans tezi olarak kabul edilmiştir.

Jüri Üyeleri

Unvanı Adı Soyadı

İmza

Üye (Tez Danışmanı)

Doc.Dr.

: GÜLAY BÜYÜKKÖROĞLU

Üye

: Doc.Dr. EYRİM YENİLMEZ

Üye

: Dr.Öğr.Üy. U. NERVE GÜVEN

Enstitü Müdürü

ÖZET

KARTİLAJ DOKU HASARINI ONARMAK İÇİN ALTERNATİF JEL FORMÜLASYONU GELİŞTİRİLMESİ

Mustafa BEKİROĞLU

Biyoteknoloji Bilim Dalı

İleri Teknolojiler Anabilim Dalı

Anadolu Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Temmuz 2019

Danışman: Doç. Dr. Gülay BÜYÜKKÖROĞLU

Bilim insanları uzun süredir, sinovyal eklemlerde onarım ve rejenerasyon yeteneği sınırlı olan kıkırdakta görülen doku kaybı veya dejenerasyonu için yeni tedavi yolları üzerinde çalışmaktadır. Eklem kıkırdağı, çok fazlı bir dokudur ve sınırlı iyileşme özelliği gösterir. Yapısını, ağırlıklı olarak kondrositler ve hücreler arası ağ olarak tanımlanan tip II kollajenler oluşturur. Eklem kıkırdağı, sinovyal sıvıdan beslenir. Bu nedenle kan kökenli büyüme etmenleri dokuya ulaşmadığından, onarımı veya yeniden yapılanması doku içerisinde gerçekleşir. Eklem kıkırdağının katmanları, farklı yapısal ve işlevsel özellikler gösterir. Onarım gerçekleştirilirken subkondral kemik dahil bu katmanların yapılarının göz önüne alınması gerekir.

Bu çalışmada, kıkırdak doku hasarına yönelik, hücre yenilenmesinde etkili olduğu bilinen denizanası kollajeni (jellyfish collagen) içeren ve enjekte edilebilir bir *in situ* jel formülasyonun geliştirilmesi amaçlanmıştır. Hazırlanan *in situ* jelin, jelleşme ve şişme kapasitesi, fiziksel görünüşü, pH değeri ve reolojik davranışı gibi fiziksel özellikleri incelenmiştir. Formülasyonun içerdiği kollajenin *in vitro* salım profili ve sağlıklı L929 fare fibroblast hücreleri üzerindeki etkinlikleri belirlenmiştir. Ayrıca, eklem bölgesinde tam kat hasar durumunda jelin daha uzun süre hasarlı bölgede kalmasını sağlamak için, o bölgeye yerleştirilebilecek ve jelin emdirilebileceği kitosan iskeleler tasarlanmış, jelin bu disklerden salımı analiz edilmiştir. Kartilaj doku hasarının tedavisinde her iki tip kusura yönelik uygulanabilecek jel sistemi geliştirilmiştir.

Anahtar sözcükler: Denizanası kollajeni, Pluronic F-127, Kıkırdak doku hasarı, Kitosan, *In situ* jel.

ABSTRACT

DEVELOPMENT OF ALTERNATIVE GEL FORMULATION FOR REPAIRING CARTILAGE TISSUE DAMAGE

Mustafa BEKİROĞLU

Department of Biotechnology

Department of Advanced Technologies

Anadolu University, The Graduate School of Sciences, July 2019

Supervisor: Prof. Dr. Gülay BÜYÜKKÖROĞLU

For a long time, scientists have been working on new treatments for tissue loss or degeneration of cartilage, which has limited ability to repair and regenerate synovial joints. Joint cartilage is a multiphase tissue and has limited healing properties. Its structure is formed by type II collagens, which are predominantly recognized as chondrocytes and intercellular networks. The joint cartilage feeds on synovial fluid. Therefore, since blood derived growth factors do not reach the tissue, repair or reconstruction takes place within the tissue. The layers of the joint cartilage show different structural and functional properties. The structure of these layers, including the subchondral bone, must be taken into account when repairing.

In this study, it is aimed to develop an injectable in situ gel formulation for cartilage tissue damage, which contains jellyfish collagen which is known to be effective in cell regeneration. The physical characteristics of prepared in situ gel, such as gelling and swelling capacity, physical appearance, pH value and rheological behavior were examined. The in vitro emission profile of the collagen contained in the formulation and its activities on healthy L929 mouse fibroblast cells have been determined. In addition, in case of full-coat damage to the joint area, kitosan scaffolding, where the gel can be placed in that area and the gel can be absorbed, has been analyzed from these discs to ensure that the gel stays in the damaged area for longer. The gel system, which can be applied to both types of defects, has been developed in the treatment of cartilage tissue damage.

Keywords: Jellyfish Collagen, Pluronic F-127, Cartilage Tissue Damage, Chitosan, *In situ* gel.

TEŞEKKÜR

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

Tez çalışmalarım boyunca, bilgi ve tecrübeleri ile her zaman destek olan saygıdeğer Ar. Gör. Behiye Kaytaz Şenel'e, içtenlik ve samimiyetleri ile her zaman destek olan sevgili yüksek lisans çalışma arkadaşlarım Serdar, Rasim, Müşerref, Burcu, Bilgen, Sinan ve Akın'a teşekkürlerimi sunarım.

Çalışmamda faydalandığım *R.pulmo* denizanası kollajenini temin etme konusunda yardımcı olan Çanakkale Onsekiz Mart Üniversitesi, Biyomühendislik bölümünden sayın Dr. Öğr. Üyesi Yavuz Emre Arslan'a teşekkürlerimi sunarım.

Hayatıma değer katan, her ihtiyacım olduğunda yanımda olan çocukluk arkadaşım Alper Alp'e teşekkürlerimi sunarım.

Yüksek lisans süresince tanıdığım ve her zaman manevi desteklerini gördüğüm sevgili arkadaşlarım Gamze, Selin ve Sahra'ya ayrıca Eskişehir'de en yakın dostlarım İpek, Samet ve Nurcan'a teşekkürlerimi sunarım.

Kararlarımı her zaman destekleyerek bana olan güvenlerini ve sevgilerini esirgemeyen, maddi ve manevi olarak her koşulda destek olan annem, babam ve kardeşlerime çok teşekkür ederim.

ETİK İLKE VE KURALLARA UYGUNLUK BEYANNAMESİ

Bu tezin bana ait, özgün bir çalışma olduğunu; çalışmamın hazırlık, veri toplama, analiz ve bilgilerin sunumu olmak üzere tüm aşamalarında bilimsel etik ilke ve kurallara uygun davrandığımı; bu çalışma kapsamında elde edilen tüm veri ve bilgiler için kaynak gösterdiğimi ve bu kaynaklara kaynakçada yer verdiğimi; bu çalışmanın Anadolu Üniversitesi tarafından kullanılan “bilimsel intihal tespit programı”yla tarandığını ve hiçbir şekilde “intihal içermediğini” beyan ederim.

Herhangi bir zamanda, çalışmamla ilgili yaptığım bu beyana aykırı bir durumun saptanması durumunda, ortaya çıkacak tüm ahlaki ve hukuki sonuçlara razı olduğumu bildiririm.

Tarih: 31/07/2019

Mustafa BEKİROĞLU

İÇİNDEKİLER

	<u>Sayfa</u>
BAŞLIK SAYFASI	i
JÜRİ VE ENSTİTÜ ONAYI	ii
ÖZET	iii
ABSTRACT.....	iv
TEŞEKKÜR	v
ETİK İLKE VE KURALLARA UYGUNLUK BEYANNAMESİ	vi
İÇİNDEKİLER.....	vii
TABLolar DİZİNİ	x
ŞEKİLLER DİZİNİ	xi
SİMGE VE KISALTMALAR DİZİNİ	xiii
1. GİRİŞ VE AMAÇ	1
2. TEMEL BİLGİLER	3
2.1 Kartilaj Dokusu.....	3
2.1.1 Kartilaj doku yapısı	3
2.1.2 Kartilaj doku oluşumu ve gelişimi	4
2.2 Kartilaj Dokusu Çeşitleri	5
2.2.1 Hiyalin kıkırdak.....	6
2.2.2 Elastik kıkırdak.....	7
2.2.3 Fibröz kıkırdak	8
2.3 Eklem Kıkırdağı.....	8
2.3.1 Eklem kıkırdağı yapısı.....	8
2.3.2 Eklem kıkırdağı kusurları.....	11
2.3.3 Eklem kıkırdağı onarımında uygulanan yöntemler	13
2.4 Kıkırdak Doku Mühendisliği.....	17
2.4.1 İskele tasarımı ve biyomalzemeleri	17
2.4.2 Kıkırdak doku mühendisliği hücre kaynakları.....	18
2.4.3 Biyolojik uyarım	18
2.4.4 Hidrojeller	19

2.4.4.1 Doğal hidrojel	20
2.4.4.2 Sentetik hidrojel	21
2.4.5 Eklem kıkırdığı onarımı için kıkırdak doku mühendisliğinde kullanılan malzemeler	22
2.4.5.1 Aljinat	22
2.4.5.2 Serisin	22
2.4.5.3 Kondroitin Sülfat	23
2.5 Denizanası Kollajeni	23
2.5.1 Kollajen yapısı	23
2.5.2 Denizanasi ve kollajeni	25
2.5.2.1. <i>Rhizostoma pulmo (Deniz ciğeri denizanasi)</i>	26
2.6 Pluronic F-127	29
2.7 In Situ Jel Sistemleri	30
2.7.1 In situ jel sisteminin avantajları	31
2.7.2 In situ jel oluşum mekanizmaları	32
2.7.2.1 Sıcaklık değişimi ile jelleşen sistemler	32
2.7.2.2 pH duyarlı jelleşen sistemler	33
2.7.2.3 İyon etkisiyle jelleşen sistemler	33
3. MATERYAL	34
3.1 Kullanılan Maddeler	34
3.2 Kullanılan Cihazlar	35
4. YÖNTEMLER	37
4.1 In Situ Jel Formülasyon Çalışmaları	37
4.1.1 Uygun pluronic miktarı belirlenmesi	37
4.1.2 Farklı içerikli jellerin hazırlanması	37
4.2 In Situ Jel Formülasyonların Fizikokimyasal Özelliklerinin Belirlenmesi ...	38
4.2.1 Jelleşme kapasitesi	39
4.2.2 Şişme çalışması	39
4.2.3 Fiziksel görünüş ve saydamlık	40
4.2.4 pH ölçümü	40
4.2.5 Reolojik davranışın incelenmesi	40
4.3 Kitosan Disklerinin Hazırlanması ve Analizi	40
4.3.1 Kitosan disklerinin hazırlanması	40

4.3.2 Kitosan disklerin SEM (Taramalı elektron mikroskopu) analizi	41
4.3.3 Kitosan disklerin dağılım (dezentegrasyon) çalışması	43
4.4 Formülasyonların Disklere Yüklenmesi	44
4.4.1 Emdirme yöntemi	44
4.4.2 Enjekte yöntemi	45
4.5 <i>İn Vitro</i> Salım Çalışmaları	45
4.5.1 Formülasyon emdirilmiş disklerin salım çalışması.....	45
4.5.1.1 UV-Vis Spektrofotometre ile kollajen miktar analizi	46
4.5.1 Formülasyon enjekte edilmiş disklerin salım çalışması	47
4.5.1.1 SDS-Page jel elektroforezi (sodyum dodesil sülfat poliakrilamit jel elektroforezi) analizi	48
4.6 Sitotoksosite ve Hücre Çoğalması Çalışması.....	51
5. BULGULAR ve TARTIŞMA	53
5.1 <i>In Situ</i> Jel Formülasyon Çalışmaları	53
5.1.1 Uygun pluronic miktarı belirlenmesi.....	56
5.1.2 Farklı kombinasyonlarda jel hazırlanması	58
5.2 <i>İn Situ</i> Jel Formülasyonlarının Fizikokimyasal Özelliklerinin Belirlenmesi	59
5.2.1 Jelleşme kapasitesinin belirlenmesi	60
5.2.2 Şişme çalışması.....	61
5.2.3. Fiziksel görünüş ve saydamlık	62
5.2.4 pH ölçümü	62
5.2.5. Reolojik davranışın incelenmesi.....	63
5.3 Kitosan Disklerinin Karakterizasyonu	66
5.3.1 Kitosan disklerin SEM (Taramalı elektron mikroskopu) analizi	67
5.3.2 Kitosan disklerin dezentegrasyon çalışması	69
5.4 <i>İn Situ</i> Jelin <i>İn Vitro</i> Salım Çalışmaları.....	70
5.4.1 Emdirme yöntemine ait salım	70
5.4.2 Enjekte etme yöntemine ait salım.....	72
5.6 Sitotoksosite ve Hücre Çoğalması Çalışması.....	73
6. SONUÇ VE ÖNERİLER.....	76
KAYNAKÇA	77
ÖZGEÇMİŞ	

TABLÖLAR DİZİNİ

Sayfa

Tablo 2.1. Eklem kıkırdağı tabakalarının yapı ve özellikleri.....	11
Tablo 2.2. R.pulmo sınıflandırması.....	28
Tablo 2.3. P F-127 fizikokimyasal özelliği.....	30
Tablo 4.1. Jel formülasyonlarına ait kodlar ve içerikler	38
Tablo 4.2. İn situ jel formülasyonunun jelleşme kapasitesi derecesi.....	39
Tablo 4.3. Kitosan diskleri için kullanılan oranlar.....	41
Tablo 5.1. PF-127 jelinin farmasötik formülasyonlardaki araştırmalar	54
Tablo 5.2. 37 C'deki farklı konsantrasyonlardaki Pluronic F-127jellerinin yapısı.....	57
Tablo 5.3. Formülasyonların jelleşme kapasitesi	60
Tablo 5.4. Formülasyonun Şişme oranı	61
Tablo 5.5. Formülasyonların pH değerleri.....	63
Tablo 5.6. Kitosan disklerin ağırlık tablosu	70

ŞEKİLLER DİZİNİ

Sayfa

Şekil 2.1. Kıkırdak Dokusu yapısı.....	4
Şekil 2.2. Kıkırdak histogenezi.....	5
Şekil 2.3. Kıkırdak Dokusu çeşitleri.....	6
Şekil 2.4. Eklem kıkırdağı yapısı.....	9
Şekil 2.5. Sağlam ve Artritli diz yapısı.....	13
Şekil 2.6. Kollajenin genel yapısı.....	24
Şekil 2.7. <i>R.pulmo</i>	27
Şekil 2.8. Pluronic® triblok kopolimeri	29
Şekil 2.9. P F-127 Formülasyonu	30
Şekil 2.10. <i>In situ</i> jel sistemi.....	32
Şekil 4.1. Tek Hedefli Plazma Püskürtmeli İnce Film kaplama Cihazı (SBC-900).....	42
Şekil 4.2. Masaüstü SEM cihazı (HITACHI TM 3030 plus)	43
Şekil 4.3. Disolüsyon sistemi (Pharma Test PTWS 820D)	44
Şekil 4.4. Sotax Dissolüsyon sistemine ait salım hücresi.....	46
Şekil 4.5. İn vitro salım düzeneği	46
Şekil 4.6. Lambert Beer yasası	47
Şekil 4.7. Franz disüfyon hücresi	48
Şekil 4.8. SDS elektroforez şeması	49
Şekil 5.1. Pluronic® F127 ile ilgili 1982'den beri yayınlanan yıllık yayın verisi	53
Şekil 5.2. Sol-gel geçiş sıcaklığı ile P-F127 konsantrasyonları arasındaki ilişki.....	57
Şekil 5.3. P-F127 Jelleşme kapasitesi deneyi	60
Şekil 5.4. Formülasyonların fiziksel görünüşü.....	62
Şekil 5.5. 25 °C'deki P-F127'ye ait reogram	64
Şekil 5.6. 37 °C'deki P-F127'ye ait reogram	65
Şekil 5.7. 25 °C'deki F1 formülasyonuna ait reogram	65
Şekil 5.8. 37 °C'deki F1 formülasyonuna ait reogram.....	65
Şekil 5.9. Kitosan diskler.....	66
Şekil 5.10. Yüksek yoğunluklu kitosan disklerin çeşitli oranlarda SEM görüntüleri ...	67

Şekil 5.11. Orta yoğunluklu kitosan disklerin çeşitli oranlarda SEM görüntüleri	68
Şekil 5.12. Düşük yoğunluklu kitosan disklerin çeşitli oranlarda SEM görüntüleri	68
Şekil 5.13. Kollajene ait UV standart eğrisi	71
Şekil 5.14. Kollajenli formülasyonun salım grafiği	71
Şekil 5.15. Düşük yoğunluklu kitosan disk salım görüntüsü	72
Şekil 5.16. Orta yoğunluklu kitosan disk salım görüntüsü	72
Şekil 5.17. Yüksek yoğunluklu kitosan disk salım görüntüsü	73
Şekil 5.18. 24. Saatteki hücre canlılık grafiği	74
Şekil 5.19. 48. Saatteki hücre canlılık grafiği	74
Şekil 5.20. 72. Saatteki hücre canlılık grafiği.....	75

SİMGE VE KISALTMALAR DİZİNİ

AC	: Artiküler kıkırdak
ACI	: Otolog kondrosit implantasyonu
DMEM	: Dulbecco's Modified Eagle Medium
ECM	: Ekstraselüler matriks
FDA	: ABD Gıda ve İlaç İdaresi
LCST	: Düşük kritik çözelti sıcaklığı
OA	: Osteoartrit
PBS	: Fosfat tamponlu tuz çözeltisi
P-F127	: Pluronic F127
PRP	: Platelet zengin plazma
SDS-PAGE	: sodyum dodesil sülfat–poliakrilamid jel Elektroforezi
SEM	: Taramalı elektron mikroskobu
UV-Vis	: Ultraviyole ve görünür ışık absorbsiyon spektroskopisi

1. GİRİŞ VE AMAÇ

Kıkırdak dokusu, gerilmelerin emilimi, düşük sürtünme yeteneği ve yüksek aşınma direnci gibi eklem yüzeylerinin hareket kabiliyetini kolaylaştıran mekanik özelliklere sahiptir. Mekanik performansına rağmen, kıkırdak dokusu kan ve sinir damarlarından yoksundur. Bununla birlikte, vasküler yetersizlik, onarım potansiyelinin düşük olması nedeniyle kıkırdak lezyonlarına neden olur (Junqueira ve Carneiro, 2005).

Hunter 1743'te "Hipokrattan günümüze kadar, kusurlu kıkırdağın sıkıntılı bir durum olduğu ve bir kere zarar gördüğünde tamir edilmesinin imkânsız olduğu herkes tarafından bilinmektedir." söyleminde bulunduğundan bu yana, eklem kıkırdağı üzerinde çok fazla araştırma yapılmıştır. Son 40 yılda yapılan çalışmalar biyolojik onarım sürecini anlaşılmasında önemli katkılar sağlamıştır. Son zamanlarda, tam kalınlıktaki kıkırdak kusurları durumunda eklem kıkırdağının, kendiliğinden bir onarım tepkisi gösterdiği belirlenmiştir ancak bu onarım tepkisi biçim ve işlev açısından sınırlıdır. Buna karşılık, kıkırdak ile sınırlı kısmi kalınlıktaki lezyonlarda onarım işlemlerinde belirsizlikler hala mevcuttur (Suh ve Matthew, 2000).

Bu çalışmada amaç, kartilaj doku hasarı onarımında kullanılmak üzere, sinoviyal zar geçilerek iki kıkırdak arasına enjekte edilebilecek, eklem arasında vücut sıcaklığında jelleşebilecek, denizanasından elde edilmiş ve hücre yenileyici özelliği olan kollajeni içeren bir sitü jel formülasyonu geliştirmektir. Bunun için, noniyonik yüzey etkin madde olarak pek çok ilaç taşıyıcı sistemin hazırlanmasında kullanılan ve Pluronic F-127 [Poloxamer 407 (PF-127); Poli(etilen glikol)-block-poli (propilen glikol) -block-poli (etilen glikol)] olarak bilinen ısıya duyarlı bir hidrojel kullanılmıştır. Hazırlanacak olan formülasyon oda ısısında çözelti formunda olup, eklem içine enjekte edilmesiyle vücut sıcaklığıyla jelleşecek özellikte olacaktır. Çözelti formundaki formülasyonlar, Hazırladığımız formülasyonun, eklem içinde vücut sıcaklığı ile jelleşmesi, içerdiği hücre yenileyici kollajen ve kitosanın daha uzun süre eklem içinde kalmasını dolayısıyla hasarlı kıkırdak dokuyla temasının arttırılması söz konusu olacaktır. Aynı zamanda uygulanması kolay, üretim maliyetleri ucuz, biyo uyumlu, onarıcı, cerrahi operasyona olan ihtiyacı azaltacak ve toksik olmayan bir formülasyon geliştirilmiş olacaktır. Çalışmada kullanılacak denizanası kollajeni, hücre migrasyonunu arttırarak hasarlı bölgeye hücre göçünü sağlaması ayrıca kollajen hasarlı bölgedeki dokuda bulunan doğal bir biyomalzeme olduğu için immün yanıt oluşturmaması umulmaktadır. Yapılan çalışmalarda Denizanasından alınan kollajenin, insan kollajen II'ye benzediği ve bu tip

kollajenin geleneksel domuz kollajen I'den daha iyi kondrojenik fenotipi desteklediği literatürlerde gösterilmiştir. Bunun dışında doku hasarı yüksek olup ameliyat gerektiren vakalarda onarmayı hızlandırıcı yardımcı destek materyal olarak kullanılabileceği ön görölmektedir. Oluşturulacak hidrojel formölasyonu farklı etkin madde ya da büyüme faktörü gibi biyolojik ürünleri vücut içindeki hedef bölgesine kontrollü bir şekilde aktarılabilecek özellikte olacaktır.

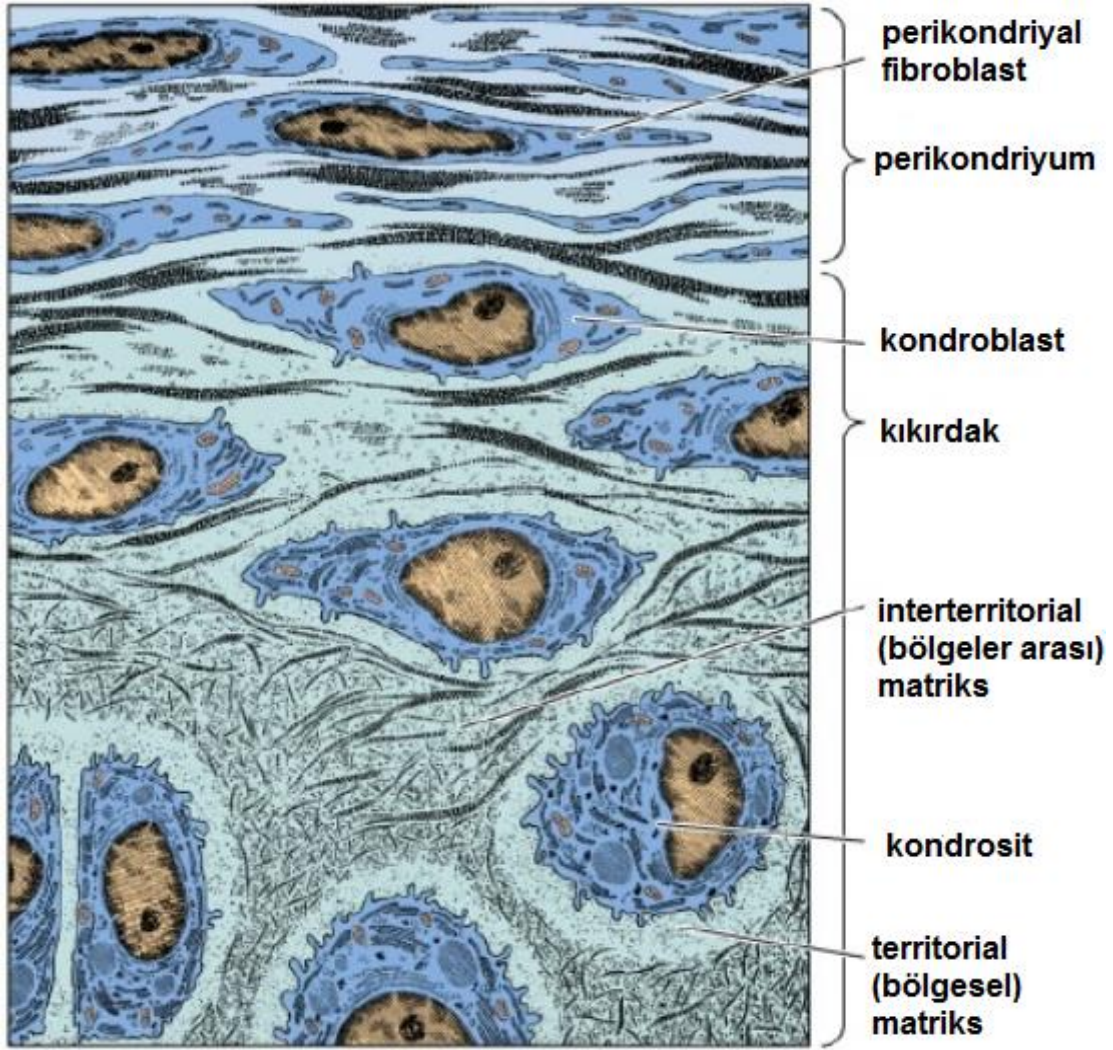
2.TEMEL BİLGİLER

2.1.Kartilaj Dokusu

2.1.1. Kartilaj doku yapısı

Kartilaj dokusu, destek dokusunun özel bir çeşitidir. Kondrosit adı verilen kıkırdak hücreleri, kollajen ve elastin iplikçikler ile etkileşen makromoleküller bakımından zengin bir hücre dışı matriks (Ekstraselüler matriks, ECM) ile karakterize edilmektedir. ECM, kondrositler tarafından sentezlenerek salgılanmaktadır. Kollajen, hiyaluronik asit proteoglikanlar ve glikozaminoglikanlar tüm kıkırdak tiplerinin matriksinde yer alan temel makromoleküllerdir (Tıgılı, 2009). Kıkırdak, kemikten çeşitli şekillerde farklılaşan esnek bir bağ dokusudur. Birincil hücre tipleri osteositlerden ziyade kondrositlerdir. Kondrositler, kollajen hücre dışı matriksi (ECM) üreten ve daha sonra matrikste yakalanan ilk kondroblast hücrelerdir. Kıkırdağın temel maddesi kondroitin sülfattır ve mikro mimari açıdan kemiğe nazaran çok daha az organize olmuştur (Tıgılı, 2009). Kıkırdağın üç önemli görevi vardır. Uzun kemiklerin büyümesi ve gelişmesi için bir kalıp görevi yapar. Fetal iskeletin büyük kısmı kıkırdaktan oluşur ve endokondral kemikleşmede önemli bir rol oynar. Ayrıca büyüme çağında uzun kemiklerin büyümesine yardımcı olur. Erken evredeki kıkırdak hücreleri kondroblastlar ve olgun kıkırdak hücreleri kondrositler olup görevleri kıkırdak matriksinin üretimini ve devamını sağlamaktır (Demirdögen, 2012).

Kıkırdak dokusu, Hyalin, elastik ve fibröz kıkırdak olmak üzere 3 farklı kıkırdak türünden meydana gelmektedir (Şekil 1). Her üç formda da kıkırdak avaskülerdir ve besin maddelerinin kılcalların bitişik bağ dokusundaki (perikondrium) veya kılcallardan, eklem boşluklarından gelen sinovyal sıvı difüzyonu ile beslenir. Bazı durumlarda, kan damarları kıkırdakları beslenmeyen dokulara doğru ilerletir, ancak bu damarlar kıkırdak için besin sağlamaz. Bir avasküler dokudaki hücrelerin beklenebileceği gibi, kondrositler düşük metabolik aktivite sergilerler. Kıkırdakta lenfatik damar veya sinir yoktur. Perikondrium, kıkırdağı çevreleyen, kıkırdak ile kıkırdak tarafından desteklenen doku arasında bir ara yüz oluşturan yoğun bir bağ dokusunun kılıfıdır. Perikondrium, avasküler kıkırdak için vasküler desteği sağlar ve ayrıca sinirler ve lenfatik damarlar içerir. Hareketli eklemlerin kemiklerinin yüzeylerini kaplayan eklem kıkırdağı perikondriumdan yoksundur bu yüzden eklem kıkırdağı sinovyal sıvıdan oksijen ve besinlerin difüzyonu ile korunur (Junqueira ve Carneiro, 2005).



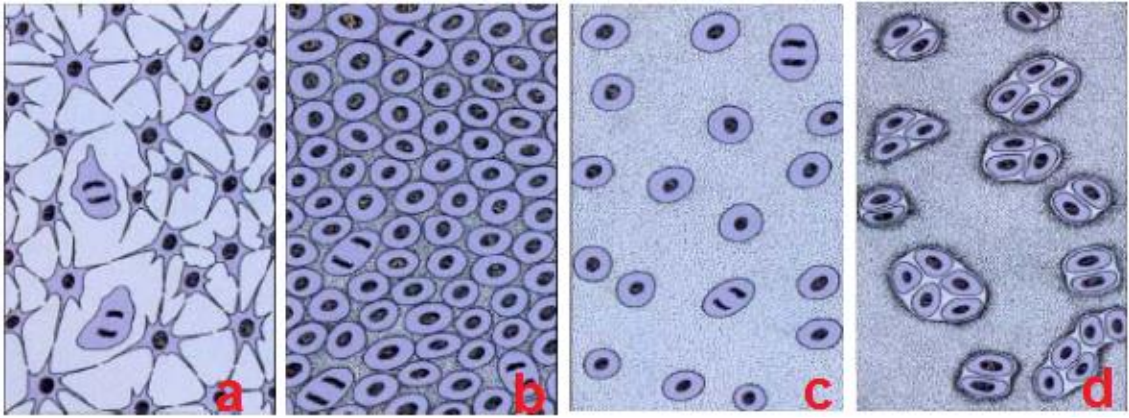
Şekil 2.1. Kıkırdak Dokusu yapısı (Junqueira ve Carneiro, 2005)

2.1.2 Kartilaj doku oluşumu ve gelişimi

Kartilaj embriyoda 5. Hafta belirir. Embriyonun belirli yerlerinde bulunan mezodermal hücrelerin farklılaşması ile mezankimal hücreler meydana gelir. Kıkırdak dokusu gelişme süreci mezenkimal hücrelerin kümelenmesi ile başlar. Bu kümelenme hyalin kıkırdak yapısını oluşturmaya başlar. Öncül kıkırdak dokuya “blastema (prekondral doku)” denir. Blastema hücreleri matrisi salgılama durumuna geldikten sonra “kondroblast” adını alır (Şekil 2.2). Böylece oldukça kompakt ve kondroblastan zengin ilk kartilaj taslağı oluşur. Matris sentezi başladıktan sonra hücreler birbirlerinden uzaklaşır ve hücreler tamamen matris ile çevrelendiklerinde “kondrosit” adını alırlar (Şekil 2.3). Kartilajda farklılaşmanın merkezden çevreye doğru olmasında dolayı merkezdeki hücreler kondrosit, periferdeki hücreler tipik kondroblast halindedir.

Perikondriumun kondroblast ve fibroblastlarını gelişmekte olan kartilajın yüzeyindeki mezenkim oluşturur (Cıncık, 2000).

Kıkırdak dokusu apozisyonel (yüzeysel) ve interstisiyel (iç) büyüme olmak üzere iki yönde gelişir. Apozisyonel büyüme, perikondriumun matris içeriğini (tip I kollajen) salgılayan ve perikondriumun iç kısmında yer alan fibroblast benzeri hücreler yeni kıkırdak hücrelerini oluşturur. İlk olarak hücrelerin sitoplazmik aktiviteleri durur. Daha sonra çekirdek yuvarlaklaşır, sitoplazma içeriğı artar ve belirginleşir. Böylece hücre kondroblast halini alır. Kondroblast tip II kollajen salgılamaya başlar. Oluşan yeni matris kıkırdak kütlesini arttırır. İnterstisiyel büyüme, kıkırdak dokusundaki hücrelerin yeni kıkırdak hücrelerini oluşturmasıyla meydana gelir. Lakuna içerisindeki hücreler bölünerek yeni hücreleri meydana getirir ve hücre dışı matris sentezlenmeye başlanır. Bu noktada hücreler matris ile çevrelenerek kendi lakunalarını oluşturur ve matris sentezi devam ettikçe birbirlerinden ayrılırlar. İnterstisiyel büyüme uzun kemiklerin epifizyal plaklarında ve artikular kıkırdakta görölmektedir (Suh ve Matthew, 2000).



şekil 2.2. Kıkırdak histogenezi. (a) Mezenkimal hücreler, (b) Farklılaşma aşamasında mezenkimal hücrelerin hızla çoğalıp yuvarlaklaşması, (c) Yoğun matris sentezi sonucu kondroblastların merkezden çevreye doğru birbirlerinden uzaklaşması ve kondrosit hücrelerini oluşturmaları, (d) kıkırdak hücrelerin çoğalması ile oluşan izojenik grup kümeleri ve grupları çevreleyen teritoryal (kapsül) matris (Junqueira ve Carneiro, 2000)

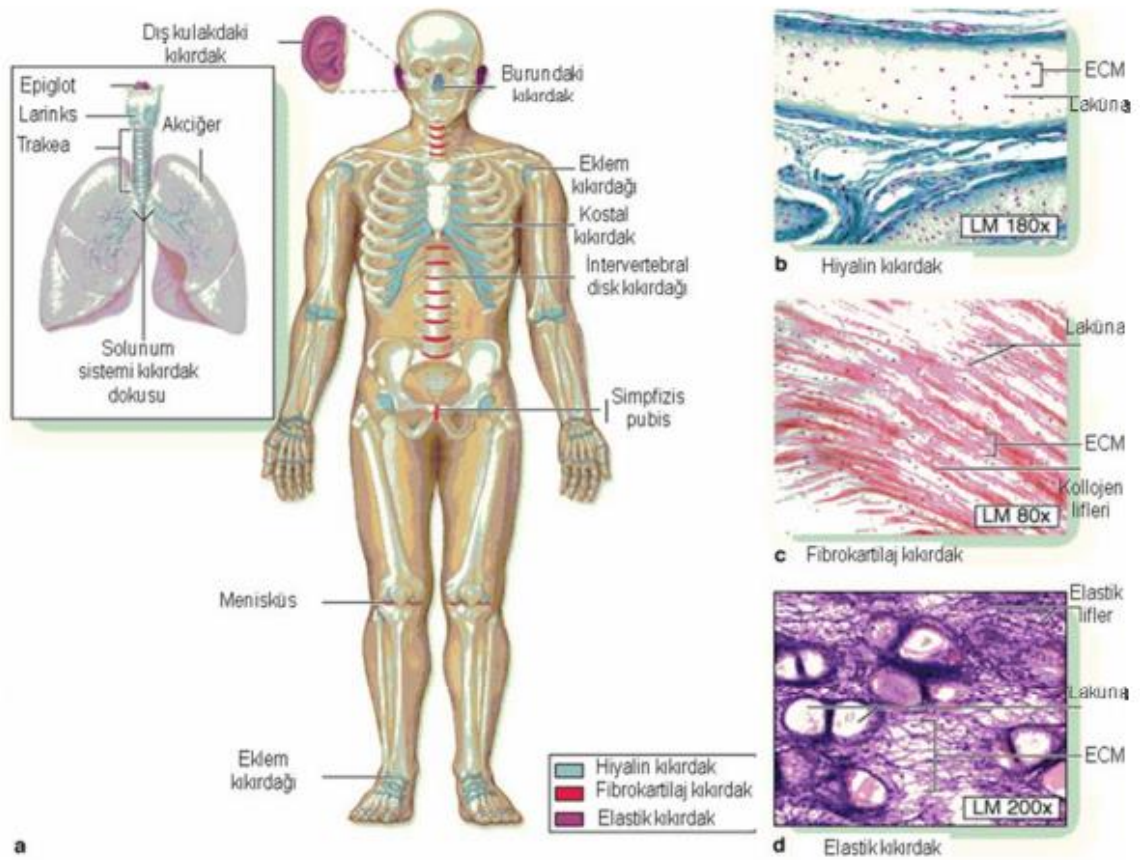
2.2. Kartilaj Dokusu Çeşitleri

İnsanlarda kartilaj dokusu kemiklerin eklem yüzeylerinde, trakea'da, bronşlarda, burun'da, kulaklarda, larinks'de ve intervertebral disklerde bulunur. Kıkırdak dokuda; hücreler, bağlar ve şekilsiz destek maddesi bulunur. Kıkırdak dokusu hücresel olmayan

komponent yönünden zengindir ancak kan damarları ile sinirlerden yoksundur (Gürer, 2011).

Kıkırdak dokusu 3 farklı tipten meydana gelir; (Şekil 2.3)

1. Hiyalin kıkırdak
2. Elastik kıkırdak
3. Fibröz kıkırdak.



Şekil 2.3. Kıkırdak Dokusu çeşitleri (http-1)

2.2.1. Hiyalin kıkırdak

Hyalin kıkırdak, üç kıkırdak formunun en yaygın olanı ve en iyi çalışılanıdır. Taze hyalin kıkırdak mavimsi beyaz ve yarı saydamdır. Embriyoda, yavaş yavaş kemik ile yer değiştirene kadar geçici bir iskelet işlevi görür. Yetişkin memelilerde, hyalin kıkırdak hareketli eklemlerin eklem yüzeylerinde, büyük solunum yollarının duvarlarında (burun,

gırtlak, trakea, bronşlar), kaburgaların ventral uçlarında, sternum ile ve epifiz plakasında eklemlendikleri yer ve kemiğin uzunlamasına büyümesinden sorumlu olduğu bölgede bulunurlar (Demirdögen, 2012).

Hyalin kıkırdığın matriksi homojen bir yapıdadır. Hücreler arası temel maddesi glikokozaminoglikanlar ve glikoproteinlerden meydana gelmektedir. Proteoglikanlar katyon bağlayıcı özelliktedir bundan dolayı matriks içinde su ve elektrolitlerin taşınmasında önemli rol alırlar. Hyalin kıkırdak matriksinde ilerleyen yaşla birlikte, matriks kalsifikasyonu gibi dejenerasyonlar meydana gelir. Hyalin kıkırdak rejenerasyonu oldukça güçtür (An ve Martin, 2003).

Eklem bölgelerinde ki kıkırdak doku (hyalin kıkırdak) bir gerilime maruz kaldığında veya eklem hareketine bağlı olarak kısa süreli bölgesel değişiklikler meydana geldiğinde dokunun içerisindeki sıvı miktarı buna bağlı olarak değişkenlik gösterir. Yüksek derecelerde hidrasyon ve sıvının matriks içindeki hareketi, kıkırdak dokusunun basınç ve ağırlığa karşı mukavemetini sağlar. Matriksin sentezi ve devamlılığı, kondrositlerin matriks yapısındaki değişimi fark etme yeteneğine bağlıdır. Kondrositler bu değişimlere cevap olarak yeni moleküllerin sentezini yapar. Bunun yanı sıra matriks bir sinyal değiştirici gibi davranarak kıkırdağa bir gerilim uygulandığında mekanik, elektriksel ve kimyasal sinyaller ile kondrositlerin sentez aktivitesini uyarır. Yaş ilerledikçe matriks içeriği değişir ve kondrositler bu uyarılara cevap verme yeteneğini kaybeder (Suh ve Matthew, 2000). Hyalin kıkırdakların yaşla birlikte kemikleşme ve kalsifiye olma eğilimleri vardır (Özemre ve ark., 2016).

2.2.2. Elastik kıkırdak

Elastik kıkırdakta kondrositlerin şekli hyalin kıkırdaktaki kondrositlere benzerdir. Ve hyalin kıkırdak gibi perikondriuma sahiplerdir. Etrafları kapsülle çevrilidir. Tek tek hücreler şeklinde veya birkaç hücreden oluşan izogen gruplar halinde bulunurlar. Elastik kıkırdak daha esnek ve bükülebilir ve ayrıca matriksinde Tip II kollajene ek olarak bol miktarda elastik lif mevcuttur. Kulak kepçesi, östaki tüpü, epiglot ve aritenoid kıkırdağın vokal çıkıntılarında bulunur. Elastik kıkırdakta kemikleşme olmaz, dejenerasyon daha az görülür (Özemre ve ark., 2016).

Elastik kıkırdakta, matris, maddesinde gömülü olan elastik liflerin bolluğu nedeniyle, soluk sarı bir görünüme sahiptir. Bu kıkırdak çeşidi, hyalin kıkırdaktan daha esnektir (Çevirme, 2014).

2.2.3. Fibröz kıkırdak

Fibröz kıkırdak gri-beyaz renkte görülmektedir. Fibröz kıkırdak, sıkı bağ dokusu ile hiyalin kıkırdağın karışımından meydana gelmektedir. Daima kompakt bağ dokusu ile birliktedir. Kıkırdak hücreleri ve az miktarda da matriks bol miktarda ki kollajen fibriller (Tip I) arasında yer alır. Kondrositler, tek tek ya da izogen grup dizileri oluşturarak art arda yerleşirler (Erdoğan, 2012).

İnsanlarda dış kulağı, orta kulağın işitme tüpünü ve epiglotti oluşturur. Bunun dışında tendonların veya ligamanların sıkıştırma altında olduğu bölgede bir fibrokartilaj matrisi oluşturulur (Benjamin ve Ralphs, 1998; Palmer, 1989).

2.3. Eklem Kıkırdağı

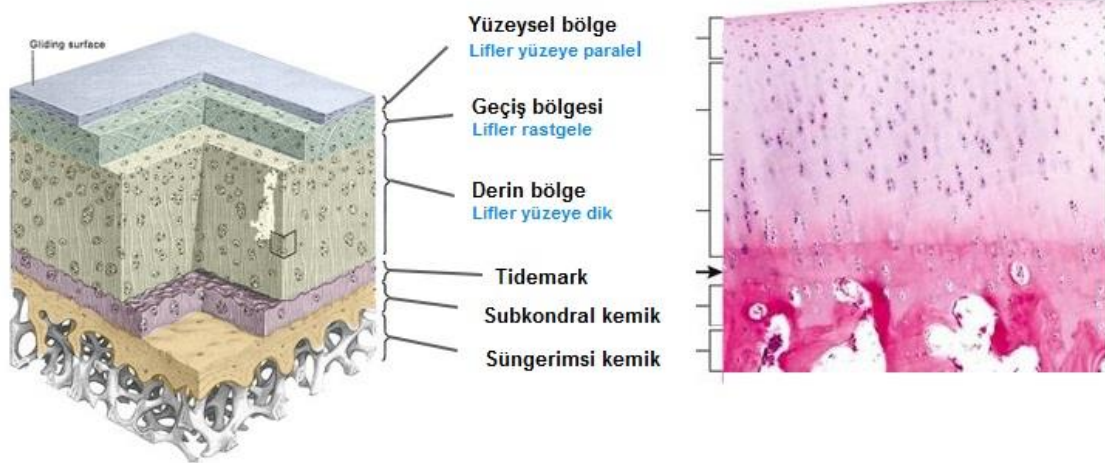
2.3.1. Eklem kıkırdağı yapısı

Eklem kıkırdak (Artiküler kıkırdak, AC), diarthrodial eklemlerde bulunan ve vücudun eklemlili kısımlarındaki kemiklerin uçlarını örten özel bir hiyalin kıkırdak şeklindedir. İnsan eklem kıkırdağı en fazla birkaç milimetre kalınlığındadır. Hücre dışı matris esasen, vücut ağırlığının 6-8 katına kadar dayanabilecek şekilde sıkıştırma, gerilme ve kayma gerilmelerine karşı doku direncini sağlar (Çalikoğlu, 2011).

Eklem kıkırdağı bir avasküler dokudur ve esas olarak yoğun bir proteoglikan ve kollajen matrisinde kaplanan kondrositlerden oluşur, bu nedenle kendi kendine onarım için sınırlı kapasiteye sahiptir (Göl, 2015). Genel olarak, kondrositler kıkırdak dokusunun %10'undan azını oluştururken geri kalanı % 75-80 su, % 50-70 kollajen tip II ve % 15-30 proteoglikandan oluşan hücre dışı matrikstir (ECM). Eklem kıkırdağı, yaşam süremiz boyunca devamlı olarak mekanik gerilimlere maruz kalır (LeBaron ve Athanasiou, 2000). Bun gerilimler kıkırdak dokusunun sağlıklı kalması için gerekli uyarılardır (Stockwell, 1991). Yük taşımayan kıkırdak incelik ve yumuşak. Yük taşıyan eklem yüzey alanlarındaki kıkırdak dokusu, daha kalın ve mekanik olarak daha güçlüdür. Kıkırdak dokusu; farklı yüklenme şekillerine göre, metabolik değişikliklerle uygun cevabı verir (Gürer, 2011; Hall ve ark., 1996). Küçük yaşlarda çok fazla miktarda olan hücre yoğunluğu, ilerleyen yaşla birlikte azalma gösterir, kıkırdak daha baskın hale geçer. Bu azalma 20-30 yaşlar arasında pik yapar ve hücre yoğunluğunun en az olduğu dönem bu yaşlar arasındaki dönemdir (Freeman, 1979).

Eklem kıkırdağı her ne kadar hyalin kıkırdak yapısına sahip olsa dahi, eklem kıkırdağı diğer hyalin kıkırdaklardan (nazal ya da trakea kıkırdakları gibi) ayıran bazı özellikleri mevcuttur. Diğer hyalin kıkırdak yapılarında bulunmayan kalsifiye yapısı vardır. Bu yapıdan başlayarak eklem yüzeyine doğru dikey ilerleyen ve yüzeyde bükülerek paralel olarak devam eden Tip II kollajen lifleri oluşumu ve bu liflerin arasında kolonlar halinde yerleşmiş “sferik” (küresel) hücreler ile yüzeyde yassı halindeki kondrositler şeklinde bir mimariye sahiptir. Bu mimari, eklem yükünün taşınabilmesi için özgün bir yapıdır (Breinan ve ark., 2001).

Eklem kıkırdağı; hücresel yapısı, biyomekanik bileşim ve yapısal oluşum bakımlarından, dört ayrı tabakadan oluşmaktadır. Bunlar yüzeysel tabaka, orta tabaka, derin tabaka ve kalsifiye olmuş tabaka (Şekil 2.4). Derin tabaka ile kalsifiye olmuş kıkırdak tabaka arasında “tidemark” adı verilen bir geçiş bariyeri bulunmaktadır.



Şekil 2.4. Eklem kıkırdağı yapısı (http-2)

Yüzeysel tabaka iki katmana sahiptir. Ağırlıklı olarak sadece küçük polisakarit içeriğine sahip kollajen liflerinden oluşan birinci katman, eklem yüzeyini kaplar. İkinci katman ise kondrositlerin birinci katmanın altında yüzeye düz ve paralel bir şekilde yerleşmesiyle oluşur. Ek olarak, kollajen lifleri bu bölgedeki eklem yüzeyine paralel olarak hizalanır. Orta tabaka en kalın tabakadır, kondrositler, rasgele dağılmış ve düşük miktarda kollajen lifleri içeren ince bir hücreli bölüm ile çevrili olarak yuvarlaklaşır. Su ve kollajen içeriği yüzeysel kata göre daha azdır (Temenoff ve Mikos, 2000, Poole ve ark., 2001). Derin tabakada ki kondrositlerin metabolik aktivitesi yüzeysel tabaka

hücrelerinden on kat daha fazladır. Bu bölgede ki kollajen lifleri en büyük çaptaki kollajen lifleridir. Kollajen lifleri yüzeye dik sütunlar şeklinde dizilmiştir. En yüksek konsantrasyonda proteoglikanları ve en düşük konsantrasyonda suyu içerir. Bu lifler derin tabaka ile kalsifiye kıkırdak arasındaki geçişi işaretleyen çizgiye yapışır. Kısmen mineralize olan kalsifiye bölge, subkondral kemiğe en yakın konumda bulunur, kıkırdak ve altta kalan subkondral kemik arasında bir geçiş görevi görür. Bu bölgenin kondrositleri daha küçüktür ve neredeyse hiç endoplazmik retikulum içermemekte ve kalsifiye bir “ECM” tarafından tutulmaktadır (Çalikoğlu, 2011; Meyer ve Wiesmann, 2006).

Yüzeysel tabaka, yüksek konsantrasyonda kollajen lifleri içermektedir. Bunlar birbirlerine dik açıda yani eklem yüzeyine paralel düzenlenmiştir. Metabolik aktivitesi düşüktür. Makaslama (Etki noktasında, bir cismin yüzeyine etkiyen teğet kuvvet bileşeni) kuvvetlerine karşı koyar. Orta tabakada kollajen fibrilleri oblik (eğik) olarak düzenlenmiştir (Miller ve ark., 2012). Bu bölgenin metabolik aktivitesi yüksektir ve daha çok kompresif (basınçlı) kuvvetlere karşı koyar. Derin tabakada ise kollajen fibrilleri vertikal (dikey) olarak yerleşmiştir. Bu bölgede kollajen boyutları bol miktardadır ve kompresif kuvvetlere karşı koyar. Tidemark bölgesinde kollajen lifleri yüzeysel tabakada olduğu gibi horizontaldır (yatay). Tidemark bölgesinin 2 fonksiyonu vardır. Makaslama kuvvetlerine karşı korumak ve bariyer görevi görmek. Bu bölge, çocuklardan ziyade erişkinlerde daha belirgin haldedir. Kalsifiye bölgenin en önemli temel bileşeni hidroksiapatit kristalleridir. Bu bölge çıpa görevi görmektedir. Yüzeysel bölgeden derin bölgeye inildikçe, kondrosit hacmi artarken, kollajen lifleri eklem yüzeyine dik hale gelir (Eyre ve ark., 2006; Wong ve ark., 1996).

Eklem kıkırdağının, yüzeysel tabakasında kollajen liflerinin yönü mekanik açıdan çok önemlidir. Kıkırdak yüzeyi sivri bir cisimle delindiğinde doku kollajen lifleri boyunca ikiye ayrılır. Buda, dokudaki mekanik davranışların yöne bağlı olduğunun bir kanıtıdır (Gürer, 2011).

Tablo 2.1. Eklem kıkırdağı tabakalarının yapı ve özellikleri (Gürer B., 2011)

Tabaka	Kalınlık(μm)	Özellik	Kollajen Dizilimi	Fonksiyon
Yüzeyel	40	Metabolik aktivite düşük	Horizontal	Gerilmeye karşı
Orta(Geçiş)	500	Metabolik aktivite yüksek	Oblik	Kompresyona karşı
Derin	1000	Kollajen boyutu	Vertikal	Kompresyona karşı
Tidemark	5	Bariyer	Horizontal	Gerilmeye karşı
Kalsifiye	300	Hidroksiapatit kristalleri	-	Ankor

2.3.2. Eklem kıkırdağı kusurları

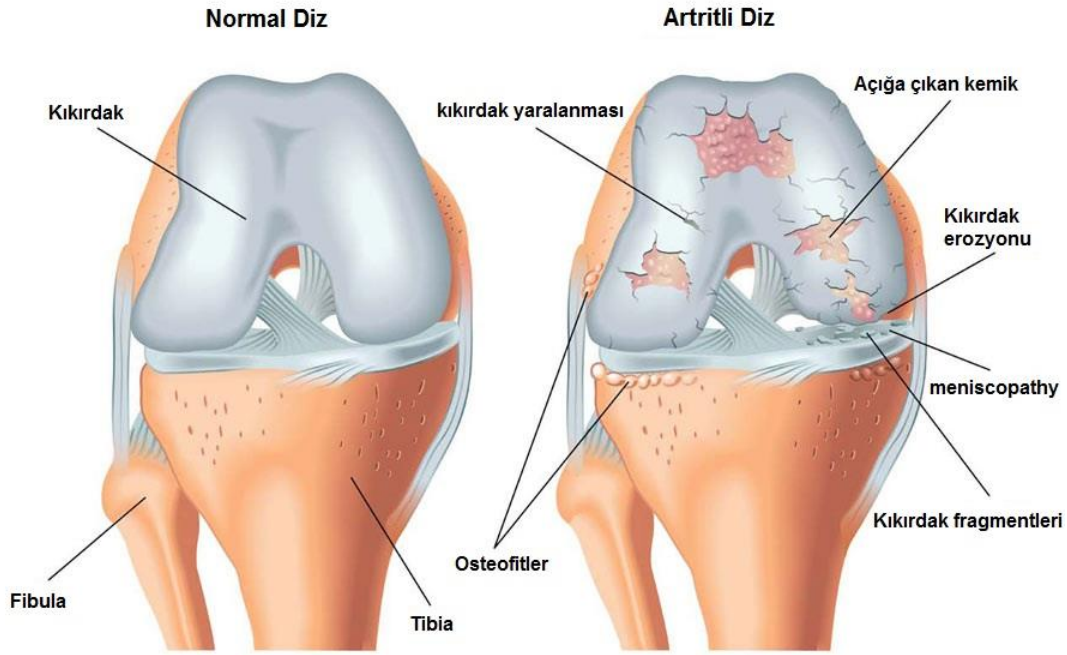
Etkiler, şoklar ve sert yüklenme, eklem kıkırdağına zarar verebilir; bu da ağrıya, şişmeye ve fonksiyon bozukluğuna ve hatta eklemde dejenerasyona neden olur. Artiküler (Eklem) kıkırdak yaralanmaları, verilen hasar ve onarımdaki farklılıklara göre üç sınıfa ayrılabilir: Matris bozulması, eklem kıkırdak yüzeyinin mekanik bozulması “kısmi kalınlık kusurları” ve eklem kıkırdak ve subkondral kemiğin mekanik bozulması “tam kalınlık defektleri” (Çalikoğlu, 2011).

- I. Matris bozulmasında ECM zarar görür ancak kondrositler hasarlı dokuyu onarmak için daha aktif hale gelir. Bu tür yaralanmalar, araba kazalarında meydana gelen doğrudan şoklardan kaynaklanır.
- II. Kısmi kalınlık kusurlarında, kıkırdak yüzeyi de ECM'nin yanı sıra hasar görür, subkondral kemik ise bozulmadan kalır. Bununla birlikte, yaralanmadan sonra, komşu kondrositler çoğalmaya başlar ve bu da hasarı onarmak için yeterli olmayabilir.
- III. Tam kalınlıktaki kusurlarda, sadece kıkırdak dokusu değil, aynı zamanda subkondral kemik de hasar görür, çoğunlukla geri dönüşsüzdür. Ek olarak, kemik iliğinin içindeki progenitör hücreler (pluripotent mezenkimal kök hücreler) defekti onarmak için hasarlı bölgeye göç edebilir. Bu hücreler genellikle, daha düşük rijitliğe sahip fakat orijinal eklem kıkırdaklarından daha geçirgen olan hiyalin kıkırdaktan ziyade fibrokartilaj oluşturur. Bu tür bir iyileşme yeni oluşturulan

dokunun birkaç ay içinde bozulmasına neden olabilir (Temenoff ve Mikos, 2000; Buckwalter, 1998).

Osteokondritis dissekans (OCD) 1888 yılında König tarafından, ilk bir travma olmaksızın eklemlerde serbest cisimlerin oluşmasına yol açan bir durum olarak tarif edilmiştir. Osteoartrit (OA), yalnızca Amerika Birleşik Devletleri'nde yaklaşık 90 milyon yetişkin (yetişkin nüfusunun % 36,8'i) ve dünya genelinde yüz milyonlarca insanı etkileyen en yaygın artrit şeklidir. OA için risk faktörleri çeşitlidir bunlar; obezite, cinsiyet, yaş, eklem ve akut eklem travmasında doğuştan yapısal anormallikleri gibi durumlardır. (Krishnan ve Grodzinsky, 2018). 2011 yılında, ABD'de OA'ya ilişkin toplam doğrudan sağlık harcaması 41,7 milyar dolardı (Chubinskaya ve ark., 2015; Menon ve Mishra, 2018).

En sık görülen eklem kıkırdak kusuru dejeneratif eklem hastalığı olan osteoartrit'tir (OA). Modern dünyamızda OA, yaşam kalitesini düşüren üçüncü hastalıktır ve önümüzdeki yıllarda artması beklenmektedir (Teichtahl ve ark., 2008). Eklemlerdeki sıvı eksikliği, otoimmünite (vücudun kendine saldırması), enfeksiyon veya birçok faktörün birleşiminden kaynaklanabilecek enflamatuvar bir hastalıktır. Artrit semptomları genel olarak eklem ağrısı, duyarlılık, sıcaklık, şişme, kızarıklık ve hareket güçlüğü gibi diğer komplikasyonlardır (Göl, 2015). OA'nın erkenden teşhisi de zordur çünkü en erken aşamalarda yer alan kıkırdak değişiklikleri, dokunun anevral doğası nedeniyle ağrıya neden olmaz. Bu nedenle, hastalar hastalık ilerleyene kadar semptomsuz kalabilir. Bundan dolayı önemli ve onarılamaz eklem hasarları meydana gelir (Bijlsma ve ark., 2011).



Şekil 2.5. Sağlam ve Artritli diz yapısı (<http-1>)

2.3.3. Eklem kıkırdığı onarımında uygulanan yöntemler

i. Abrazyon artroplastisi (subkondral kemiğe penetrasyon)

Günümüzde kullanılmayan bir yöntemdir. Belli aparatlar ile kanayan kemiğe kadar subkondral kemiğin traşlanması esasına dayanır. Bu yöntemde kemik iliği kaynaklı fibrin pıhtısı sayesinde tamir dokusu oluşur. Bu doku fibröz kıkırdak yapısındadır (Haberal, 2015).

ii. Drilleme

Bu yöntem yara debridmanı (Yaraların üzeri veya kenarındaki canlılığını kaybetmiş, kontamine ve yabancı maddelerin kaldırılması işlemine debridman denir) sonrası bir “Kirschner teli” ile delikler açılması esasına dayanmaktadır. Günümüzde bu yöntem yerine mikro kırık tedavisi uygulanmaktadır (Haberal, 2015).

iii. Mikro kırık

Steadman tarafından 1997’de bulunan bir yöntemdir. subkondral kemiğe penetrasyon yöntemi olarak bilinir. Bu teknik, mezenkimal kök hücrelerin kemik iliğinden kıkırdak hasarı bölgesine göçünü artırarak kusurlu bölgenin tedavisini amaçlamakla birlikte, sıklıkla biyokimyasal ve biyomekanik olarak hiyalin eklem

kıkırdığından daha zayıf olan fibrokartilaj oluşumu ile sonuçlanmaktadır. Bu yöntemle mikrofraktürde denmektedir (Çelik, 2018; Steadman ve ark., 2003).

iv. Osteokondral otolog transferi

Osteokondral otolog transferi (Osteochondral Autologous Transplantation; OAT) 1993'te ilk Bobic ve Matsusue ve ark. tarafından tanımlanmıştır. 1991 yılında hayvan deneylerine başlanmasıyla ilk adımlar atılmıştır. 1992 yılında standardize metodun geliştirilmesi ile klinik uygulamaya geçilmiş ve 1997'de bu sonuçlar yayınlanmaya başlamıştır. Küçük osteokondral greftlerin hasar içine dizildiği mozaikplasti yöntemi ise Bobic ile Hangody ve ark. tarafından 1996 yılında tanımlanmıştır (Bobić, 1996; Matsusue ve ark., 1993). Osteokondral greft tekniğinde hiyalin kıkırdak ve osteokondral birleşme kesin olarak mevcuttur. Graftlerin, hazır artiküler yüzey ile birlikte matris devamlılığını sağlayacak canlı kondrosit transfer etme avantajı vardır. Osteokondral otolog transferi tek seferde gerçekleştirilebilmekte ve anında farklılaşmış olgun hiyalin kıkırdak sağlamaktadır. Bunun yanı sıra greft alınan donör sahaların kısıtlı olmasından dolayı kullanım alanını küçük defektler ile sınırlandırmaktadır. Donör sahanın durumu konusunda kesin bir bilgi olmaması, greft ile transfer edilecek sahanın kıkırdak kalınlıkları arasındaki farkın önemi ve greftler arasındaki ölü boşluğun durumu, klinik engeller arasındadır (Bobic ve Noble, 2000; Yılmaz, 2010).

v. Otolog kondrosit implantasyonu (ACI)

Son yirmi yılda önem kazanan bir diğer yöntemdir. 2cm² "den küçük defektlerde ilk tercih mikro kırık tedavisi iken 2cm² "den büyük ve aktivite düzeyi yüksek olan hastalarda ilk tercih otolog kondrosit implantasyonudur.

ACI uygulanan hastalarda cerrah, kıkırdak hücreleri (kondrositler) dahil olmak üzere küçük kıkırdak parçalarının eklem ağrılı taşımayan bir bölgesinden toplandığı bir başlangıç prosedürü (artroskopi) gerçekleştirir. Kıkırdak parçaları, yeterli hücre sayısına (genellikle 5 ila 10 milyon hücre arasında) ulaşılması için hücrelerin izole edildiği ve kültürlendiği (çoğaltıldığı) bir laboratuvara 3-5 hafta boyunca çoğaltılması için gönderilir. Hasta daha sonra ikinci bir ameliyata alınır. Cerrah önce hasarlı bölgeyi hazırlar ve pürüzsüzleştirir, yamaya benzer bir zarla örter ve daha sonra zarın altına laboratuvarda yetiştirilen kondrositleri enjekte eder. Günümüzde, otolog kondrositlerin ameliyattan önce ekilebileceği yenilikçi biyomalzemelerin kullanılması da mümkündür ve bu hücre bazlı "iskele" kıkırdak lezyon bölgesine implante edilebilir. Hücreler daha

sonra eklem içinde büyür ve olgunlaşır ve hasarlı alanı yavaş yavaş canlı, sağlıklı kıkırdak ile değiştirir (ICRS “interterritorial cartilage regeneration and joint preservation society”).

ACI'nın temel avantajı, sadece fibröz kıkırdak ile sonuçlanan dokuyu tamir etmenin aksine, orijinal ile neredeyse aynı doku oluşturmak için kıkırdak rejenerasyonunu başarmaya yaklaşan ilk tedavi olmasıdır. ACI dezavantajları; ACI pahalı bir prosedürdür ve tedaviyi sağlayan, hastaların erişimine açan kurumların, bu tekniği kullanan hastalara sağlanan katkıyı ya da uzun vadede potansiyel ulusal ekonomik kazanımlara sağlanan faydayı göz ardı etmeleridir. Sonuç olarak, düzenleyici sistemler (sağlık kurumları), ACI'nın benimsenmesindeki en büyük engellerden biridir. ACI'nin bir başka dezavantajı, spora veya yoğun aktiviteye erken dönmek isteyenlerin, dokunun olgunlaşması için 9-12 ay tedavi süreciyle karşılaşmasıdır (Brittberg ve ark., 1994; Peterson ve ark., 2010).

vi. 3D Doku iskelesi bazlı tedaviler

Ex vivo çalışmalar, implantasyonlardaki başarılı kıkırdak rejenerasyonunun hem kondrosit proliferasyon düzeyine hem de hücre karakterinin korunması ve desteklenmesi için hücre iskelesi olarak görev yapan bir 3D matriks içindeki kök hücrelerin farklılaşma kapasitesine bağlı olduğunu göstermiştir. İkinci nesil ACI uygulamaların temelinde, kıkırdak hasar bölgesine kondrositlerin implantasyonu için iskele tabanlı yaklaşımlar ve bunların geliştirilmesi vardır. Kondrositler bir 3D ortamda kültür edildiklerinde, dediferansasyona daha az eğilimli olurlar ve bu nedenle hiyaline daha benzer bir kıkırdak yapısı oluşturulur. Matriks kaynaklı otolog kondrosit implantasyonu (MACI) klinik pratikte en sık kullanılan iskele hücre tabanlı kıkırdak onarımı tekniğidir. ACI'ye tedavisindeki gibi, MACI da iki cerrahi prosedür gerektirmektedir. Genel olarak, tüm çalışmalar MACI'nın, 2 yıl süresince yapılan takiplerinde ACI veya mikrofraktüre yöntemlerine göre üstün olmadığı, benzer sonuçlara sahip olduğunu göstermiştir (Çelik, 2018).

vii. İntra-artiküler enjeksiyonlar

Eklem ağrısı, dejeneratif kıkırdığın en önemli semptomudur. Ağrının geçici süreyle de olsa ağrının etkisinin ortadan kaldırılması hastanın yaşam kalitesini önemli ölçüde arttırmaktadır. Bundan dolayı diz boşluğuna uygulanan (intra-artiküler) kortikosteroid, hyaluronik asit ve türevleri vb. enjeksiyonlar, klinikte en sık kullanılan tedavilerdir ve hastaların ağrıların azaltılmasına operasyon öncesi veya sonrasında yardımcı olmaktadır. Bu tedavi yöntemi kalıcı tedaviye ek olarak yapılan bir uygulamadır (Ayhan ve ark. 2014). Yapılan bazı çalışmalarda uygulanan kortikosteroid türevi enjeksiyonların etkisinin kısa sürdüğünü ve gereksiz bulunduğu belirtilmektedir. Bunun dışında hyaluronik (HA) asit gibi viskozite artırıcı enjeksiyonlarda vardır. Sonuç olarak dünya üzerinde OA gibi dejeneratif kıkırdak kusurlarından muzdarip olan milyonlarca insan olduğundan dolayı tedaviler de maliyet-fayda ilişkisi gözetilmektedir.

viii. Platelet zengin plazma (PRP) tedavisi

Trombosit bakımından zengin plazma (PRP) yöntemi, hastadan alınan kanın santrifüj edilerek üretilen küçük bir plazma hacmindeki insan trombositlerinin otolog konsantrasyonudur. Trombositler alfa granüllerinde bir dizi büyüme faktörü ve arabulucu içerir. (Dönüştürücü büyüme faktörü [TGF] - β 1, trombosit kaynaklı büyüme faktörü, bazik fibroblast büyüme faktörü, vasküler endotel büyüme faktörü, epidermal büyüme faktörü, insülinlik büyüme faktörü [IGF] -1). Bunlar Santrifüjleme işlemi ile konsantre edilir ve daha sonra vücudun doğal iyileşme sürecini arttırmak için bir yaralanma bölgesine gönderilir. Normal insan trombosit sayısı 150.000 ila 350.000 / mL arasında değişmektedir. Kemik ve yumuşak doku iyileştirme özellikleri üzerine yapılan çalışmalar sonucu elde edilen gelişmeler 1.000.000 / mL'lik konsantredeki trombosit miktarı ideal bulunmuştur ve bu nedenle PRP'nin bir çalışma prosedürü olarak önerilen 5 mL'lik plazma hacmindeki bu trombosit konsantrasyonudur (Le ve ark., 2019; Stevens ve Khetarpal, 2018).

PRP tedavisinde kalsiyum klorür takviyesi ile belli bir aktivasyon oluşturulur. Bu aktivasyon platelet jeli oluşumunu, büyüme faktörleri ve biyoaktif moleküllerin salınımını tetiklemektedir. Böylece, trombositler yaralanan bölgeye geniş bir aralıkta büyüme faktörleri sağlayarak onarım mekanizmasına aktif olarak katılmaktadır. OA'lı (osteoartrit) hayvan modelleri üzerine yapılan deneysel çalışmalarda PRP'nin kondrosit apoptozu ve OA ilerlemesini inhibe ettiği ve eklem kıkırdaktaki proteoglikan düzeyini

arttırdığı gözlemlenmiştir. Ancak, birçok PRP tedavisi yaklaşımları mevcuttur. Ve etki mekanizmaları tam anlamıyla belirlenememiştir. Genç hastalarda ve hafif OA vakalarında daha umut vaat eden sonuçlar ortaya çıkmasının yanı sıra, artan PRP klinik uygulamalarına rağmen, tedavinin yüksek kalitede net bir iyileşme sağladığını destekleyen kanıtlar henüz yoktur (Çelik, 2018).

2.4.Kıkırdak Doku Mühendisliği

“Doku mühendisliği” terimi ilk olarak 1987 yılında Kaliforniya Üniversitesi’nden (San Diego) Dr. Y.C. Fung tarafından ABD Ulusal Bilim Vakfı’nın (NSF) bir toplantısında dile getirilmiş. Asıl doku mühendisliği yaklaşımı ise Massachusetts Teknoloji Enstitüsü’nden (MIT) kimya mühendisi Prof. Robert Langer ve Harvard Üniversitesi Tıp Fakültesi’nden cerrah Prof. James Vacanti’nin ortak çalışmaları sayesinde tanımlanmış ve 1990’ların başından beri bu konudaki bilimsel araştırmalar hız kazanmıştır (Gümüşdereioğlu, 2010).

Diz eklemlerinde artiküler kıkırdak rejenerasyonu için aşındırıcı kondroplasti, mikro kırık ve süngerleşme, doku veya kondrosit / kök hücre nakli gibi cerrahi prosedürler dahil olmak üzere farklı terapötik yaklaşımlar kullanılmıştır. Doku mühendisliği yaklaşımları, biyolojik bilimler, biyoteknoloji, kimya mühendisliği, malzeme bilimi, tıp vb. bilim dallarını içeren multidisipliner alanların kavram ve tekniklerini, *in vitro* dokuların yenilenmesi veya büyütülmesi için uygulayan geleneksel tedavilere alternatif olarak ortaya çıkmıştır (Dubey ve Deng, 2018). Kıkırdak doku mühendisliğinde amaç kusurlu bölgeye hücre göçünü sağlamak ve eski doku yapısını çeşitli biyomalzemeler yardımıyla kazandırmaktır.

Hastalıklı veya kusurlu dokuları tedavi etmek için üç ana terapötik doku mühendisliği stratejisi vardır.

- i. Taze izole edilmiş veya kültürlenmiş hücrelerin implantasyonu
- ii. Hücrelerden ve iskelelerden kombine edilmiş *in vitro* dokuların implantasyonu
- iii. *In situ* (yerinde) doku rejenerasyonu

2.4.1. İskele tasarımı ve biyomalzemeleri

Eklem kıkırdak mühendisliği için iskele biyobozunur, biyouyumlu, işlenmesi kolay, toksik olmamalı ve faktörlerin, besinlerin ve hücre göçünün değişimi için yeterince gözenekli olmalıdır. Ek olarak, diz eklemlerinde doku rejenerasyonu sırasında yüke

dayanabilmelidir. İskelenin bozulması, yük dağılımı ve neokartilaj oluşumu ile uyumlu olmalıdır. İskeleler, dokuya ev sahipliği yapmak için tasarlanmış kıkırdak asimilasyonunu katalize etmeli ve doğal hücrelerin kolonizasyonunu teşvik etmelidir (Coutts ve ark., 2001). Özellikle, FDA onaylı malzemelerin veya polimerin iskele amaçları için kullanılması gerekir. İskele biyomateryali olarak başlıca tercih edilen materyaller, esnek tasarımları ve özellikleri nedeniyle polimerlerdir. İskele polimerleri iki kısımda sınıflandırılabilir: doğal ve sentetik polimerler. Doğal polimerler; kollajen, jelatin (denatüre kollajen), hyaluronik asit, fibrin, kitosan, kitin, aljinat, ipek, selüloz ve nişasta gibi doğal olarak elde edilen polimerlerdir ve doğal dokuya benzeyen özelliklere sahiptirler. Kollajen, memeli, destek yapılarında bolca bulunan en yaygın kullanılan doğal malzemedir (Liao ve ark., 2008). Sentetik polimer olarak sıkça kullanılan Polilaktik asit (PLA), poliglikolik asit (PGA) gibi polihidroksi asit polimerleri ve bunların kopolimerleri polilaktikoglikolik asit (PLGA), FDA (US Food and Drug Administration) tarafından onaylanmış polimerlerdir. Bunlar 1990'lı yıllardan beri yüksek biyouyumluluk ve biyobozunurluklarından dolayı en sık kullanılan sentetik polimerlerdir (Chung ve Burdick, 2008).

2.4.2. Kıkırdak doku mühendisliği hücre kaynakları

Ksenojenik, otolog ve allojenik hücreler, kıkırdak dokusu mühendisliği için ana kaynaklardır. Bununla birlikte, ideal hücre kaynağı halen araştırılmaktadır. Bu hücre kaynakları, kök hücre (embriyonik veya yetişkin), primer hücreler veya hücre hatları gibi farklılaşmış hücreler olma özelliklerine göre sınıflandırılabilir. Kondrositler, mezenkimal kök hücreler ve fibroblastlar en çok çalışılan hücre tipleri arasındadır (Çalikoğlu, 2011).

2.4.3. Biyolojik uyarım

Kıkırdak dokusu mühendisliğinde kullanılan hücreler için, kıkırdak dokusu oluşumunu indüklemek ve arttırmak için uyarıcı faktörler gereklidir. Kültür ortamına eklenen büyüme ve farklılaşma faktörleri, belirli farklılaşma yollarını indükler ve kondrojenik fenotipin korunmasını sağlar. Bununla birlikte, bu faktörler, tüm kıkırdak iyileşme sürecinde kondrojenik fenotipi indüklemek ve korumak için yoğun bir şekilde tanımlanmalıdır (Chung ve Burdick, 2008).

Bazı biyosinyal moleküller ve özellikler;

- Kıkırdak doku mühendisliğinde en çok çalışılan biyoaktif molekül sınıflarından biri olan TGF- β hormon ailesinin, memelilerde 20'den fazla üyesi bulunmaktadır. TGF- β 1 kıkırdak spesifik proteinlerin sentezini ve hücre çoğalmasını desteklemektedir. Aynı zamanda kemotaksiyi ve enflamatuvar hücre aktivasyonunu destekler.
- Kemik morfogenetik proteinleri (BMP'ler), TGF protein ailesinin bir alt sınıfıdır. BMP-4,6 ve 7'nin, artmış kollajen tip II ve proteoglikan sentezi seviyeleri ile gösterilen kondrojenik farklılaşmayı indüklediği gösterilmiştir.
- İnsülin benzeri büyüme faktörü (IGF) familyası IGF-1 ve IGF-2 ligandlarını ve bunların reseptörlerini IGF1R ve IGF2R'yi ve ayrıca altı farklı IGF-bağlayıcı proteini içerir. Uzunluğu 70 aminoasit olan IGF-1, kıkırdak onarımı ile daha fazla ilgilidir. Kollajen tip II ve proteoglikanın sentezini artırır ve bu nedenle kondrojenik farklılaşmayı tetikler.
- Anabolik rolü olan fibroblast büyüme faktörünün (FGF) kıkırdak dokunun gelişimi ve onarımı için gereklidir. FGF'nin osteoartrit hastalarının dokularında mevcut olduğu bulundu. Ayrıca, FGF'nin proteoglikan ve kollajen tip II sentezini inhibe ettiği gösterilmiştir
- Vasküler endotel büyüme faktörü (VEGF), 23-kDa polipeptidi, büyüme plakası kıkırdağında mevcut kılcal büyümeye neden olan hormondur.
- Trombosit kaynaklı büyüme faktörü (PDGF) (30 kDa) ve epidermal büyüme faktörü (EGF) (1.6-kDa), eklem kıkırdak için diğer önemli biyoaktif moleküllerdir. EGF'nin, kollajen tip II ekspresyonunu azaltırken, kondrosit proliferasyonunu ve kısa vadede DNA sentezini teşvik ettiği bulundu. PDGF, kondrositler ve MSC'ler gibi mezenkim kökenli hücreler için mitojenik ve kemotaktiktir (Çalıköğlu, 2011).

2.4.4. Hidrojeller

Diğer umut vaat doku mühendisliği ürünü enjekte edilebilir hidrojellerdir. Bunlar sentetik veya doğal olabilirler. Hidrojeller, temel olarak kimyasal sinyaller ve çözülebilir faktörler için 3D destek ve geçirgen matris işlevi görür (Drury ve Mooney, 2003). Hidrojeller, hücreleri verimli bir şekilde hapseden, hücre büyümesi, besin maddelerinin

ve diğerk faktörlerin transferi için uygun bir ortam sağlayan bir yapıdır. 3D yapısına ulaşmak için kimyasal veya fiziksel olarak polimerize olurlar. Dokuları *in vivo* olarak yeniden oluşturmak için ve iskeleyi hedeflenen bölgeye yerleştirmek için uzun bir cerrahi süreç gerekir ancak hidrojel bu cerrahi karmaşıklığın üstesinden gelir. Hidrojeller, yüksek su içeriği nedeniyle diğerk biyomalzemelere kıyasla doğal dokuya daha yakın benzerlik gösterir. Polimerlerde bulunan hidrofilik gruplar, hidrojin su emme kapasitesini belirler, hidrojin çözünmeliğı, polimerik ağların çapraz bağlanmasından kaynaklanmaktadır. Hidrojellerin özellikleri, polimer bileşimi, ağ yapısı, bozuna bilirliliğı ve çapraz bağlama yoğunluğu gibi faktörlerin değıştirilmesiyle kontrol edilebilir ve değıştirilebilir. Hidrojellerin, ilaç dağıtımı, teşhis, biyomedikal implantlar ve doku mühendisliğı gibi uygulama alanları vardır (Yamaoka ve ark., 2006).

2.4.4.1. Doğal hidrojel

Kollajen

Kollajen doğal bir polimerdir ve iskele gelişimindeki rolü için geniş çapta çalışılmıştır. Kollajen tip I ve II, kırıkta rejenerasyonu için hidrojel iskelesini geliştirmek için yaygın olarak kullanılır. Kollajen hidrojel yüksek şişme oranına sahiptir ve hidrojelde kırıkta oluşumunu katalizler. Kollajen, kondrositler ile verimli bir şekilde etkileşime girer ve ECM üretimini teşvik eder (Yamaoka ve ark., 2006).

Agaroz

Agaroz, deniz yosunları tarafından sentezlenen doğal bir polimerdir ve doku mühendisliğinde keşfedilen en eski hidrojel biridir. Tersinir jel oluşturur ve hidrojen bağlanmasından dolayı jelleşme hızlıdır. Agaroz, dinamik yükleme ve tanımlanmış çevresel koşullar altında kırıkta sentezinde ve doğal kırıkta mekanik özelliklerini taklit ettiğı rapor edilmiştir (Mauck ve ark., 2000).

Hyalüronik asit

HA, β -D (1 $\rightarrow$ 3) glukuronik asit ve β -D (1 $\rightarrow$ 4) N-asetil- β -D-glukozamin birimlerinin disakarit alt birimlerinin doğrusal bir polimeridir (Drury ve Mooney, 2003). Sinovyal eklem sıvısında GAG'lar (Glikozaminoglikan) gibi oldukça yaygındır. Ve yara iyileşmesinde, ECM organizasyonunda ve hücre farklılaşmasında önemli rol oynar.

Kitosan

Doğrusal bir polimer olan kitosan, doğal GAG'lara yapısal benzerlik gösterir. Bu polimerin alt birimi, kitinden elde edilen 1, 4-bağlı D-glukozamin ve N-asetil-D-glukozamin kalıntılarıdır. Özellikle, kitosan, N-deasetilasyonundan türetilmiştir; ancak, deasetilasyon derecesi % 50 ile % 90 arasında değişmektedir (Lee ve ark., 2001). Kitosanın hidrojenleri, glutaraldehit, UV ışınlama ve termal değişim ile iyonik / kimyasal çapraz bağlanma kullanılarak sentezlenir. Kitosan ayrıca hücrel etkileşimleri arttırmak, doğal kıkırdak ile yapısal benzerliği arttırmak ve enjekte edilebilir hidrojenler hazırlamak için modifiye edilmiştir.

Fibrin

Fibrinojen, esas olarak hastanın kendi kanından izole edilen fibrin öncüsüdür; bu nedenle, konakçı bünyede immün reddedilme ihtimalini azaltır (Spiller ve ark. 2011). Fibrinojen, fibrin hidrojenlerini oluşturmak üzere trombin varlığında enzimatik olarak polimerleştirilir. Bu hidrojel, MSC'lerin kondrositlere farklılaşmasını ve kıkırdak oluşumunu teşvik eder. Bununla birlikte, bu hidrojel düşük mekanik özellikler gösterir.

2.4.4.2. Sentetik hidrojenler

Polivinil alkol

Polivinil alkol (PVA) hidrojenleri ile kıkırdak arasındaki yapısal benzerlik iyi bilinmektedir ve davranışı, moleküler ağırlık ve hidroliz seviyesi düzenlenerek kontrol edilmektedir. Bu hidrojenler kimyasal çapraz bağlama, tekrarlanan dondurma / çözme işlemi ve elektron veya gama ışımasıyla hazırlanır. Ancak bu hidrojenlerin en büyük dezavantajı fizyolojik ortamda biyolojik olarak parçalanabilirlik değildir, bu nedenle bu polimerler yalnızca kalıcı bir destek biyomateryali gerektiğinde kullanılır (Lee ve ark., 2001).

Polietilen glikol

PEG hidrojenler, kıkırdak sentezini tetiklemek için kondrositleri, MSC'leri ve ESC'leri hapsedmek için kullanılmıştır. Dahası, PEG hidrojenlerin kıkırdak oluşumunun özelliklerinin ve özelliklerinin etkilerini anlamak için modifiye edilmektedir (Dubey ve Deng, 2018).

Polipeptitler

Peptit hem hidrofobik hem de hidrofilik gruplar içerir. Ve su varlığında kendi kendine β - sheet formu oluşturur. Düşük konsantrasyonlarda (% 0,1-% 1), bu peptitler kendilerini stabil hidrojeller halinde birleştirir ve iskeleye spesifik ve benzersiz özellikler sunar ve hücrel farklılaşma oluşumunu teşvik eden ve mikrobiyal enfeksiyonların olasılığını azaltan hücrel etkileşimi teşvik eder. Bir seminer raporunda, kondrosit içeren peptit hidrojelin, kırık matris sentezini teşvik ettiği bildirildi (Dubey ve Deng, 2018).

2.4.5. Eklem kırıkdağı onarımı için kırık doku mühendisliğinde kullanılan malzemeler

2.4.5.1.Aljinat

Aljinat, deniz yosunu türevi bir anyonik polisakarittir. Na-Alg kontrollü ilaç dağıtım sistemleri ve tıpta hücre dışı matris malzemesi olarak kullanılmıştır. Aljinatlar (polisakaritler) hemo-uyumludurlar ve insan vücudunun organlarında birikmezler (Kulkarni ve ark., 1999).

Aljinat toksik değildir, böylece canlılıklarını koruyarak hücreler kapsüllenebilir. Aljinat, polielektrolitlerin kalsiyum gibi çok değerliğe sahip karşı iyonlarla iyonik çapraz bağlanması yoluyla iyonik ağ oluşumu ile küresel jel boncuklar oluşturabilir. Ayrıca, birçok çalışmada, çok değerlikli katyonların varlığında çapraz bağlanmış alginat mikro küreleri, biyouyumluluk, yüksek kapsülleme verimliliği ve yumuşak üretim koşulları gibi avantajları nedeniyle, büyüme faktörlerinin kontrollü bir şekilde verilmesi için yaygın olarak kullanılmıştır (Goh ve ark., 2012).

2.4.5.2.Serisin

İpek iki çeşit proteinden oluşur; fibroin ve serisin. Serisin, ipek böceği kozalarından (*Bombyx mori*) elde edilen ve toplam koza ağırlığının % 20-30'unu içeren bir ipek proteindir. % 32'si serin olan 18 amino asitten oluşan oldukça hidrofilik bir proteindir. İpek serisin doku yenilenmesinde biyo materyal olarak başarıyla kullanılmıştır (Göl, 2015). Serisin yüksek nem emiciliğine, antioksidan ve dolayısıyla antitümör aktivitesinin yanı sıra yara iyileştirme kapasitesine sahiptir. Serisin *in vitro* çalışmasının birinde serisinin, lipid peroksidasyonunu baskıladığı ve tirozinaz inhibe edici aktiviteye sahip olduğu da gösterilmiştir. Ek olarak, kolon kanseri tedavilerine fayda sağlayabileceği öne

sürüldü. Ayrıca, serisin özellikleri, çapraz bağlama, kopolimerizasyon ve diğer polimerlerle harmanlama gibi modifikasyonlar uygulanarak geliştirilebilir.

2.4.5.3.Kondroitin Sülfat

Glikozaminoglikanlar (GAG'ler) eklemlerin yağlama sıvısında ve kıkırdak, kemik ve kalp kapakçıklarının bileşenleri olarak bulunur. Ayrıca, GAG'ler pratik olarak immünojenik değildir ve toksik olmayan oligosakaritlere indirgenir. CS (Kondrin sülfat), 4- veya 6- pozisyonlarda sülfatlanmış D-glukuronik asit ve N-asetilgalaktozamin tekrarlayan disakarit birimlerini içerir (Pieper ve ark., 1999).

Suda yüksek çözünürlük, kondroitin sülfatın önemli bir özelliğidir. Klinik çalışmalarda, CS osteoartrit (OA) tedavisinde kullanılmaktadır. OA için CS tedavisinin faydaları, interlökin-1 gibi enflamatuar sitokinleri hafifleten ve kıkırdak matrisinin bozulmasının önlenmesini azaltan, kıkırdak hücre dışı matris üretimini teşvik eden üç ana mekanizmada listelenebilir (Lian-Xia ve ark., 2011).

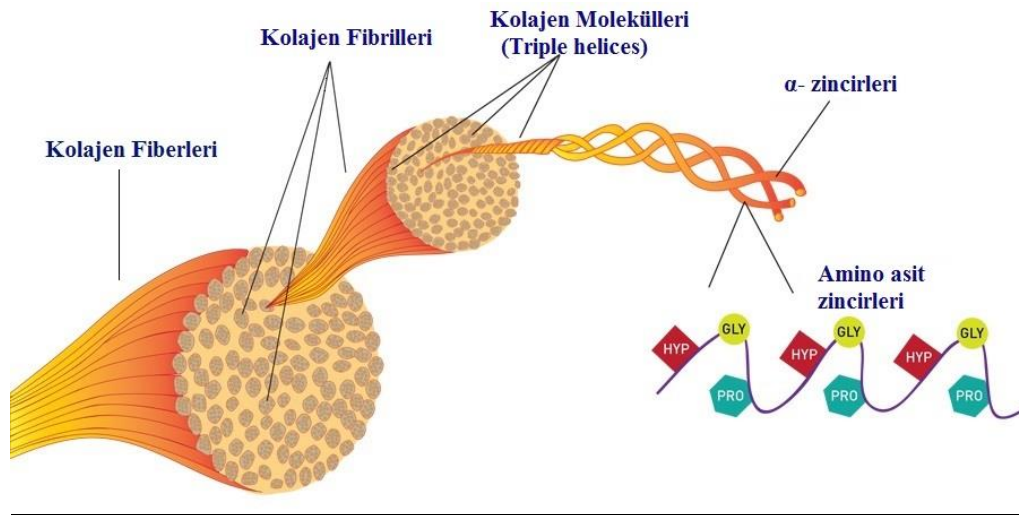
CS, kıkırdak dokusu mühendisliği için en güçlü prokondrojenik faktörler olarak gösterilmiştir. Bassleer ve ark. kondroitin sülfatın aynı zamanda insan kondrositlerinin matris bileşen üretimini artırabildiğini gösterdi. Bununla birlikte, CS genellikle uygulamasını bir katı hal dağıtım sistemi ve çapraz bağlanma işlemi ile sınırlandırır, ancak diğer polimerlerle birleştirebilir. CS negatif yüklüdür ve polimerler veya büyüme faktörleri gibi pozitif yüklü moleküller ile etkileşime girer. Anti-pıhtılaştırıcı, antitümör, anti-artrit ve anti-HIV aktiviteleri gösterebilir (Bassleer ve ark., 1998). Ateroskleroz, anjina, miyokard enfarktüsü, hiperlipidemi ve hiperkolesteroleminin tedavisinde kan lipitlerini düşürme aktivitesinden dolayı kullanılmıştır.

2.5.Denizanası Kollajeni

2.5.1. Kollajen yapısı

Yaklaşık 700 milyon yıl önce, kollajen yeryüzündeki hayvan krallığının en eski metazoalarında, süngerlerinde ortaya çıkmış ve daha sonra denizanası, mercan ve deniz anemonları gibi diğer omurgasızlarda da bulunmuştur (Huxley-Jones ve ark., 2007). Kollajen, omurgalıların ana yapısında en bol miktarda bulunan proteindir. Toplam vücut proteinlerinin yaklaşık % 20 ile % 30'unu oluşturur (Harkness, 1961). Özellikle, tendonların, bağların, korneanın ve kemiğin organik bileşenlerinin çoğunu oluşturur. Ayrıca cilt, kan damarları ve insan vücudundaki çoğu hücre dışı dokularda da bulunur.

Kollajenler, 50'den fazla çeşidi olan geniş bir protein ailesinden oluşur ve bu proteinler, fibril yapıdan küresel yapılara kadar çok çeşitli formlarda bulunur. Kollajenlerin ayırt edici özelliği, X ve Y'nin herhangi bir amino asit olabileceği bir üçlü amino asit (Gly-X-Y) dizisine dayanan tekrarlayan bir dizidir (Wagermaier ve Fratzl, 2012). Fibril oluşturan kollajenler (tip I, II, III, V ve XI), toplam kollajen içeriğinin yaklaşık % 90'ını oluşturur. Fibril oluşturan kollajende, aynı zamanda tropokollajen olarak da bilinen ayrı ayrı üçlü sarmallar (triple helice), kollajen fiberi oluşturmak üzere aglomere olan fibrillere birleştirilir (şekil 2.6). Bunun yanı sıra, hepsinin en küçük amino asidi olan glisin, helezonun içine yerleşirken, diğer iki kalıntı, yüzeyde açığa çıkarılır ve molekülün işlevselliğini büyük ölçüde bu belirler (Sheehy ve ark., 2018). X pozisyonu genellikle prolin (Pro) tarafından kullanılırken, Y pozisyonu genellikle hidroksiprolin (Hyp) tarafından kullanılır. Amino asit hidroksiprolinin (Hyp), kollajen üçlü-sarmal yapı ile benzersiz bir şekilde ilişkili olduğu ve bu yapının stabilize edilmesinde rol oynadığı bilinmektedir. Örneğin hem ilkel hem de daha yüksek türlerden gelen kollajen kompozisyon verileri, Hyp içeriği ile hem çevresel hem de kollajen erime sıcaklıkları arasında bir korelasyon olduğunu gösterir (De Wolf, 2003).



Şekil 2.6. Kollajenin genel yapısı (<http-3>, modifiye)

Hücre dışı matristeki kollajenin rolü, gerilme mukavemeti sağlamak, hücre yapışmasını düzenlemek ve doğrudan doku gelişimidir (Frantz ve ark., 2010). Bu nedenle doku mühendisliği çalışmalarından büyük öneme sahiptir. Gerçekten de kollajen,

kıkırdak doku mühendisliği alanında, biyolojik olarak kolay parçalanması, biyoyuumluluğu, düşük immünojenikliği ve hücre-yapışma özellikleri nedeniyle en çok kullanılan malzemelerden biridir. Bununla birlikte, kollajen tip II, hiyalin kıkırdak dokusunun ana temsil edilen kollajenidir ve son zamanlarda memeli olmayan yeni bir kollajen kaynağı olan denizanası kollajeni ortaya çıkmıştır. Memelilerde en çok tip I kollajeni bulunur dolayısıyla bu yeni kollajen kaynağı tip II kollajenine kolay erişim imkânı sunmaktadır. Ayrıca enfeksiyon riskleri (sığır spongiform ensefalopati), artrit sorununun iltihapla başlaması veya dini nedenlerden dolayı diğer kollajen kaynaklarına (sığır, domuz) nazaran denizanası kollajeninin daha çok tercih edilmesi ön görülmektedir (Pugliano ve ark., 2017).

2.5.2. Denizanası ve kollajeni

Denizanası, hayvanlar alemindeki en eski dallanma soylarından birinin, cnidarians'ın yaklaşık bir milyar yıl önce ortaya çıkan üyeleridir (Lesku ve Ly, 2017). Yüzyıllar boyunca, sıradan gözlemciler ve aynı zamanda bilim insanları, bazı organizmaların kendi kendini tamir etme konusunda mucizevi kapasitelerini belirlediler. 1740 yılında, doğa bilimci Abbé Trembley, az bilinen tatlı su polipleri, hidra üzerinde bir dizi amputasyon deneyi yaptı ve rejenere edildiğini izlemiştir. Bu süreçte, bizim yaptığımız gibi, organizmalara zarar vererek ve nasıl iyileştiklerini görerek çalıştı. Gözlemleri ve çağdaş görüşleri, fitili ateşledi ve yeni bir alan doğdu. O zamandan beri, birçok bilim insanı, kayda değer ilerleme sunan birkaç model organizmada rejenerasyon mekanizmalarını anlamaya odaklanmıştır. Son dönemdeki çalışmalar, denizanasının bu alanda ki önemini göstermektedir (Abrams ve Goentoro, 2016).

Denizaneleri poliplerden daha karmaşık yapıda olan, ilgi çekici canlılardır. Mercan ya da anemonların akrabası sayılabilecek denizaneleri, onlarla aynı türe ait olmasa da daha farklı özellikler barındıran bir oluşumdur. Vücut şekilleri genelde yayvandır ve şemsiye biçiminde olan organları sayesinde yüzmeleri kolaylaşır. Bir diğer ismi ‘medüz’ olan denizaneleri, omurgasız canlılardır Denizanelerinin beyinleri olmasa da sinir sistemleri iyi bir şekilde gelişmiştir. Işığa ve kokuya karşı oldukça duyarlıdırlar. Yapısal olarak hidrodinamik bir vücuda sahip olmadıkları için hareketleri yavaştır. Denizanası aslında hidralar ve ahtapotlarla aynı aileden gibidir. Kendisinden daha basit olan

hidrallarla, çok daha karmaşık bir yapıda olan ahtapotların ortasında kalan bir ara tür gibidir (Lesku ve Ly, 2017).

Denizanasının % 95'i su, % 4'ü protein, % 1'i de tuzdan oluşmaktadır. Bu protein kaynağı nedeniyle Asya'da milyon dolarlık deniz ürünleri ticaretinin ana ürünlerinin başında gelir. Son yıllarda ülkemizde yeni başlanmasına karşın; denizanası avcılığı Hindistan, Kuzeybatı Pasifik Okyanusunda yapılmakta ve avlanan denizaneları Asya ülkelerine ihraç edilmektedir. Günümüzde Japonya denizanası tüketilen ülkeler arasında ilk sırada yerini almaktadır. Denizanası ürünlerinin büyük bir kısmı Japonya'ya ihraç edilmekte ve bunu Singapur, Çin ve Tayvan izlemektedir (Duyar ve Sönmez, 2006). Bunun dışında bir diğer kullanım alanı ise bazı denizanelarında görülen biyoluminesans sağlayan GFP proteindir. Sekonder proteinlerden GFP, denizsel organizmalardan izole edilen ve ışık oluşturan bir proteindir. Bu protein, aequorin ya da lusiferaz gibi primer proteinlerden aldığı mavi ışığı, dalga boyu daha kısa olan ve daha uzak mesafelere ulaşan yeşil floresans ışığa dönüştürmektedir. GFP ile diğer canlılar üzerinde *in vivo*'da gözlenemeyen birçok olay ortaya çıkartılmıştır. Son yıllarda GFP transgenik bitki ve hayvanlara gen aktarımında marker olarak da kullanılmaktadır (Taşer, 2017).

Tüm bunların dışında denizanasının son yıllarda keşfedilmiş yeni kullanım alanı doku mühendisliğidir. Denizanası içeriğindeki protein olan kollajen doku rejenerasyonu için önemli bir biyometaryaldır. Denizanası kollajeninin diğer kollajen kaynaklarından (Sığır, domuz) çok daha avantajlı bir özelliği vardır. Memeli kökenli kollajen kaynakları genelde tip I kollajeni ihtiva eder. Ancak denizanasında durum farklıdır içerisindeki kollajen tip I ile tip III arasında tanımlanmaktadır. Denizanası en eski keşfedilen metazoa fosillerindendir. Bu ilkel canlılar evrimsel süreç içerisinde çok fazla değişime uğramadan günümüze kadar ulaşmayı başarmışlardır. Bundan dolayı içerisindeki kollajen gerekli durumlarda farklı tip kollajen türlerine yakınlık sağlayarak rejenerasyona katkı sunar.

2.5.2.1. *Rhizostoma pulmo* (Deniz ciğeri denizanası)

Türkiye sularında bilinen yaklaşık 8 tür denizanası mevcuttur. Bu çalışmada denizlerde sık rastladığımız *R.pulmo* cinsi denizanasından elde edilen kollajen tercih edilmiştir. *Rhizostoma pulmo* mavi- beyaz arası kenarları tenteküllü bir şemsiye şekline sahiptir (şekil2.7). Büyüklükleri 50 cm'e kadar çıkabilmektedir (Özbalçılar, 2012). *R.pulmo* Akdeniz kıyılarında sıklıkla rastlanan bir türdür. *R.pulmo* orta derecede zehirli

olmasına karşın insanlar için zararsız kabul edilmektedir. Tüm denizanaları gibi *R.pulmo* da yüksek derecede rejenerasyon özelliğine sahiptir (Kantarcıoğlu, 2017).



Şekil 2.7. *R.pulmo* ([http-4](#), [http-5](#))

Tablo 2.2. *R.pulmo* sınıflandırması

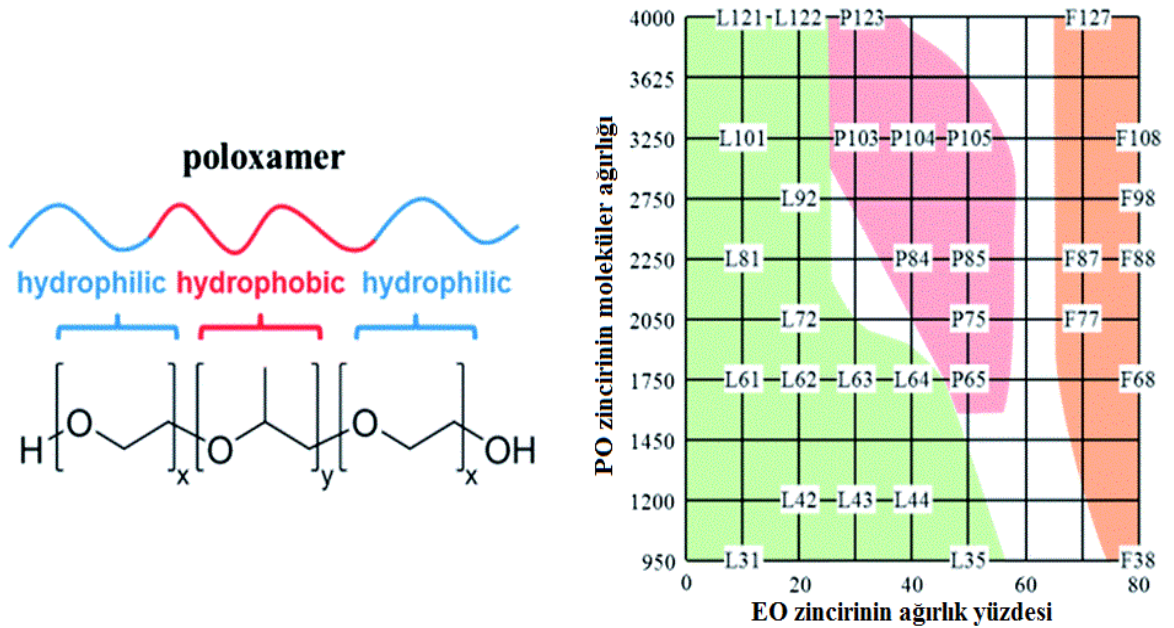
Alem	<i>Animalia</i>
Alt alem	<i>Metazoa</i>
Bölüm	<i>Radiata</i>
Şube	<i>Cnidaria</i>
Sınıf	<i>Scyphozoa</i>
Takım	<i>Rhizostomeae</i>
Aile	<i>Rhizostomea</i>
Cins	<i>Rhizostoma</i>
Tür	<i>Rhizostoma Pulmo</i>

1970'lerden 1980'lere kadar, akademisyenler ve ticari araştırmacılar, mükemmel biyoyoumluluklarından dolayı kollajeni çeşitli bağ dokusu uygulamalarında biyomateryal olarak kullanmaya başlamışlardır. Kollajenin düşük antijenite, yüksek biyobozunurluk, iyi mekanik, hemostatik ve hücre bağlama özellikleri mevcuttur. Bu gelişmelerden beri, biyokimyasal uygulamalarda kollajen kullanımı hızla artmış ve polimer yapı iskeleleri de dahil olmak üzere birçok biyomühendislik alanına yayılmıştır. Endüstriyel olarak, başlıca kollajen kaynakları dana derileri ve kemiklerdir. Sığır kaynaklı kollajen, sığır süngerimsi ensefalopati (BSE) ve bulaşıcı süngerimsi ensefalopati (TSE) riski taşıdığı için komplikasyonlar sunar. Sığır kökenli olmayan bir kaynaktan gelen alternatif, daha güvenli bir kollajene ihtiyaç duyulmuştur. Alternatif olarak, domuz kollajeni dini sebeplerden dolayı bazı ülkelerde tercih edilmemektedir ayrıca immünite sorunları çıkarmaktadır, bir diğeri çok daha güvenli, sudaki yaşamdan gelen kollajendir (Song ve ark., 2006). Denizanası kollajeni bu kollajen kaynaklarının başında gelir, önemli miktarda protein izole edilebilirse, potansiyel olarak önemli bir kollajen kaynağıdır. Tablo 2.2 de gösterildiği gibi denizanası kökeni metazoolara dayanmaktadır. Paleontolojik kayıtlar denizanalarının 650 milyon yıldan bu yana Dünya’da yaşadığını (ki bu dinozorlardan çok daha öncesine giden bir tarih) gösteriyor. Evrimsel süreç dikkate alındığında denizanasının yapısını milyonlarca yıl koruyup gelmesi yapısındaki kollajenin de bulabileceğimiz en saf kollajen kaynağı olduğunu gösterir. Nitekim İngiliz bilim insanlarına göre denizanası içerisindeki kollajen çeşidi birçok tip kollajen yapısına uygunluk ve adaptasyon sağladığı öne sürülmektedir. Yani denizanası kollajeni aynı anda hem cilt rejenerasyonu hemde kırık onarımında kullanılabılır.

2.6. Pluronic F-127

Pluronic blok kopolimerleri “poloksamerler” adıyla da bilinir, temel bir A – B – A yapısında düzenlenmiş etilen oksit (EO) ve propilen oksit (PO) bloklarından ($EO_x - PO_y - EO_x$) oluşur (Jung ve ark., 2017). Bu düzenleme, hidrofilik EO (x) ve hidrofobik PO (y) birimlerinin değiştirilebileceği bir amfifilik kopolimerle sonuçlanır (Şekil 2.8). Çeşitli x ve y değerlerine sahip kopolimerler, farklı hidrofilik-lipofilik dengesi (HLB) ile karakterize edilir (Kabanov ve ark., 2002).

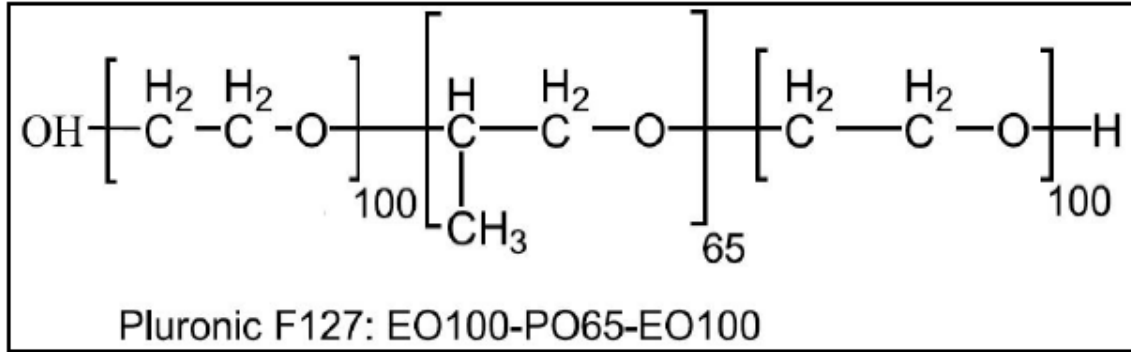
PEO (Poli etilen oksit) birimleri daha hidrofilikken, PPO (Poli propilen oksit) birimleri daha hidrofobiktir. Bu farklılığa bağlı olarak, sulu bir ortamda, Pluronic miseller halinde kendiliğinden birleşir ve sıcaklık ve / veya konsantrasyonun artırılması üzerine miseller, üç boyutlu bir hidrojel ağı halinde düzenlenir (Pelegriño ve ark., 2018). Pluronic blok kopolimerleri, PO ve EO monomerlerinin, sodyum veya potasyum hidroksit gibi bir alkalın katalizör varlığında ardışık olarak eklenmesiyle sentezlenir (Schmolka, 1977).



Şekil 2.8. Pluronic® triblok kopolimeri (solda) ve grafikteki renkler ortam koşullarında kopolimerlerin fiziksel durumunu gösterir: yeşil = sıvı; kırmızı = macun kıvamı; turuncu = yarı katı (Pitto-Barry, A., & Barry, N. P. 2014)

Piyasada PEO ve PPO oranına göre birçok tipte Pluronic çeşidi vardır. Bilimsel çalışmalarda bunlardan en çok başvuralan Pluronic türevidir olan P F-127’dir (şekil 2.9). Pluronic F-127 jeller, düşük toksisite, ters termal jelasyon, yüksek ilaç yükleme kabiliyeti

ve fizyolojik şartlarda nispeten düşük konsantrasyonlarda jelleşme kabiliyeti sayesinde literatürde hücre ve ilaç taşıyıcıları olarak geniş çapta araştırılmıştır (Gioffredi ve ark., 2016).



Şekil 2.9. P F-127 Formülasyonu

Pluronic F-127 (Poloxamer 407, P F-127) 'nin iyileştirici özelliklere sahip olduğu gösterilmiştir. P F-127 termo geri dönüşümlü bir jeldir. P F-127'nin % 20-30'luk (w / w) sulu çözeltileri ters termal jelasyonun ilginç karakteristiğine sahiptir (Kant ve ark., 2014). P F-127, iyi bir çözünme kapasitesi, düşük toksisite sergiler ve bu nedenle proteinler veya doku mühendisliği de dahil olmak üzere çok çeşitli sistemler için iyi bir ortam olarak kabul edilir. P F-127 sulu çözeltisi, soğutulmuş sıcaklıklarda (4-5 ° C) sıvıdır ve ağırlıkça %14'ten (w/w) yüksek bir konsantrasyonda ve 30 °C'lik bir sıcaklıkta bir sol-jel geçişine uğrar, bu da vücuda sıvı olarak enjekte edilebileceği anlamına gelir (Abbas ve ark., 2016). Tablo 2.3'te P F-127'nin fizikokimyasal özellikleri gösterilmiştir (Mercan, 2011).

Tablo 2.3. P F-127 fizikokimyasal özelliği

Kopolimer	MW	Ortalama EO birimi sayısı	Ortalama PO birimi sayısı	HLB	CMC
P F-127	12600	200,45	65,17	22	2,8.10 ⁻⁶
MW: Molekül ağırlığı (dalton), HLB: Hidrofilik-Lipofilik dengesi CMC: Kritik misel konsantrasyonu (M)					

2.7. In Situ Jel Sistemleri

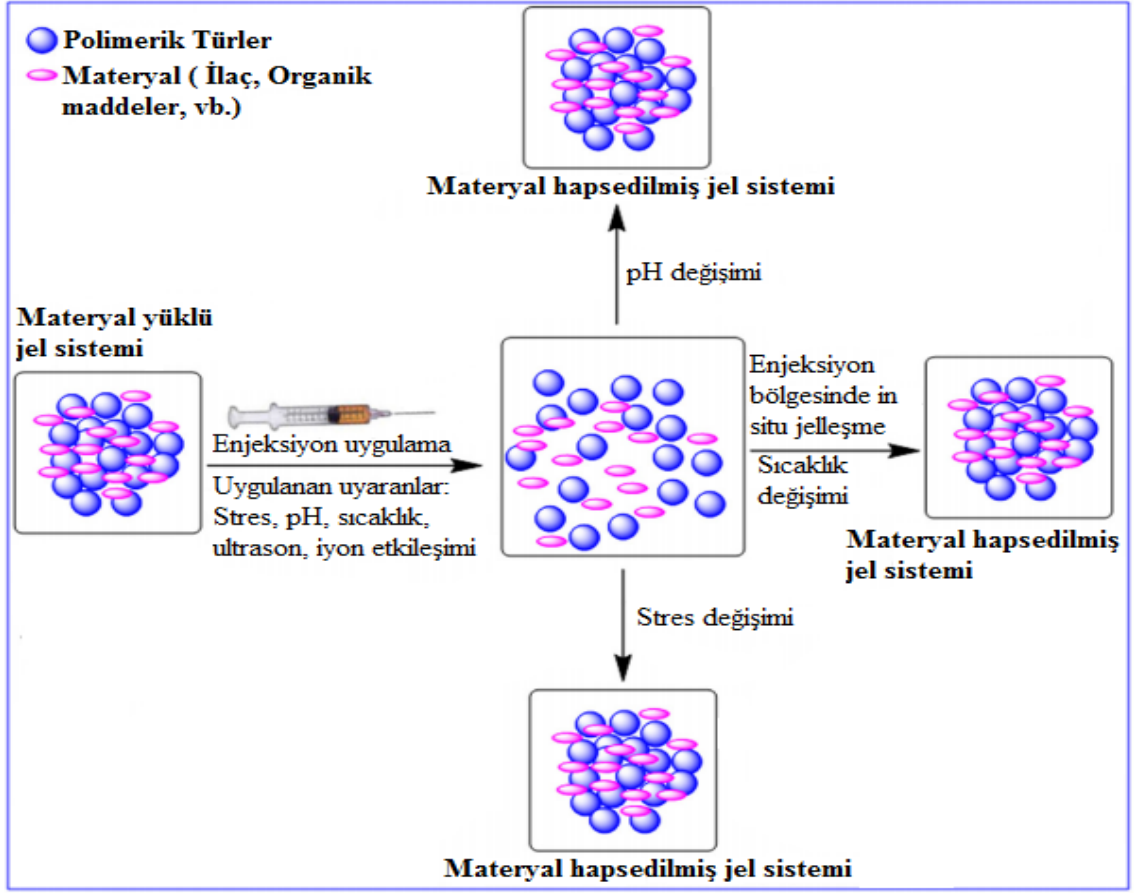
Jeller, uygun hidrofilik veya hidrofobik taşıyıcı içerisinde bulunan bir veya birden fazla etkin maddenin dispersiyonu veya çözeltisinden oluşan yarı katı preparatlar olarak tanımlanabilir. Bu preparatların oluşturulması için uygun bir jel yapıcı ajanın yardımına ihtiyaç vardır. Jeller homojen yapıdadır (AYDINLI, 1995). Üç boyutlu ağ yapısında olan hidrojeller ise yüksek molekül ağırlıklı, hidrofilik ve çapraz bağlı polimerler ya da

kopolimerlerden oluşur. Hidrojellerin kullanım alanına göre 2 farklı türevi mevcuttur. Bunlar kullanıma hazır hidrojeller ve in-sitü oluşan jellerdir (Başaran, 2008). Kullanıma hazır sunulan hidrojeller uygulandıkları zaman herhangi bir modifikasyona uğramazlar. Ancak in-sitü jeller ise çeşitli parametrelerin (sıcaklık, pH, vb.) etkisiyle fiziksel değişime uğrar.

In sitü aktivasyonla jel oluşturan sistemler, sıvı çözelti olarak uygulanan ve fizyolojik koşullara maruz kaldığında jel hale geçen viskoz sıvılar olarak tanımlanır (Nanjawade ve ark., 2007). Son yıllarda hücre enkapsülasyonu, ilaç taşıyıcı sistemleri, doku mühendisliği ve çeşitli biyomedikal uygulamalarda in-sitü jel sistemleri ile ilgili birçok çalışma yapılmıştır. Bu *in sitü* sistemler doku, organ veya vücut boşluğu içerisine jelleşmeden önce verilen enjekte edilen sıvılardır (Özer, 2018).

2.7.1. *In situ* jel sisteminin avantajları

- Uygulanacak vücut bölgesine göre istenilen viskozitede, farklı derişimler de hazırlanabilir.
- *In sitü* jel sistemleri hastada belli dozajlara kadar immün yanıt oluşturmazlar.
- Kontrollü salım sağlar.
- Uygulamaya hazır jeller ile kıyaslandığı zaman tekrarlanabilir uygulamaya sahip ve geri dönüşümlü olması en büyük avantajıdır.
- Kolayca enjekte edilebilir.
- Genelde biyobozunur olduğu için çıkarılmaya veya müdahaleye ihtiyaç yoktur.
- Birlikte verildiği veya en kapsüle ettiği malzemenin biyoyararlanımını artırır, etki süresini uzatır.
- Biyouyumludurlar.



Şekil 2.10. *In situ* jel sistemi (Raval J. P. ve Ark., 2018)

2.7.2. *In situ* jel oluşum mekanizmaları

In situ jel sistemleri sıcaklık, pH, iyon dengesi gibi çeşitli etkilerle faz değiştirerek jel formuna geçerler ve viskoziteleri artar. Bu etki mekanizmaları kullanılan polimere göre değişiklik göstermektedir. Çeşitli amaçlar için geliştirmek üzere farklı mekanizmalarla sol-jel faz geçişine sahip çeşitli polimerler incelenerek birçok *in situ* jel geliştirilmiştir.

2.7.2.1. Sıcaklık değişimi ile jelleşen sistemler

Sıcaklığa duyarlı in-situ jel, en eski, en kapsamlı çalışılmış ve yaygın tipte uyarana duyarlı jeldir. Düşük kritik çözelti sıcaklığının (LCST) altında bir sıvı halinde bulunan sıcaklığa duyarlı polimer içeren çözelti çevre sıcaklığı LCST'ye ulaştığında veya üstüne çıktığında jelleşmeye maruz kalır (Wu ve ark., 2018). Sıcaklığa duyarlı polimerlere örnek olarak Pluronic®, Tetronic®, Poloxamer®, etil (hidroksi etil) selüloz, HPMC (Hidroksi propil metil selüloz), poli(*N*-izopropilakrilamit) ve ksiloglukan verilebilir. Sıcaklık

değişimiyle faz geçiş mekanizmasına Pluronik çözeltisi sıkça kullanılan malzemedir. Polimer zincirlerinin hidrofobik bölgeleri etrafındaki su moleküllerinin düzeni sıcaklığın artmasıyla beraber düzensiz hale gelir. Bundan dolayı karşılıklı olarak hidrofobik bölgeler bağ oluşturmak üzere birbirini çekerler, Bunun yanı sıra hidrofilik bölgeler sulu ortamla temaslarını artırmak üzere tekrar düzene girerler. Polimer konsantrasyonuna bağlı olarak sıcaklık LCST'nin üzerindeyse, tri-blok kopolimer miseller oluşur. Sıvı miseller faz, düşük sıcaklıklarda stabildir, fakat sıcaklığın artması ile kübik yapıya dönüşür ve daha yüksek sıcaklıklarda heksagonal silindir fazı oluşur (Escobar-Chávez ve ark., 2006). Sonuç olarak oluşan yapı daha viskoz jel yapısı gösteren, sıcaklık arttıkça sayı ve boyutu büyümeye devam eden misellerdir.

2.7.2.2. pH duyarlı jelleşen sistemler

In situ jelin başka bir oluşum mekanizması ise pH ile indüklenmesiyle jel oluşumudur. Böyle bir sistemde pH'a duyarlı polimerler protonları kabul eden veya serbest bırakan asidik veya bazik grup içerir. Çevresel pH değişimine yanıt olarak polimer zayıf asidik (anyonik) içeriğe sahipse ortamın pH değeri arttıkça hidrojel şişmesi artar ancak zayıf bazik (katyonik) içeriğe sahipse şişme azalır. Bu tür polimerlere örnek olarak selüloz asetofitalat lateks, Carbopol© verilebilir (HB ver ark., 2010).

2.7.2.3. İyon etkisiyle jelleşen sistemler

Polimerler bazı iyonların etkisiyle faz geçişine uğrar vücut sıvıları içerisinde bulunan Na^+ (sodyum), Ca^{+2} (kalsiyum), Mg^{+2} (magnezyum), K^+ (potasyum) iyonları bu faz geçişini sağlar. Bazı polisakkaritler iyonların değerliğine göre jel oluşturur. Örneğin; k-karajenan düşük ölçekte K^+ varlığında sert ve kırlgan jel meydana getirirken, i-karajenan Ca^{+2} varlığında esnek jel oluşturur. Gellan sakızı (Gelrite®) ve aljinat bu tür polimerlere örnek olarak verilebilir (Özer, 2018; Almeida ve ark., 2014).

3. MATERYAL

3.1. Kullanılan Maddeler

Agaroz	Prona	İspanya
Akrilamit/Bisakrilamit (% 30, 29:1)	Applichem	Almanya
Amonyum persülfat (% 99)	Applichem	Almanya
Denizanası kollajeni	Y. E. Arslan	Çanakkale
DMSO (Dimetilsülfoksit)	Applichem	Almanya
DMEM (Dulbecco's Modified Eagle Medium)	Biological Ind.	İsrail
EDTA (Etilen Diamin Tetraasetik Asit)	Sigma-Aldrich	Almanya
Etidyum bromür	Amresco	Amerika
Fötal sığır serumu (FBS)	Sigma-Aldrich	Almanya
Glisin	Merck	Almanya
İzopropanol	Merck	Almanya
Kitosan (Düşük ve orta yoğunluklu)	Sigma-Aldrich	Almanya
Kitosan (Yüksek yoğunluklu)	Fluka	Japonya
MTT boyası	Applichem	Almanya
P-F127 (Pluronic® F127)	Sigma-Aldrich	Almanya
SDS (Sodyum Dodesil Sülfat)	Merck	Almanya
TEMED (Tetrametiletildiamin)	Applichem	Almanya
Trizma baz	Sigma-Aldrich	Almanya
Tripsin/EDTA	Biological Ind.	İsrail
Yükleme tamponu (Laemli tampon)	Sigma-Aldrich	Almanya

3.2.Kullanılan Cihazlar

Buz makinesi	ITV	Amerika
CO ₂ 'li etüv	Binder	Almanya
Çoklu manyetik karıştırıcı	IKA	Almanya
Dikey elektroforez	UVP	İngiltere
Disolüsyon cihazı	Pharma Test PTWS 820D	Almanya
Distile su cihazı	Millipore	Amerika
Dondurucu (-20)	Liebher Medline	Almanya
Hassas terazi	Mettler Toledo	Amerika
İnkübatör	NBSC	Kanada
İnvert mikroskop	Leica DMIL	Almanya
Jel dokümantasyon cihazı	UVITEC (Cambrige)	İngiltere
Laminar akış kabini	KojAir	Finlandiya
Liyofilizatör	SCANVAC (coolsafe)	Danimarka
Manyetik karıştırıcı	Stuart	İngiltere
Mikrosantrifüj	Eppendorf	Almanya
Orbital çalkalayıcı	Stuart	İngiltere
Otoklav	Hirayama	Japonya
Otomatik mikropipetler	Eppendorf	Almanya
Plaka Okuyucu	BioTek	Amerika
pH metre	Mettler Toledo	Amerika
Reometre	Brookfield	Amerika
Rotavapor	Buchi (R-205)	İsviçre
Soğutucu (+4)	Liebher Medline	Almanya
Taramalı elektron mikroskopu (Masaüstün SEM)	HITACHI TM 3030 plus masaüstü SEM	Japonya
Termometre	Ebro	Almanya
Ultrasonik Banyo	Elma	Almanya
UV spektrofotometre cihazı	Shimadzu (UV-1800)	Japonya

UV nanodrop cihazı	Shimadzu (BioSpec-nano)	Japonya
Vorteks karıştırıcı	Velp	İtalya
Yüksek hacimli santrifüj	Eppendorf 5810	Almanya

4. YÖNTEMLER

4.1. İn situ Jel Formülasyon Çalışmaları

Hazırlanan *in situ* plasebo jel formülasyonlarını için polimer olarak Pluronic® F 127 ve kitosan, çözücü olarak distile su ve pH 7.4 fosfat tamponu (Phosphate Buffered Saline; PBS), kullanılmıştır. Formülasyon çalışmalarına farklı oranlarda polimer kullanılarak başlanmış, polimerlerin oran seçimi kaynaklara uygun olarak yapılmıştır. Sıcaklık etkisi ile jelleşen polimerler ile çalışırken karıştırma işleminin soğuk ortamda yapılması gereklidir (Rawat ve ark., 2010). Bu nedenle jel hazırlama sırasında tüm karıştırma çalışmalarında sıcaklığı 10 °C'nin altında tutmak için buz banyosu kullanılmıştır.

4.1.1. Uygun pluronic miktarı belirlenmesi

Pluronic F-127 miktarları a/h (ağırlık-hacim) oranına göre belirlenmiştir. Sırasıyla % 5, % 10, % 15, % 18, % 19, % 20, % 25 ve % 30'luk oranlar denenmiştir. Pluronic F-127, belirlenen oranlarda cam beherlere tartılmış, üzerine önceden soğutulmuş 10 mL distile su eklenerek buz banyosunda yaklaşık 300 rpm'de manyetik karıştırıcıda çözününceye kadar karıştırılmıştır. Karıştırma işlemi öncelikle düşük rpm'de (150 rpm) başlatıldıktan sonra 300 rpm'e çıkarılmıştır. Çözünme süresi ortalama 2,5 saat olarak belirlenmiştir ancak konsantrasyon arttıkça bu sürenin 3.5-4 saate kadar çıktığı belirlenmiştir. Karıştırma ortamı sıcaklığı ~10 °C'de tutulmuştur. Ortam sıcaklığı düştükçe çözünme süreside buna bağlı olarak azaldığı görülmüştür. Çözündürme işlemleri için distile su yerine, PBS (pH:7,4) ve DMEM (Dulbecco's Modified Eagle Medium)'de denenmiştir.

4.1.2. Farklı içerikli jellerin hazırlanması

Hücre yenileme özelliği bilinen kollajen ve kitosanı içeren jellerin hazırlanması için, daha önce elde edilen P-F127 çözeltisine kollajen ve kitosan çözeltileri eklenerek 3 farklı içeriğe sahip (Tablo 4.1) formülasyonlar hazırlanmıştır. Kitosan ve kollajen ayrı olarak çözüldükten sonra Pluronic F-127'li çözelti içine eklenmektedir.

Tablo 4.1. *Jel formülasyonlarına ait kodlar ve içerikler*

Maddeler	Kollajen (mg)	Kitosan (mg)	Pluronic F-127 (g)	Distile su (mL)
F1	50	-	2	10
F2	-	50	2	10
F3	50	50	2	10

F1, F2 ve F3 formülasyonlarının hazırlanmasında Pluronic F-127 çözeltisinin hazırlama kısmı aynıdır. Pluronic F-127 çözeltisi için, 25 mL’lik cam behere 2 gr Pluronic F-127 tartılmıştır, üzerine soğutulmuş 8 mL distile su ilave edilerek buz banyosunda 300 rpm’e kademeli olarak çıkılarak karıştırılmaya bırakılmıştır.

F1 formülasyonu için, 50 mg denizanası kollajeni ayrı bir behere tarılmış ve 2 mL distile suda çözölmüştür. Bu çözelti, 8 mL Pluronic F-127 çözeltisine yavaş yavaş ilave edilmiştir. Toplamda 10 mL F1 formülasyonu elde edilmiştir.

F2 formülasyonu için, 50 mg kitosan (orta molekül ağırlıklı) ayrı bir behere tarılmış ve % 1’lik asetik asit ile pH 1.2’ye ayarlanmış 2 mL distile suda çözölmüştür. Bu çözelti, 8 mL Pluronic F-127 çözeltisine yavaş yavaş ilave edilmiştir. Toplamda 10 mL F2 formülasyonu elde edilmiştir.

F3 formülasyonu için, 50 mg denizanası kollajeni ayrı bir behere de 1 mL distile suda, 50 mg kitosan (orta molekül ağırlıklı) ayrı bir beherde % 1’lik asetik asit ile pH 1.2’ye ayarlanmış 2 mL distile suda çözölmüştür. Bu çözeltiler, 7 mL olarak hazırlanmış Pluronic F-127 çözeltisine yavaş yavaş ilave edilmiştir. Toplamda 10 mL F3 formülasyonu elde edilmiştir.

4.2. *In Situ* Jel Formülasyonların Fizikokimyasal Özelliklerinin Belirlenmesi

Hazırlanan formülasyonların fizikokimyasal özelliklerini belirlemek amacıyla jelleşme kapasitesi, şişme oranı, pH değerlerinin belirlenmesi, reolojik özellikleri gibi parametreler incelenmiştir. Fizikokimyasal karakterizasyon, formülasyonun kararlılığının belirlenmesinde ve formülasyon sırasında kullanılan maddelerin toksikolojik etkilerinin belirlenmesinde önemlidir. Kullanılan maddelerin konsantrasyonu, farklı ortamlardaki **çözünürlüğü gibi fizikokimyasal**

özellikler, biyolojik olarak kullanılabilirliğini etkileyen kriterlerdir (Rasmussen ve ark., 2017). Bu nedenle, hücre yenileyici özelliği olan kollajen ve kitosanın hazırlanan jel formülasyonunun hücre kültürü çalışmaları da gerçekleştirilmiştir.

4.2.1 Jelleşme kapasitesi

Hazırlanan Pluronic F-127 hidrojellerinin, jelleşme kapasitesini belirlemek ve gözlemlemek için için, 10 mL’lik Pluronic F-127 çözeltisi içerisine 1mg metilen mavisi eklenerek bir süre soğukta karıştırılmıştır. Elde edilen mavi çözelti, cam beher içinde 20 mL taze hazırlanmış 37°C’de ki PBS’e damlatılarak jelleşme zamanı hem görsel olarak kaydedilmiştir ve Tablo 4.2’ye göre değerlendirilmiştir.

Tablo 4.2. *In situ* jel formülasyonunun jelleşme kapasitesi derecesi

Gözlem	Derece
Jelleşme Gözlemlenmedi	-
Jelleşme birkaç dakika içinde oluştu ve birkaç saat sürdü	+
Jelleşme anında oluştu ve birkaç saat sürdü	++
Jelleşme anında oluştu ve uzun süre sürdü	+++
Çok yoğun jel oluştu	++++

4.2.2. Şişme çalışması

In situ jel formülasyonunun şişme çalışması için, 1 mL Pluronic F-127 çözeltisi diyaliz membran (Selüloz membran, MWCO 14.000; Sigma) içerisine konulmuş ve sızdırmayacak şekilde kapatılmıştır. Bu membran daha sonra, 37 °C sıcaklıktaki PBS çözeltisi içerisine şişme için bırakılmıştır. Pluronic F-127 çözeltisi konmuş ve kapatılmış bu membran, PBS ortamına konulmadan önce ve belirli süre bekletildikten sonra jel ağırlığını belirlemek için tartılmış ve aşağıdaki eşitlik kullanılarak şişme yüzdesi hesaplanmıştır.

$$\% \text{ şişme oranı}(t) = \frac{\text{jel ağırlığı} (t) - \text{jel ağırlığı} (t_0)}{\text{jel ağırlığı} (t_0)} \times 100$$

Eşitlik 1.

4.2.3. Fiziksel görünüş ve saydamlık

Hazırlanan etkin madde içeren *in situ* jel formülasyonların fiziksel görünüşleri görsel olarak incelenmiştir. Partikül varlığı olasılığı nedeniyle jel sistemlerin saydamlığı beyaz ve siyah arka plan kullanılarak değerlendirilmiştir.

4.2.4. pH ölçümü

Hazırlanan *in situ* jel formülasyonların pH değeri ölçümü oda sıcaklığında pH metre ile yapılmış ve değerlendirilmiştir.

4.2.5. Reolojik davranışın incelenmesi

Taze hazırlanan formülasyonların reolojik davranışı incelenmiştir. Reolojik analiz için Brookfield koni-tabla reometresi kullanılmıştır. Koninin açısı 1.565° ve çapı 1.2 cm'dir. Ölçüm 10, 15, 25 ve 37°C 'de yapılmıştır. Bu farklı sıcaklıklardaki viskozite ölçüm değişimi kaydedilmiştir.

4.3. Kitosan Disklerinin Hazırlanması ve Analizi

Enjekte edilebilen jel formülasyonlarının hazırlanması çalışmalarının ardından, eklem içerisine jel enjeksiyonundan sonra daha uzun süre kalabilmesi için, hasarlı bölgeye yerleştirilebilecek özellikte kitosan sünger diskler tasarlanmıştır. Kartilaj dokuda ki dejenerasyon bazen kısmi hasar durumunun dışına çıkarak tam kat doku hasarı noktasına ulaşabilmektedir. Bu tür durumlarda cerrahi müdahale gerekli hale gelmektedir (Haberal, 2015). Bu disklerinin hazırlanmasının amacı, cerrahi müdahale sırasında *in situ* jel emdirilmiş disklerin eklem içerisine yerleştirilmesini kapsamaktadır. Böylece, eklem içerisine yerleştirilecek olan bu disklerle belirli dönemlerde jelin enjekte edilmesi ve daha uzun sürede etkin maddenin salınması mümkün olabilecektir. Çalışmanın bu aşamasında, düşük, orta ve yüksek yoğunluktaki kitosanlarla sünger diskler hazırlanmıştır. Bu disklerle jel formülasyonları emdirilmiş ve *in vitro* salım çalışmaları gerçekleştirilmiştir.

4.3.1. Kitosan disklerinin hazırlanması

Kollajen içeren ve *in situ* jelleşen formülasyonun kartilaj doku içerisine enjeksiyonundan sonra daha uzun süre salınması için, eklem içerisine yerleştirilebilecek bir yapının oluşturulması planlanmıştır. Bu yapı, hücre yenilemesi özelliği bulunan ve

biyobozunur yapıdaki kitosanlardan oluşturulmuştur (Ülker, 2013). Kitosan iskelelerin hazırlanmasında üç farklı yoğunlukta kitosan kullanılmıştır. Düşük yoğunluklu kitosan için % 1.5, Orta yoğunluklu kitosan için % 1.4 ve yüksek yoğunluklu kitosan için % 1.125 kitosan çözeltileri hazırlanmıştır. Disklerin içerikleri Tablo 4.3'te verilmiştir. Disk hazırlamada kullanılacak olan çözelti, 20 mL, % 1 asetik asit çözeltisine belirtilen oranlarda kitosanların tatılması ve 1 gün boyunca manyetik karıştırıcıda karıştırılması ile elde edilmiştir. Bu çözeltiler, iç yüzeyi sıvı parafin ile sıvanmış 24 kuyulu hücre kültürü plakalarına 2 mL olacak şekilde konulmuş ve -20 °C'de 1 gün donması için bırakılmıştır. Dondurma işleminin ardından plakalara üstü parafilmle sarılarak ve delikler açılarak liyofilize işlemine 1 gün boyunca bırakılmıştır. Bu yöntem sonucu elde edilen iskeleler kullanılmadan önce çok aşamalı yıkama işlemine tabi tutulmuştur. Basınç altından öncelikle etanol daha sonra saf su ile seyreltilmiş etanol ve en son saf su ile yıkama işlemi gerçekleştirildi.

Tablo 4.3. *Kitosan diskleri için kullanılan oranlar*

Maddeler						
Kitosan Diskleri	Yüksek yoğunluklu kitosan (mg)	Orta yoğunluklu kitosan (mg)	Düşük yoğunluklu kitosan (mg)	Distile su (mL)	Asetik asit (µL)	Yüzde değerleri
Disk 1	225	-	-	20	200	% 1,125
Disk 2	-	280	-	20	200	% 1,4
Disk 3	-	-	300	20	200	% 1,5

4.3.2. Kitosan disklerin SEM (Taramalı elektron mikroskopi) analizi

SEM, elektron hızına bağlı olarak ayırma yeteneğine (resolution) sahiptir. Elektronun hızı ne kadar fazlaysa ayırma gücü o kadar fazladır. Buna bağlı olarak SEM hızlandırılmış elektronlar ile örneğin etkileşmesi esasına dayanır. SEM'de, elektron tabancasından çıkan elektronlar anot-katot düzeneğindeki potansiyel fark ile hızlandırılır ve optik sisteme yönlendirilir. Elektromanyetik mercek sistemleri sayesinde elektronlar örnekler odaklandırılarak, örnek atomları ile elastik ve inelastik etkileşimler yapar. Bu elastik olmayan girişim sonucu düşük enerjili Auger elektronları meydana gelir. Bu elektronlar numune yüzeyinin durumu hakkında bilgi içerir ve Auger Spektroskopisinin çalışma prensibini oluşturur. Yine etkileşimler sonucunda yörüngelerinden çıkan veya enerjisi azalan demet elektronları numune yüzeyine doğru

hareket ederek yüzeyde toplanırlar. Bu elektronlara ikincil elektron (seconder electrons) denir. Numune odasındaki sintilatörde ikincil elektronlar toplanarak, bunların görüntüsü sinyale çevrilir. İkincil elektronlar yüzeyin 10 nm veya daha düşük derinliğinden gelmektedir ve numunenin yüksek çözünürlüğe sahip topoğrafik görüntüsünün elde edilmesini sağlar (Karaduman, 2017; Kaya, 2015).

SEM analizi deneyi, hazırlanan kitosan disklerin yapısal formu hakkında bilgi edinme amacıyla Anadolu Üniversitesi BİBAM (Bitki, İlaç ve Bilimsel araştırma Merkezi) Laboratuvarında gerçekleştirilmiştir. Öncelikle numuneler SEM cihazında kaliteli görüntü alabilmek için altın (Au) kaplama işlemine tabi tutulmuştur.

Numune Hazırlıma

- Numunenin büyüklüğü, numuneyi koyacağımız örnek tutucu (holders and stages) yüzey alanına uyması için kesit alınıp küçültülmüştür.
- Stub'ın (holders) yüzeyi çift taraflı karbon yapıştırıcı bant ile yapıştırılmıştır
- Daha sonra numunelerin yüzeyini altın tozlarıyla kaplamak için BİBAM bünyesindeki “Tek Hedefli Plazma Püskürtmeli İnce Film kaplama Cihazı” (SBC-900, Çin) kullanılmıştır (Şekil 4.1).
- Kaplama süresi ve voltajı numunenin büyüklüğü ve yapısına göre değişkenlik göstermiştir.



Şekil 4.1. Tek Hedefli Plazma Püskürtmeli İnce Film kaplama Cihazı (SBC-900)

Stub üzerindeki numuneler altın kaplandıktan sonra BİBAM bünyesindeki HITACHI TM 3030 plus Masaüstü Tip Taramalı Elektron Mikroskobu cihazının numune tutucusuna yerleştirilmiş ve görüntüler alınmıştır.



Şekil 4.2. Masaüstü SEM cihazı (HITACHI TM 3030 plus)

4.3.3. Kitosan disklerinin dağılım (dezentegrasyon) çalışması

Bu çalışma, hazırlanan kitosan disklerinin biyolojik ortamda dağılmadan kalış süresini belirlemek amacıyla gerçekleştirilmiştir. Amaçlanan, bu disklerin yerleştirildiği bölgeye formülasyonların enjekte edilmesi ve yavaş salımın sağlanması olduğundan öncelikle disklerin dayanıklılığının belirlenmesidir. Bu işlem için Anadolu Üniversitesi Farmasötik Teknoloji Laboratuvarında bulunan Pharma Test PTWS 820D disolüsyon cihazı (Şekil 4.3) kullanılmıştır. Çözünme ortamı olarak 37 °C’de ki 400 mL pH 7.4 PBS çözeltisi kullanılmıştır. Belli molekül ağırlıklara sahip ve kütlesi bilinen kitosan diskler cihazın sepetine yerleştirilmiş ve 1 ay süresince 100 rpm’de döndürülmüştür. Her bir disk için deney ikiyeşerli olarak yürütülmüştür ve bu süreç boyunca kontaminasyonun önüne geçmek için her iki günde bir PBS ortamı yenilenmiştir.

Bir aylık süre sonunda, diskler sepetlerden çıkarılmış filtre kağıtları üzerine konarak emdiği PBS çözeltisinden uzaklaştırılmıştır. Tamamen kurutmak amacıyla 40 °C’ye ayarlanmış etüvde (New Brunswick Scientific, Innova 42) 24 saat saat süresince bekletilmiştir. Kurutulmuş diskler daha sonrasında tartılmış ve aşağıdaki eşitlikle % dağılım oranları belirlenmiştir.

$$\% \text{ dağılım} = \frac{\text{ilk ağırlık} - \text{son ağırlık}}{\text{ilk ağırlık}} \times 100$$

Eşitlik 2.



Şekil 4.3. Disolüsyon sistemi (Pharma Test PTWS 820D)

PBS Çözeltisi (1 Litre için)

- 8gr NaCl
- 0,2gr KCl
- 1,44gr Na₂HPO₄
- 0,24gr KH₂PO₄

Çözelti içerisindeki kimyasal maddeler sırasıyla tartılarak 1 litrelik cam şişeye aktarılmıştır. Daha sonra üzerine 800 mL distile su eklenerek 750 rpm’de kimyasallar iyice çözülene kadar karıştırılmıştır. pH’ı 7,4’e ayarlandıktan sonra 1 litreye distile su ile tamamlanarak tekrardan karıştırılıp son kez pH ölçümü alınmıştır.

4.4. Formülasyonların Disklere Yüklenmesi

Formülasyonların disklerden salım profillerinin çıkarılması için öncelikle formülasyonların disklere yüklenmesi işlemi gerçekleştirilmiştir. Bunun için, formülasyonların disklere emdirilmesi ve enjekte edilmesi olmak üzere iki yöntem kullanılmıştır.

4.4.1. Emdirme yöntemi

Kaç gram formülasyonun disklere yüklendiğinin belirlenmesi için, öncelikle diskler bölüm 4.3.1’de anlatıldığı gibi yıkanmıştır ve suyun fazlası filtre kağıdı ile alındıktan sonra, 50 mL’lik balon içerisinde bulunan 20 mL F1 formülasyonu içerisine atılmıştır ve balon tartılmıştır. Balon, rotovaporda 140 mbar da 50 rpm’de 30 dakika döndürülmüştür.

Sonrasında, her bir disk bir pens yardımı ile balondan çıkarılmış ve balon ulaştırılan her diskten sonra tekrar tartılarak disk ile gelen formülasyonun miktarı belirlenmiştir.

4.4.2. Enjekte etme yöntemi

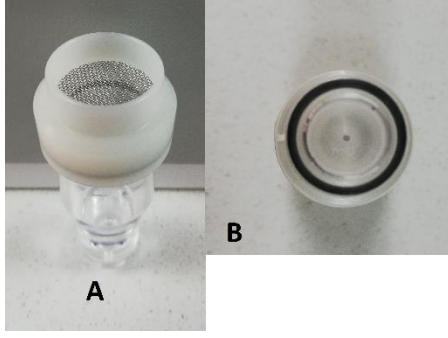
Bu yöntemde ise, Franz difüzyon hücresi ile yapılacak salım çalışmaları için örnekler hazırlanmıştır. Franz difüzyon hücresinin 3 mL 37 °C olan PBS çözeltisi içeren örnek koyma kompartımanı içerisine yerleştirilmiş olan diske 1 mL (1.039 g) formülasyon insülin enjektörü kullanılarak, diskin orta noktasına enjekte edilmiştir.

4.5. *In Vitro* Salım Çalışmaları

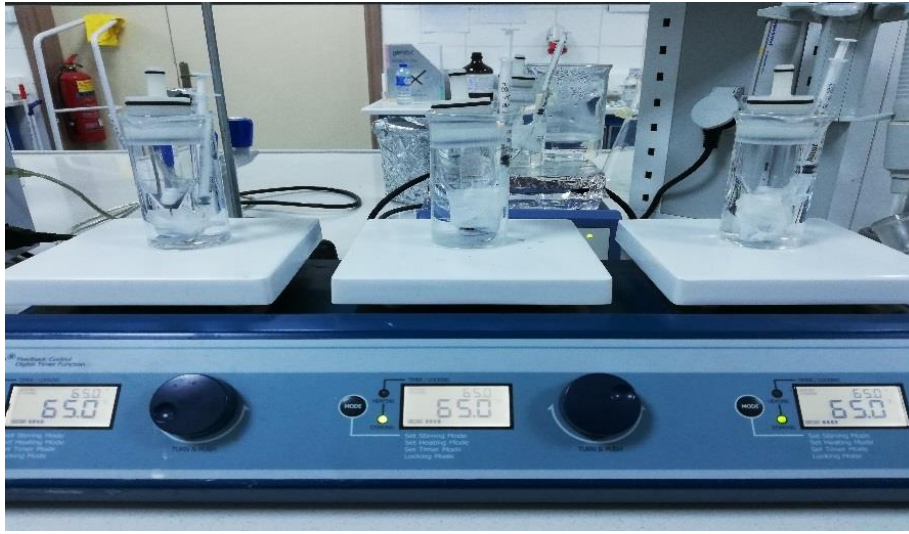
4.5.1. Formülasyon emdirilmiş disklerin salım çalışması

Bu çalışma, laboratuvarımızda bulunan Sotax Dissolüsyon sistemine (Sotax Dissolution System, USA)'ne ait salım hücreleri kullanılarak gerçekleştirilmiştir. Bu yöntem tarafımızdan dizayn edilmiştir. Salım hücreleri şekil 4.4 ve şekil 4.5'te verilmiştir. Hücrenin reseptör chamber'ına konulan salım ortamı 20 mL pH 7.4 PBS çözeltisidir. Formülasyon emdirilmiş diskler salım hücrelerinin üst kısmında bulunan ızgaralı alana yerleştirilmiştir ve sistem kapatılmadan önce 1 mL üzerine PBS çözeltisi eklenmiştir. Ortam ısısının 37 °C'ye ayarlanması için bu salım hücreleri bir beher yardımı ile oluşturulan su banyosu içerisine oturtulmuştur. Salım ortamının sirkülasyonu için, salım hücrelerinin içerisine küçük magnetler konulmuştur ve magnetik karıştırıcı üzerinde 65 rpm'de dönmeleri sağlanmıştır. Belirli aralıklarda (20', 40', 1, 2, 3, 4, 5, 6, 8 ve 12. saat) 1 mL örnek alınmıştır. Örnek alımı, salım hücresinin alt kısmında bulunan deliğe monte edilmiş enjektörle sağlanmıştır. Alınan örneğin yerine 37 °C'de taze PBS örnek kompartımanından teke ilave edilmiştir.

Toplanan örnekler daha sonrasında UV spektrofotometresi kullanılarak 280 nm dalga boyunda ölçülmüştür ve kümülatif salım profili çıkarılmıştır.



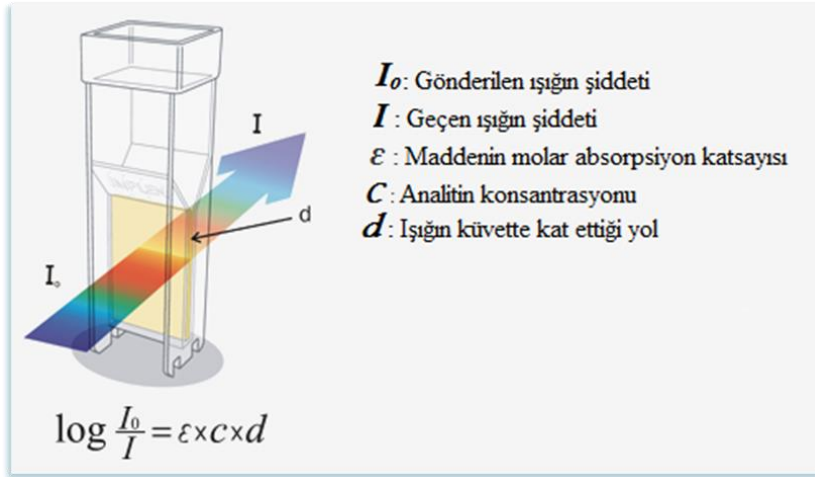
Şekil 4.4. Sotax Dissolüsyon sistemine ait salım hücresi A: reseptör chamber ızgarası B: örnek alım deliği



Şekil 4.5. *In vitro* salım düzeneği

4.5.1.1. UV-Vis Spektrofotometre ile kollajen miktar analizi

Spektrofotometri, bir ışık demeti örnek çözeltiden geçerken ışığın yoğunluğunu ölçerek çözeltinin ışığı ne kadar absorbe ettiğini ölçen bir yöntemdir. Bazı maddeler, belirli bir dalga boyu aralığında ışığı (elektromanyetik radyasyon) emer, iletir veya yansıtır (Tissue, 2002). UV-Vis, bir analitin çözelti içindeki konsantrasyonunu belirlemek için hızlı, basit ve ucuz bir yöntemdir. Analiz edilecek bileşiğin türünün bilindiği yerlerde, analitlerin konsantrasyonunu belirlemek için nicel bir analiz yapmak için nispeten basit bir analiz yöntemi olarak kullanılır (http-6). UV-Vis'te, dalga boyu 180 ila 1100 nm arasında ölçüm yapılır. UV-Vis ölçüm tekniği Lambert beer konuna dayanır (Şekil4.6).



Şekil 4.6. *lambert beer yasası* (<http-7>)

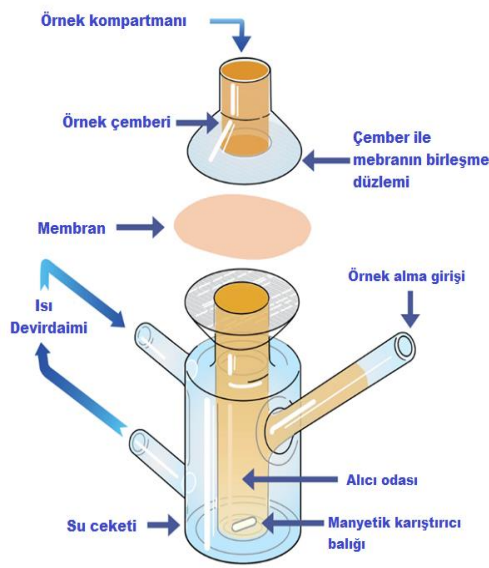
UV-Vis analizi için öncelikli olarak dalga boyu bilinen saf etken maddenin konsantrasyona karşı absorbans değerleri belirlenerek o maddenin spektrumu elde edilir. Bu amaç doğrultusunda, bildiğimiz konsantrasyonlarda kollajen PBS’de seyreltilmiş ve absorbans değerleri elde edilmiştir. Konsantrasyona karşı absorbans değerleri ile bir standart eğri oluşturulmuştur. Daha sonra bu eğri salım sırasında bilinmeyen konsantrasyonun belirlenmesinde kullanılmıştır.

Pluronic F-127 ve Kollajenden oluşan formülasyonun spekturumunun elde edilmesi için, 0,1 ile 1 mg kollajen içerecek 10 farklı seyreltme işlemi PBS ile yapılmıştır. Örnekler, 16 gözlü çoklu küvette (multi-cell) aktararak ölçümler alınmıştır. PBS kullanılmasının sebebi salım çalışmasının PBS ortamında gerçekleştirilmesidir. Bu işlem için SHIMADZU Spektrofotometre UV-1800 (Japonya) cihazı kullanılmıştır. Kör ortamı olarak her konsantrasyona karşılık gelen ve kollajen içermeyen Pluronic F127 formülasyonunun PBS içinde aynı oranda seyreltilmiş örnekleri kullanılmıştır. Tirozindeki fenolik gruplar ve triptofandaki indolik gruplar nedeniyle birçok protein 280 nm’de maksimum absorpsiyon gösterdiğinden örnekler 280 nm dalga boyunda ölçülmüştür (Layne, 1957).

4.5.2. Formüasyon enjekte edilmiş disklerin salım çalışması

Bu çalışma için Franz disüfyon hücreleri kullanılmıştır (Şekil 4.7). Salım ortamı (Reseptör chamber) 5 mL’dir ve pH 7.4 PBS ile doldurulmuştur. Salım ortamı ve örnek kompartımanı (donor chamber) arasına 0.8 µm por çaplı selüloz asetat membran yerleştirilmiştir. Sistem kurulduktan sonra, örnek alanı içerisine boş disk yerleştirilmiş ve

üzerine 3 mL PBS ilave edilmiştir. Ortam ısı 37 °C olarak, karıştırma hızı 100 rpm olarak ayarlanmış tır. PBS ortamında 30' bekletilen disk içine bölüm 4.4.1'de anlatıldığı gibi 1 mL F1 formülasyonu enjekte edilmiştir. Belirli aralıklarla (1, 2, 3, 4, 5, 6, 8, 10, 12, 24 ve 36 saat) 500 µL örnekler alınmıştır. Alınan örnek miktarı kadar, örnek kompartmanına PBS eklenmiştir. Toplanan örnekler daha sonra SDS-PAGE yöntemi ile görüntülenmiştir.

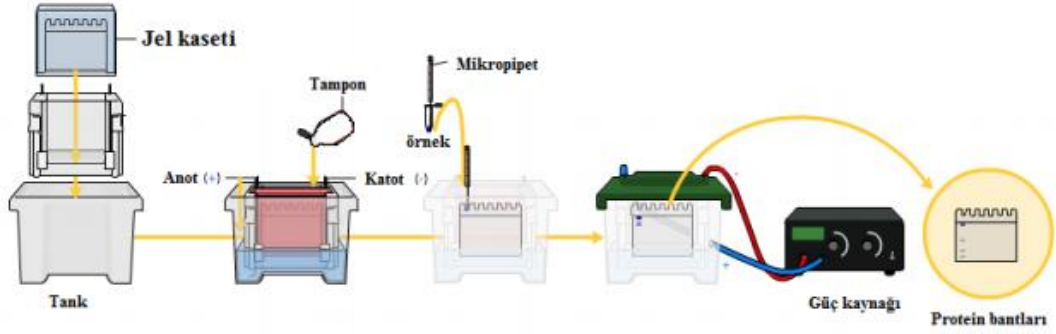


Şekil 4.7. Franz difüzyon hücresi

4.5.2.1. SDS-Page jel elektroforezi (sodyum dodesil sülfat poliakrilamit jel elektroforezi) analizi

SDS-PAGE yöntemi, salınan kolajen mikratı UV ile dedekte edilemediği için tercih edilmiştir. Bu yöntem proteinlerin saflığının kontrolü ve moleküler ağırlıklarının saptanması amacıyla kullanılır. Akrilamit ve N-N'-metilen bis-akrilamit monomerlerinin polimerleşmesiyle oluşan jel matrisde elektrik akımı yardımıyla proteinler büyüklüklerine göre ayrılır. Polimerizasyon katalizörler (amonyum persülfat ve TEMED) sayesinde gerçekleşir. SDS elektroforezde diğer sistemlerden farklı olarak örnek hazırlama tamponuna bir miktar SDS eklenir. SDS örnekteki protein molekülünün etrafında boşluk kalmayacak şekilde katman oluşturarak negatif yüklenmesini sağlar. Böylece ayrışma, moleküllerin kendi yüklerinden bağımsız (negatif), molekül ağırlıklarına göre gerçekleşir. Akım geçirildiğinde jel matrisi içinde bulunan proteinler

farklı büyüklükteki gözeneklerden büyüklüklerine göre farklı geçiş hızları gösterir. Amaç küçük proteinlerin jelde hızlı, büyük proteinlerin ise yavaş yürümesini sağlamaktır (Wenk ve Fernandis, 2007). SDS-PAGE yönteminin şematik olarak gösterilmesi şekil 4.8 'de verilmiştir.



Şekil 4.8. SDS elektroforez şeması (Şenel, B. 2012)

Kullanılan çözeltiler;

% 12 Ayırma Jeli (10 mL)

- % 30 Akrilamit/bisakrilamit
- 4 mL 1.5 M Trizma baz 2.5 mL
- % 20 SDS 0.05 mL
- % 10 APS 0.05 mL
- TEMED 0.0066 mL
- Distile su 3.4 mL

% 5 Yığma Jel

- % 30 Akrilamit/bisakrilamit 0.67 mL
- 1 M Trizma baz 0.5 mL
- % 20 SDS 0.04 mL
- % 10 APS 0.04 mL
- TEMED 0.004 mL
- Distile su 2.7 mL

Yürütme Tamponu (pH 8.5)

- 1.92 M Glisin 144 g
- 0.25 M Trizma baz 30.3 g
- % 0,1 SDS 1 g
- Distile su ym 1 L

Brillant Blue Çözeltisi

- Brilliant blue 0,25 mg
- Metanol:Distile su (1:1) 90 mL
- Glasiyel asetik asit 10 mL

SDS-PAGE'in uygulanması;

- Jel hazırlanmadan önce cam plakalar distile su ile yıkanmış ve kurulanmıştır. Camlar jel kasetine yerleştirilmiş ve sıkıca tutturulmuştur. Herhangi bir sızıntı olup olmadığı distile su ile kontrol edilmiştir.
- Sırasıyla, distile su, SDS, Tris ve akrilamit tüpe konularak iyice karışmaları sağlanmıştır. En son APS ve TEMED eklenerek ayırma jeli hazırlanmıştır.
- Ayırma jeli plakalar arasına pipet yardımı ile hiç hava kabarcığı kalmayacak şekilde dökülmüştür.
- Tarakların yaklaşık 1 cm altına kadar ayırma jeli doldurulduktan sonra üzerine izopropanol eklenerek hava ile temas kesilmiş ve polimerleşme için 1 saat beklenmiştir.
- Polimerleşme olduktan sonra izopropanol kurutma kâğıdı yardımı ile ortamdan çekilmiştir. 6. Yürütme jeli için karışım üstteki sırayla hazırlandıktan sonra yine mikropipet yardımıyla dökülmüş ve taraklar dikkatlice takılmıştır. Polimerleşme için 1 saat beklenmiştir.
- Polimerleşme olduktan sonra kaset tank içerisine yerleştirilmiş ve tank yürütme tamponu ile doldurulmuştur. Taraklar dikkatlice çıkarılmıştır.
- 500 µL olarak alınmış örneklerden, 15 µL jele yükleme işlemi gerçekleştirilmiştir.
- Örnekler 100 V ve 25 mA'de (bromofenol mavisi yürütme jelinin en altına gelinceye kadar) jelde yaklaşık 4 saat yürütülmüştür.

- Yürütme işlemi bittikten sonra jel dikkatlice tanktan çıkarılmış ve tarak kısmı kopararak atılmıştır.
- Jel elektroforezden çıkarıldıktan sonra doğrudan plastik kap içerisine alınmıştır.
- Kabin içine hazırlanan Brilliant Blue çözeltisi konulup kap çalkalayıcı üzerine alınmıştır.
- Çalkalayıcı üzerinde bantlar görülünceye kadar yaklaşık 1 saat çalkalanmıştır

4.6. Sitotoksosite ve Hücre Çoğalması Çalışması

Bu çalışma MTT olarak bilinen sitotoksosite, hücre canlılığı ve poliferasyonunun değerlendirilmesinde en çok tercih edilen yöntem kullanılmıştır. MTT hücrelere aktif olarak absorbe olan ve mitokondriye bağlı reaksiyon ile renk veren, suda çözünmeyen formazana indirgenen bir maddedir. MTT boyasının tetrazolyum halkasını parçalayabilmesi ilkesine dayanmaktadır. Parçalanma sonucu soluk sarı renkteki MTT boyası mavi-mor formazana indirgenir. Bu deneyde ölçünler Cytation 5 (BioTek) cihazıyla yapılmıştır. Hücre olarak 3T3 (Embriyonik fare fibroblast) hücreleri kullanılmıştır. Besi yeri ortamı % 10 FBS (Fetal serum albümin) içeren DMEM (Dulbecco's Modified Eagle Medium) kullanılmıştır.

- Hücreler önceden 37 °C’de % 5 CO₂ içeren ortamda kültüre edilmiş ve daha sonra % 10 FBS içeren DMEM besiyerinde dağıtılmıştır. Thoma lamı ile hücre sayımı yapılarak her kuyucuğa 2x10⁴/ mL hücre eklenecek şekilde 96 kuyucuklu plakaya aktarım yapılmıştır.
- Hücrelerin çoğalması ve plakaya tutunması için 1 gün boyunca inkübasyona bırakılmıştır.
- Hücreler üzerine, 100µL besi yeri ve farklı oranlarda Pluronic F-127 içerecek şekilde (1mg, 5mg, 10mg, 15mg, 20mg, 25mg, 30mg) 100µl örnekler eklenmiştir. Kontrol amacıyla, formülasyon içindeki miktarları göz önünde bulundurulacak şekilde Pluronic F-127 ve Kollajen, besiyerinde çözündürülmüş ve hücrelere uygulanmıştır. % Hücre canlılığının belirlenmesi için ise 6 kuyucuğa ekilen hücreler üzerine sadece besiyeri uygulanarak tüm plate 24 ve 48 saat boyunca inkübasyona bırakılmıştır.
- 24 ve 48 saat süreleri sonunda, formülasyon içeren besiyeri kuyucuklardan uzaklaştırılmış ve her bir kuyucuğa 20 µL (5mg/mL) MTT boyası eklenmiştir.

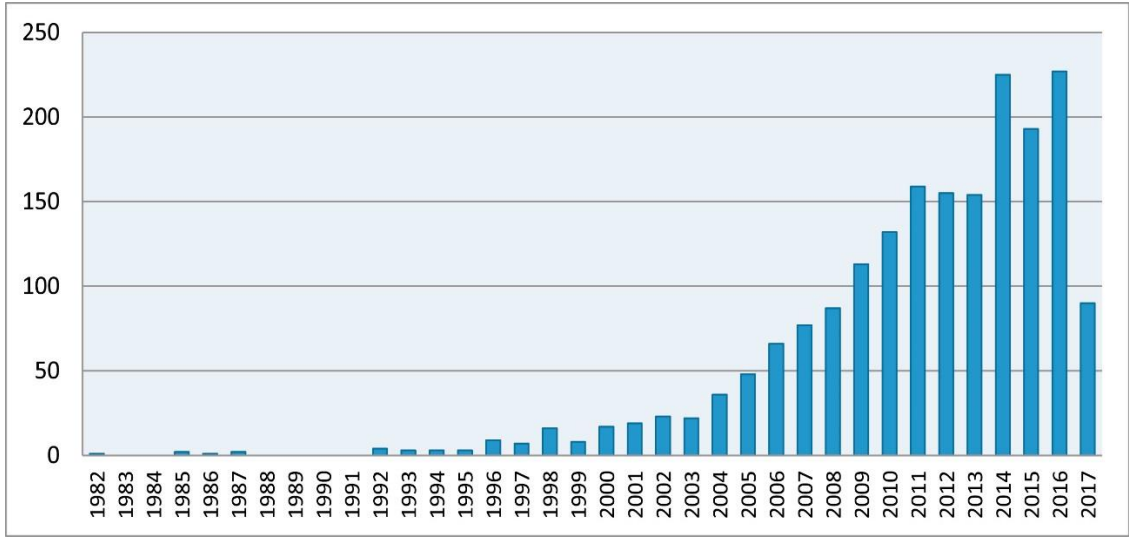
MTT boyasının canlı hücreler tarafından formazan tuzu haline dönüştürülebilmesi için 37 °C de 2 saat inkübe edilmiştir.

- Daha sonra MTT boyası üzerine her bir kuyucuğa 200µL DMSO eklenerek 570 nm dalga boyunda Cytation5 cihazı ile absorbanslar belirlenmiştir. % canlılık oranları kontrol grubu absorbans değerlerine göre hesaplanmış ve sonuçlar grafiğe dökülmüştür.

5. BULGULAR ve TARTIŞMA

5.1. *In situ* Jel Formülasyon Çalışmaları

In situ jel formülasyonları geliştirilirken, içereceği kollajen miktarı, vücut sıcaklığında jelleşme oranı, pH değeri, vizkositesi ve toksisitesi dikkate alınmıştır. Öncelikli olarak jel oluşturulması için kullanılan Pluronic F-127'nin miktarının belirlenmesi olmuştur. Bugüne kadar, literatürlerde, jelatinler de dahil olmak üzere hidrojel hazırlamak için başlangıç materyali olarak çok çeşitli bileşiklerle ilgili sayısız çalışma bulunmaktadır. Sentetik polimerler arasında en sık çalışılan (Şekil 5.1) ve ticari olarak temin edilebilen polimer Pluronic F-127'dir (Vandenhoute ve ark., 2017).



Şekil 5.1. Pluronic® F127 ile ilgili 1982'den beri yayınlanan yıllık yayın verisi (Web of Knowledge, Haziran 2017)

Formülasyon çalışmalarımızda başlangıç materyali olarak Pluronic F-127'nin seçilmesindeki en büyük etken bu polimerin geri dönüşümlü akıllı termojel özelliğine olmasıdır. Bu polimer, sıcaklık değişimiyle akışkan fazdan jel fazına veya tam tersi faz geçiş durumuna uğrayabilmektedirler. Bu özellik, PF-127'nin oral, topikal, intranazal, vajinal, rektal, oküler ve parenteral yollar dahil olmak üzere birçok uygulama yolu için kullanılabilir özellikte bir taşıyıcı polimerdir (Escobar-Chávez ve ark., 2006). Ayrıca bu polimer, hücre, biyosinyal molekülleri, genetik materyaller ve ilaç için taşıyıcı sistemlerin tasarlanmasında büyük avantajlara sahiptir. Tablo 5.1'de yapılan bazı çalışmalar özetlenmiştir.

Tablo 5.1. PF-127 jelinin farmasötik formülasyonlardaki araştırması (Escobar ve Ark., 2006)

Araştırma	Sonuç
İndometasin, antikanser ajanlar (adriamisin, 5 fluroürasil) ve mitomisin C içeren PF-127 jeli	Indomethacin'in topikal ve rektal uygulaması için iyi bir araç ve sürekli mitomisin salınımı için uygun olduğu belirlenmiş
PF-127'nin reolojik çalışması	Viskozite ve sıcaklık arasındaki üstel ilişki belirlenmiş
Anti-enflamatuar ve analjezik transdermal jel	Uzun süreli anti-enflamatuar ve analjezik aktivite belirlenmiş
İnvivamid hidrojellerin <i>in vitro</i> ve <i>in vivo</i> topikal uygulaması ve farmakodinamik değerlendirilmesi	İvivamid olmayan hidrojel formülasyonlarının, cilde daha fazla ilaç verdiği ve krem bazlarından daha fazla farmakodinamik aktivite ürettiği belirlenmiş
İyonik olmayan yüzey aktif maddelerin, poloksamer jelden sıçan derisi boyunca piroksikam üzerindeki geçirgenlik artırıcı maddeler olarak etkileri	Çeşitli yüzey aktif cisimleri içeren PF-127 jelleri ile ön işlemden geçirilmiş cilt, gevşek bir şekilde katmanlı bir stratum korneum ve geniş hücre içi boşluk sergiledi
Fentanilin perkütan uygulaması için serbest bırakma aracı olarak PF-127	PF-127, fentanilin perkütan olarak verilmesi için faydalıdır.
Azone® ve Transcutol® içeren PF-127 jeli ile formüle edilmiş sodyum naproksenin cilt geçirgenliği üzerindeki etkisi	Azone® ve Transcutol® içeren PF-127 jeli, sadece Transcutol® içeren formülasyona kıyasla iki katına varan oranla sodyum naproksen penetrasyonunu arttırdığı belirlenmiştir
PF-127'nin, zayıf asit ve bazların iki tabakalı lipid membranlardan geçişine etkisi	PF-127, membran boyunca büyük moleküllerin geçirgenliğini kolaylaştırdığı belirlenmiştir
İnsülinin poloksamer jel ile transdermal olarak verilmesi: sıçanlarda, iyontoforez ve kimyasal arttırıcılar kullanılarak <i>ex vivo</i> ve <i>in vivo</i> cilt permeasyon çalışmaları	Ex vivo çalışmalar, hem linoleik asit hem de mentonun iyontoforez ile kombinasyon halinde, insülinin geçirgenliğine olumlu etkisi olduğu gösterilmiştir
Arjinin vazopressinin, transdermal iyontoforetik iletimi için PF-127 jelinin taşıyıcı olarak kullanılması: sıçanlarda <i>in vivo</i> değerlendirme	İyontoforez kullanımı, PF-127 jeli ile formüle edilmiş arjininin dağılımını arttırmıştır
Ceftiofur'un, PF-127 ile hazırlanmış jel formülasyonunun <i>in vitro</i> geliştirilmesi ve değerlendirilmesi	Ceftiofur'un, PF-127 ile oluşturulan jel sayesinde kontrollü bir şekilde salındığı saptanmıştır
Pluronic® 'in, bir allogreft veya bir alloplastla birlikte kritik boyutta ki kalvariya defektlerin iyileşmesi üzerindeki <i>in vivo</i> etkisi	Pluronic®, kemik greft materyalleri için taşıyıcı olarak düşünülebilir
PF-127'nin üçüncü derece yanıklarda kullanılması	Hızlandırılmış iyileşme oranı saptanmıştır
Epidermal büyüme faktörü (EGF) içerikli PF-127 jeli hazırlanması	EGF içerikli PF-127 jel ile topikal bir ürün geliştirmek mümkündür

Doymamış yağ asitleri içeren PF-127 jelinden insülin salınımı profilleri ve farelerde jel formülasyonlarının bukkal verilmesinden sonra insülinin hipoglisemik etkisi	Doymamış yağ asitleri içeren PF-127 jelleri, insülinin bukkal verilmesi için potansiyel formülasyonlardır
Gastrointestinal sistem lezyonlarının fotodinamik tedavisinde kullanımı için delta 5-aminolevulinik asit (ALA) içeren termo jel formülasyonunun etkinliği	ALA-PF-127 jeli, özofagusta iyi bir yapışma sağlayamış ve ALA'nın mukozaya etkili bir şekilde difüzyonunu sağlayan uygun bir formülasyondur
İnsan dişeti fibroblastının yayılma ve bağlanma oranının geliştirilmesi	PF-127, ameliyat sonrası erken yara iyileşmesinde faydalıdır
Kısa zincirli yağ asitlerinin rektal uygulanması için bir termo jelleştirici ve yapışkan polimer olarak PF-127'nin kullanılması	PF-127'nin % 18 konsantrasyonu, oda sıcaklığında sıvı olan ve 37 ° C'de jelleşen, yapışkan özelliklere sahip ve kısa zincirli yağ asitlerinin kontrollü salınımı sağladığı belirlenmiştir
Oftalmik uygulama için, rhEGF / HP-beta-CD kompleksi içeren poloksamer jel kullanılması	rhEGF, kornea öncesi bölgede uzun süre saklanabildiği görüşmüştür. Bu nedenle, Pluronic® jelin etkili oftalmik veriliş için ideal bir yöntem olduğu belirlenmiştir
Pilokarpin salınımını uzatma kabiliyetini değerlendirmek için biyobozunur poliizobütilsiyanoakrilat parçacık içeren PF-127 jel sistemi hazırlanması	PF-127MC jel v sistemi pilokarpin ve diğer hidrofobik ilaçlar için uzun süreli bir salım elde etmek için önemli bir potansiyele sahiptir
İyonik olmayan bir blok kopolimer, PF-127 ile tetosus (TT) 'nin mukozal uygulamasının, kitosan ile sistemik ve mukozal immün yanıt üzerine etkisi	PF-127 / kitosan jelinin bağışıklık tepkisi üzerinde sinerjistik bir etki gösterdiği ortaya koyan yeni bir mukozal aşı iletim sistemini geliştirilmiştir
Deri altından enjekte edilen PF 127 kaplı nanokürelerin, lenfatik dağılımının modülasyonu: etilen oksit zincir konfigürasyonunun etkisi	İnterstisyel olarak enjekte edilen PF-127 kaplı nanokürelerin lenfatik dağılımı, etilen oksidin yüzey konfigürasyonu (mantar benzeri konfigürasyon) ile kontrol edilebileceği belirtilmiştir
Deslorelin ve GnRH'nin PF-127 ile oluşturulan jel formülasyonlarının, ilacın bozulmasına ve sığırlarda ilaç salımına etkisi	PF-127 jel formülasyonları, peptid salınımı sürdürdüğü ve peptid bozulmasını azaltabildiği belirtilmiştir
Doksorubisin ve Pluronic karışımı (L-61 ve F-127) içeren bir formülasyonun <i>in vitro</i> ve <i>in vivo</i> modelleri kullanılarak validasyondan sonra faz I klinik çalışmalarının değerlendirilmesi	Bu formülasyon tümörleri, çeşitli antikanser ajanlarına göre şiddetli bir şekilde hassaslaştırdığı görülmüştür
Paclitaxel (Taxol, Bristol-Myers Squibb) içeren PF-127 ile termo jel formülasyonunun geliştirilmesi	Paklitaksel-PF-127'nin intratumoral uygulamasının ardından anti-tümör etkinliğinde önemli bir artış kaydedilmiştir. İlk tümör büyüme oranı % 67 oranında geciktiği görülmüştür

Enjekte edilebilir bir polimer jel kullanılarak doku tasarımına yönelik otolog kıkırdak çalışması	Otolog kıkırdak, doğal kıkırdaka benzer histolojik özelliklere sahip bir doku mühendisliği tekniği kullanılarak oluşturulmuş ve gözlemlenmiştir
Polimetilmetakrilatta stafilocok yapışmasının kontrolü ve PF-127 ile antibiyotiklere duyarlılığın artırılması	PF-127'nin antibiyotiklerle birlikte kullanılması, yabancı maddelerin enfeksiyonunun önlenmesine umut verici bir yaklaşım olabileceği belirtilmiştir
PF-127 jellerinin, polilaktik-ko-glikolik asit nanopartiküllerinin kullanımı ve bunların bir ilaç olarak modeli olarak, insülin kullanılarak kısa yarı ömre sahip peptidlerin ve proteinlerin parenteral verilmesi için kombinasyonlarının oluşturulması	İlaç veya ilaç nanoparçacıklarını içeren PF-127 jel formülasyonları, kısa yarı ömre sahip peptitler ve proteinler için kontrollü bir dağıtım sisteminin hazırlanmasında yararlı olabileceği saptanmıştır
Lesitin reolojiye etkisi ve geçirgenlik özelliklerinin belirlenmesi	PF-127 jelinde lesitin varlığı, lipofilik ilaçların cilt tutulmasını sağladığı belirtilmiştir

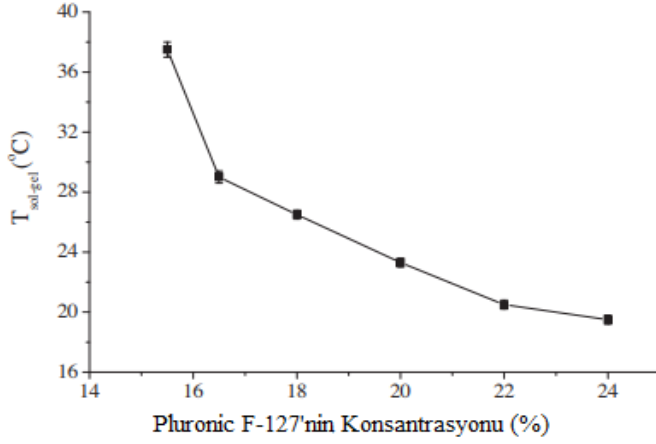
5.1.1. Uygun pluronic miktarı belirlenmesi

Pluronic miktarını belirlerken dikkat ettiğimiz hususlar 37 °C'de ki jelleşme kapasitesi, jelleşme süresi ve sitotoksik etki oluşturup oluşturmadığıdır. Yapılan çalışmalarda Pluronic F127'nin % 20'nin üzerindeki konsantrasyonlarının irritasyon etki oluşturduğu belirtilmiştir (Almeida ve ark., 2014)

Pluronic F-127 çözeltisi, sıcaklık arttığında jel formuna geçiş yapan etkili bir term-duyarlı polimerdir. Pluronic F-127 çözeltisinin Tsol-jel'i, konsantrasyon % 15,5'ten % 24'e yükseldiğinde 37,5 ° C'den 19,5 ° C'ye keskin bir şekilde düştüğü belirlenmiştir (Şekil 5.2). Daha önceki yapılan çalışmalarda bildirildiği gibi, ilaçların ve diğer bileşenlerin eklenmesi Pluronic F-127'nin Tsol-jel'ini değiştirebilir (Qian ve ark., 2014).

Khateb ve ark. (2016) P-F127 ve Pluronic F68'nin göz ilaç dağıtımında yerinde jel sistemlerini formüle etmek için eksipienler olarak kullanılmasını değerlendirmiştir. Fizyolojik olarak uygun sıcaklıklarda şeffaf jellerin oluşumunun yalnızca ağırlıkça % 20 P-F127 'de gözlemlendiği tespit edilmiştir. Cam yüzeylerdeki ve taze kesilen sıgır korneasında yapılan *in vitro* ilaç salım çalışması, diğer formülasyonlara kıyasla % 20 ağırlıklı P-F127 'nin geciktirilmiş ilaç salımında üstünlük sağladığını göstermiştir. Buna ek olarak, tavşanlardaki *in vivo* çalışmalar, Pluronic F68'e kıyasla, ağırlıkça % 20 P-F127 'nin daha iyi gecikmiş ilaç salım profili sergilediğini göstermiştir. Bu sonuçlar, ağırlıkça % 20 P-F127 'nin fizyolojik koşullar altında minimum irritasyon ile yerinde

şeffaf bir jel oluşturabilen dikkat çekici bir göz formülasyonu sunduğunu doğrulamıştır (Al Khateb ve ark., 2016).



Şekil 5.2. Sol-gel geçiş sıcaklığı ile P-F127 konsantrasyonları arasındaki ilişki (Qian ve ark., 2014)

Farklı konsantrasyonlarda hazırlanan P-F127 jellerinin 37 °C'deki jelleşme yapısı Tablo 5.2'deki gibi elde edilmiştir. Buradaki amaç 37 °C'de jelleşen minimum konsantrasyona sahip jel oranını belirlemektir. Daha önceki yapılan çalışmalar da göz önüne alındığında, optimum Pluronic konsantrasyonunun % 20 olduğuna karar verilmiştir.

Tablo 5.2. 37 °C'deki farklı konsantrasyonlardaki P-F127 jellerinin yapısı

Konsantrasyon (%)	37 °C'deki jelin yapısı			
	Akışkan	Viskoz	Yarı jelleşme	Tam jelleşme
5	+			
10	+			
15	+			
18		+		
19			+	
20				+
25				+
30				+

Pluronic'in konsantrasyon oranını belirledikten sonra, bu çalışmanın dışında %20'lik P-F127 'yi farklı çözücüler kullanarak çözme çalışmaları gerçekleştirilmiştir. Buradaki amaç, oluşturulan jelin eklem içerisine doğrudan enjeksiyonu yapılacağından kullanılan sıvının hücrelerin büyüyebileceği ortamları kapamasıdır. Farklı çözücü olarak taze hazırlanmış PBS (pH:7,4) ile DMEM (Dulbecco's Modified Eagle Medium)

seçilmiştir. Yapılan gözlemlerde bu çözücü ortamları Pluronik'i aynı sürede çözmüştür, jelleşme sıcaklığını ciddi oranda değiştirmemiştir ve kararlılığını etkilememiştir. Besiyeri ortamında Pluronik çözeltisi oluşturulabilmesi farklı deneysel çalışmalarda avantaj sağlayabilir görüşü hakim olmuştur.

5.1.2. Farklı kombinasyonlarda jel hazırlanması

Uygun Pluronik miktarının belirlenmesinden sonra kitosan, denizanası kollajeni ve P-F127 ile F1, F2 ve F3 olmak üzere 3 farklı kombinasyonda formülasyon hazırlanmıştır ve formülasyonların içeriği **Tablo 4.1**'de verilmiştir.

Bu çalışma sonucunda en ideal formülasyon F1 olarak belirlenmiştir. F1 formülasyonunda kollajen, Pluronik çözeltisine sonradan eklenmiştir. Bunun sebebi, P-F127'in 2,5 saat ve 300 rpm'de ve düşük sıcaklıklarda çözdürülmek için ksürekli karıştırılmasıdır ve bu mekanik etkinin protein yapıdaki kollajeni denatüre etme ihtimalidir. Bu nedenle, Pluronik çözeltisi hazır hale getirildikten sonra, distile su içerisinde çözdürülmüş kollajen yavaşça 100 rpm'de Pluronik çözeltisine eklenmiştir.

F2 formülasyon çalışmasında Pluronik ile kitosanın jel oluşturma uyumuna bakılmıştır. Burada edinilen gözlemler F3 formülasyonuna öncülük etmiştir. Eczacılık ve doku mühendisliği alanında kitosanla ilgili pek çok çalışma mevcuttur. Kitosan hem alginat gibi biyopolimerlerle hemde Pluronik gibi sentetik polimerlerle kompozitler oluşturabilmektedir. Pluronic ve kitosanın uyumlu bir yapı oluşturduğu belirtilmiş birçok çalışma mevcuttur (Westerink ve ark., 2001; Kang ve ark., 2007).

F3 formülasyonu F1 ve F2'nin kombinasyonunu şeklinde düşünülmüştür. Diğer formülasyonlarda olduğu gibi F3 formülasyonunda da kollajen ve kitosan Pluronik çözeltisi hazırlandıktan sonra eklenmiştir. Ancak F3 formülasyonu, F1 ve F2 gibi istenilen özellikler göstermemiştir. Jel görünümünde bulanıklık, büyük misel oluşumları ve topaklanma gözlemlenmiştir. Bunun sebebinin, kollajenin ortamın pH değişimi ile fibril yapıya dönüşmüş ve bu fibrillerin bir araya toplanması ile homojen olmayan bir görüntü ortaya çıkmasına bağlanmıştır (Jiang ve ark. 2004). PBS ortamı pH değeri 7,4'tür bunun yanı sıra Pluronik pH'yı değiştirmez iken, kitosanın asidik ortamda çözündürülmesi mümkün olduğundan, kollajenin bu asidik ortamda yönelmek istediği globüler yapının viskoz bir ortam içerisinde sağlamaması sonucunda büyük partiküllerin oluşmasına sebep olmuştur (Jiang ve ark. 2004). Bunun önüne geçebilmek için ortamın

pH'sı ile oynanmıştır ancak, zamanla oluşturulan jelin stabilitesi bozulduğu gözlemlendiğinden formülasyona kitosanın eklenmesinden vazgeçilmiştir.

Bu elde edilen olumsuz sonuçlara rağmen bazı literatürlerde kitosan ve kollajenin birlikte kullanıldığı çalışmalar mevcuttur. Li ve ark., (2019) hücreye nüfuz eden bir peptid (CPP) (Oligoarginine, R8) ile takviye edilmiş kollajen/kitosan jel kompoziti hazırlamıştır. Kollajen /kitosan/CPP jel bileşiğinin *Staphylococcus aureus* büyümesini önleyebildiğini ve yaraları iyileştirme yeteneğinin iyi olduğunu bulmuşlardır. Fare testi sonuçları, kollajen /kitosan/CPP jelinin, tüm tedavilerde en yüksek iyileşme düzeyine, en hızlı iyileşme hızına sahip olduğunu gösterdi. 14 gün sonra, kollajen / kitosan / CPP jeli ile tedavi edilen grup, neredeyse tamamen yara yüzeyindeki iyileşme oranını $98 \pm 4,71$ olarak göstermiştir. Ek olarak, histopatolojik inceleme, kollajen / kitosan / CPP'lerin, granülasyon dokusu oluşumunu, kollajen birikimini artırarak ve yara dokusunda anjiyogenezi teşvik ederek deride yara iyileşmesini destekleyebileceğini göstermiştir.

Yine Lewandowska-Lańcucka ve ark., 2019 *in situ* enjekte edilebilir kollajen, kitosan ve hyaluronik asit bazlı çok bileşenli kemik dokusu mühendisliği uygulamaları için biyomimetik hibrit jel hazırlamıştır. Yüzeyi modifiye edilmiş silika partikülleri formundaki biyoaktif faz, biyopolimerlerin çözeltilerine eklenmiştir ve aynı anda hem biyopolimer matrisi hem de dağılmış partiküller ile 37 ° C'de çapraz bağlanmıştır. Burada sunulan yeni yaklaşım, yüzeyleri amino gruplarıyla işlevsel hale getirilmiş priory olan silika parçacıklarının kullanımını içermektedir. Bu modifikasyon, silika parçacıklarının genipin ile çapraz bağlanma sırasında polimerik hidrojel ağına kovalent bağlanmasını mümkün kılmıştır. Farklı çalışmalarda olsa kollajen ve kitosanın beraber kullanıldığı ve yüksek verim alındığı literatürler mevcuttur. Bu noktada kitosan sünger disklerinin iskele oluşturacak şekilde hazırlanması ve F1 formülasyonunu içerisine emdirme fikri ortaya çıkmış ve çalışmalar gerçekleştirilmiştir.

5.2. In Situ Jel Formülasyonlarının Fizikokimyasal Özelliklerinin Belirlenmesi

Hazırlanan formülasyonların eklem sıvısı ortamında sergileyeceği fiziksel ve kimyasal davranışlar hakkında bilgi sahibi olabilmek için bazı çalışmalar gerçekleştirilmiştir. Bu bilgiler beraber olarak değerlendirildiğinde formülasyonların fizikokimyasal yapıları hakkında genel bir görüş oluşturulmuştur.

5.2.1. Jelleşme kapasitesinin belirlenmesi

Doğru bir gözlem için metilen mavisi eklediğimiz P-F127 ve F1 formülasyonunun jelleşme kapasitesi Tablo 5.3'te verilmiştir. Ayrıca % 20'lik P-F127 'nin jelleşme kapasitesi görsel olarak Şekil 5.3'te verilmiştir. F2 ve F3 formülasyonlarının jelleşme kapasitelerine bakılmamıştır. F3 formülasyonunda bulunan kitosana bağlı olarak kollajenin formülasyon içindeki kararlılığının gözle görülür düzeyde bozulması nedeniyle kitosan içeren formülasyonlardan vaz geçilmiş ve bunlar üzerinde yapılacak karakterizasyon çalışmaları durdurulmuştur. Kitosanın hücre yenileyici özelliğinden vaz geçilmemesi amacıyla da kitosan sünger disklerin hazırlanmasına karar verilmiştir. Projenin çıkış noktası kollajen içeren bir *in situ* bir jel hazırlamak olduğu için, P-F127 ve denizanası kollajeni içeren F1 formülasyonu ve P-F127 jeli üzerinde çalışmalar sürdürülmüştür.

Tablo 5.3. *Formülasyonların jelleşme kapasitesi*

Formülasyon	Jelleşme Kapasitesi
P-F127	+++
F1	+++



Şekil 5.3. *P-F127 Jelleşme kapasitesi deneyi*

Enjekte edilebilir özellikteki hazırladığımız jelin eklem boşluğuna aktarıldığı an eklem sıvısında göstereceği özelliğin belirlenmesi için yapılan jelleşme kapasitesi deneyesi görsel olarak değerlendirilmiş ve bölüm 4.2.1'de sunulan tablo 4.5'e göre 'Jelleşme anında oluştu ve uzun süre sürdü' değerlendirilmesi elde edilmiştir.

5.2.2. Şişme çalışması

P-F127 termal duyarlı bir hidrojeldir dolayısıyla sulu ortamda şişme eğilimi göstermektedir. Hidrojeller, çapraz bağlı hidrofilik homopolimerlerin ya da kopolimerlerin su ile şişen üç boyutlu ağ yapılı bileşikleridir (Byrne ve ark., 2002).

Şişme, camsı fazdan, kauçuğumsu faza geçişi gösteren sürekli bir prosestir. Polimerlerin dinamik şişme özellikleri; çözücü absorpsiyon hızını, denge şişmesine yaklaşım hızını ve çözücü ilerleme hızını kontrol eden transfer mekanizmasını içerir. Çözücünün absorpsiyon hızı, birim zamanda alınan çözücü miktarını belirtir ve doğrudan polimerin şişme denge derecesiyle bağlantılıdır. Hidrojellerin şişme dengesi oranı, denge anında hidrojinin yapısına aldığı suyun miktarını gösterdiğinden önemli bir parametredir (Ruiz ve ark., 2001).

Doku genişletme amaçlı yapılan bir hidrojel çalışmasında, p[akrilamit(AAm)-ko-hidrosietilmetakrilat(HEMA)] hidrojellerinin denge su içerikleri, AAm/HEMA mol oranı % 94,5/5.5 olduğunda yaklaşık % 600; AAm/HEMA mol oranı % 81/19 olduğunda yaklaşık % 450 ve AAm/HEMA mol oranı % 68/32 olduğunda yaklaşık % 300 olarak ölçülmüştür. HEMA konsantrasyonunun artmasıyla hidrojeldeki hidrofilik grup sayısı azaldığından hidrojellerin denge su içeriğinin azaldığı saptanmıştır (Sop, 2013).

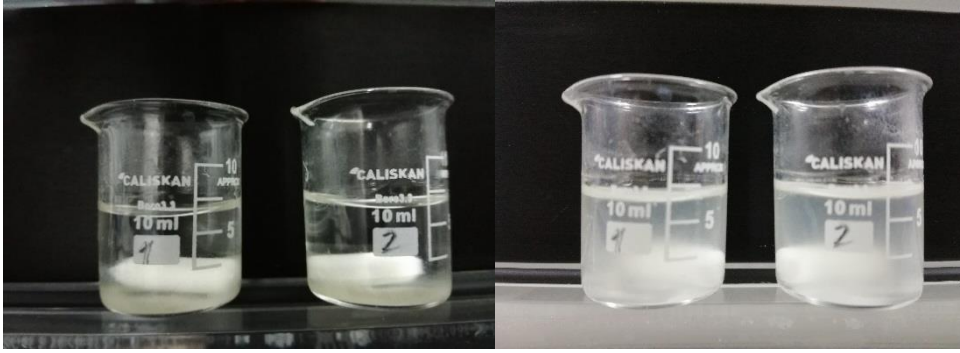
Tablo 5.4'te F1 formülasyonunun şişme oranı gösterilmiştir. Burada 4. Saatte dengeye geldikten sonra azalma gerçekleşmiştir. F1 formülasyonu kollajen içermektedir, kollajen suyu seven bir materyaldir bu da membran içerisine PBS alımını hızlandırmıştır. Dolayısıyla şişme maksimuma ulaştıktan sonra basınçtan dolayı formülasyon membran dışına çıkmıştır ve ağırlık giderek azalmış ve sabit bir değere ulaşmıştır. Sonuç olarak, şişme deneyinde F1 Formülasyonu 4. Saatte maksimum düzeye ulaşmaktadır. Buda, F1 formülasyonunun eklem içersine enjekte edilmesinden sonra 4 saat içerisinde şişeceğini ifade etmektedir.

Tablo 5.4. *Formülasyonun Şişme oranı*

Zaman (saat)	Şişme Oranı (%)
1	7,36
2	8,66
3	9,04
4	10,23
5	7,66
6	7,60

5.2.3. Fiziksel görünüş ve saydamlık

Çalışılan çoğu sistemde olduğu gibi oluşturulan jel sistemleri de fizikokimyasal özellikleri bakımından incelenirken öncelikli olarak bakılması gereken fiziksel görünüş ve saydamlıktır. Birçok Çalışmada formülasyon içerisinde partikül olup olmadığı siyah ve beyaz arka planda ve ışık altında görsel olarak incelenir (Güven, 2016). P-F127 ve F1 formülasyonunun fiziksel görünüşü Şekil 5.4'te gösterilmektedir. P-F127'li formülasyonlar berrak bir renk iken içerisinde kollajen bulunan formülasyonların rengi sarımtırak ve hafif buğulu görülmektedir. Bunun nedeni pH 7,4'te kollajenin fibril yapıya sahip olmasına bağlanmıştır (Jianga ve ark. 2004).



Şekil 5.4. Formülasyonların fiziksel görünüşü (Sol taraftaki P-F127 , sağ taraftaki F1 formülasyonu)

Formülasyonlar hazırlandıkları günden itibaren P-F127 jelde bir değişiklik gözlemlenmemiştir. F1 formülasyonunda ise zamanla beherin alt kısımları daha koyu olmuştur buda bize kollajenin zamanla çöktüğünü göstermektedir. Ancak çökme işlemi uzun sürede gerçekleşmekte ve tekrardan kısa bir karıştırma ile homojen hale getirilebilmektedir.

5.2.4. pH ölçümü

Formülasyonlar çalışma süresince pH 7,4 olan PBS ortamında hazırlanmıştır. P-F127 jel ve formülasyonlara ait pH değerleri Tablo 5.5'te gösterilmiştir. Ölçümler saklama koşulu olan 4 °C'de yapılmıştır.

Tablo 5.5. *Formülasyonların pH değerleri*

Formülasyonlar	pH değeri
P-F127	7,4
F1	7,9
F2	6,5

Formülasyonların, vücut içine enjekte edilebilir bir sistem olarak tasarlanması amaçlanmıştır. Bu doğrultuda pH değeri çok önem arz etmektedir. Sinovyal sıvı sıcaklığı 32 santigrat derecedir (periferik eklemler iç vücut sıcaklığından daha soğuktur). Normal pH'ı 7,4'tür. Hasar durumunda pH azalmaktadır, osteoartrit gibi rahatsızlıklarda pH yaklaşık olarak 7,4'ten 6,85'e düşer. Hastalıklı sinovyal sıvının düşük pH'ı normal hidrojen bağıını bozar ve kısmen hyaluronik asit yapısını ve konsantrasyonunu değiştiren sinovyal sıvı proteinlerini denatüre eder ve viskoziteyi azaltır (Roman ve ark., 2017).

Bu bilgiler doğrultusunda elde ettiğimiz sonuçları karşılaştırdıkça en ideal formül seçilen F1'in vücut pH'sı ile uyumlu olduğu ve enjeksiyon sonrasında pH'ya bağlı herhangi bir rahatsızlık vermeyeceği düşünülmektedir.

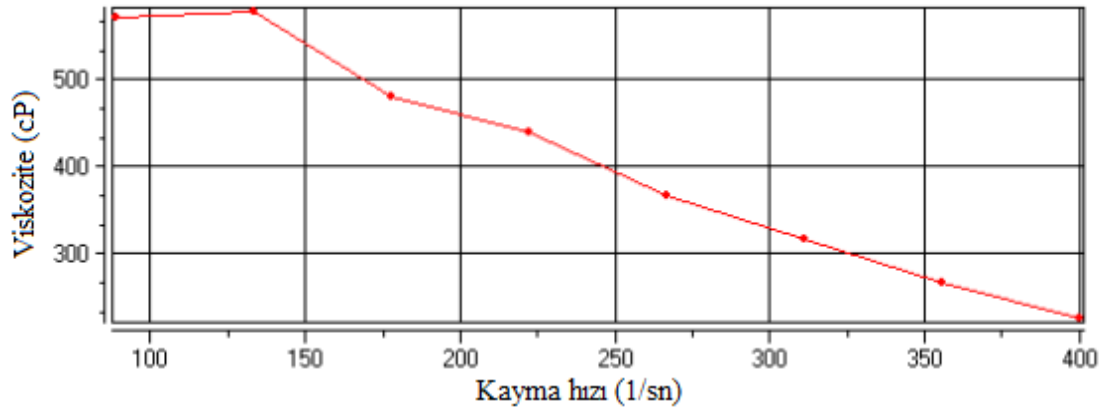
5.2.5. Reolojik davranışın incelenmesi

Reolojide, Newtonyen akış özelliğine sahip sıvının kayma hızına karşı kayma gerilimi doğrusal iken Newton olmayan modelde kayma hızına karşı kayma geriliminin parabolik artış gösterdiği belirtmiştir. Bunun yanı sıra Newton akış gösteren sıvının viskozite değerleri kayma hızından bağımsız olarak her noktada aynıdır. Ancak Newton olmayan akışta plastik ve psödoplastik akış gösteren sıvıda viskozite kayma hızıyla azalırken, dilatan akışta viskozite kayma hızıyla artmaktadır (Barnes ve ark., 1989).

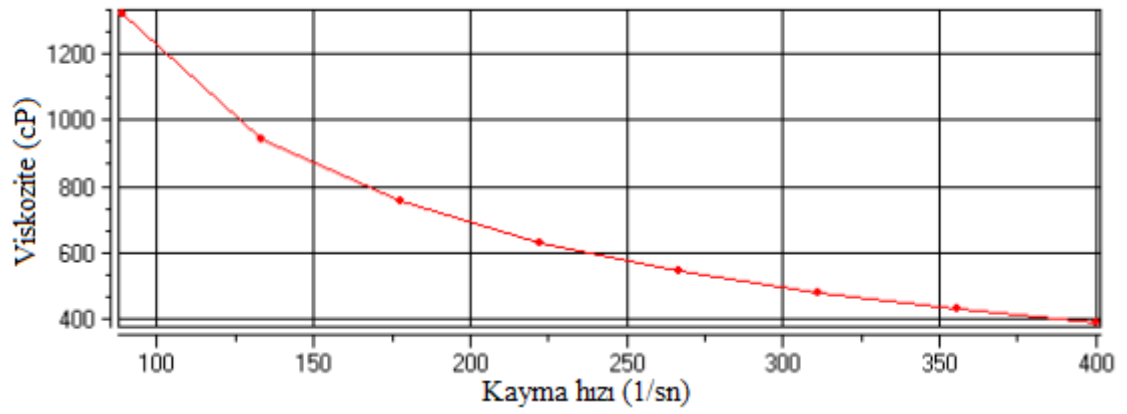
P-F127 ile yapılan bir çalışmada, hazırlanan formülasyonların 25 °C'de çizilen kayma hızına karşı kayma gerilimi ve viskozite grafikleri incelenmiştir. Sabit kalan viskozite ve doğrusal olarak artış gösteren kayma gerilimi süspansiyonların oda sıcaklığında Newton akış gösterdiğini kanıtlamıştır. 37 °C'de çizilen grafiklerde ise kayma gerilimi belirli bir değerden başlayarak parabolik olarak hızlı artış göstermiş ve sonrasında bu artış azalarak ilerlemiştir; ayrıca formülasyonların viskozite değeri kayma hızına bağlı olarak azaldığı saptanmıştır. Kayma hızının sıfıra en yakın olduğu noktada kayma geriliminin yüksek olması psödoplastik akış gösterdiğini kanıtlamaktadır. Bu durum formülasyonların oda sıcaklığında akışkan bir süspansiyon halindeyken vücut içerisinde katı jel halini aldığını gösteren diğer bir parametredir (Özer, 2018).

Başka bir *in situ* jel çalışmasında hazırlanan jel formülasyonları da 25°C’de sıvı halde çözeltiye benzer şekilde Newton akış gösterirken, göz sıcaklığı olan 32°C’de jelleşerek psödoplastik akış göstermiştir. Jelleşme sonrası viskozitenin hızlı artış göstermesi formülasyonun gözde kalış süresinin uzatacağı belirlenmiştir (Güven, 2016).

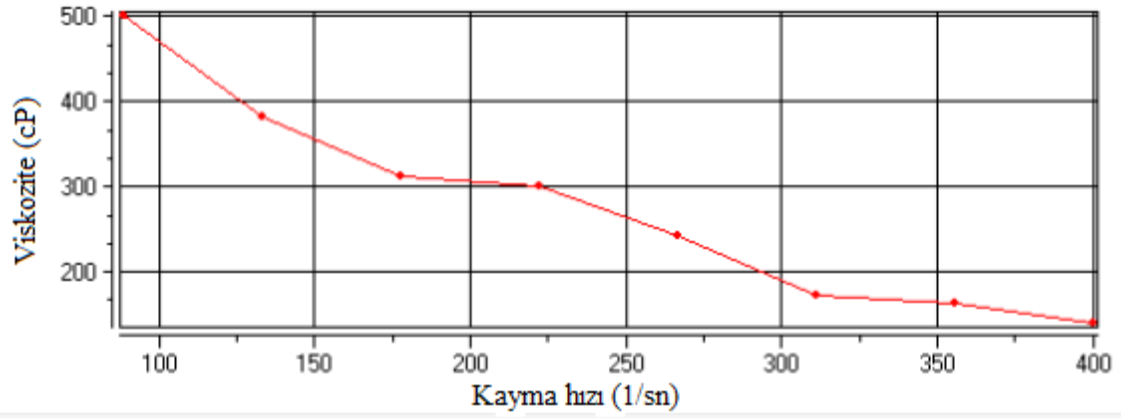
P-F127 ve F1 formülasyonuna ait reogramlar Şekil 5.5, Şekil 5.6, Şekil 5.7 ve Şekil 5.8 ‘deki gibidir. Grafiklerde görüldüğü gibi sıcaklık artışıyla beraber viskozitede değeri de artmaktadır. Bu çalışmada 25 °C’de P-F127 ile F1 formülasyonu yaklaşık % 95 oranında Casson akış modaline uygunluk göstermiştir. 37 °C’de ise Herschel-Bulkley akış modeline uydukları saptanmıştır. 25 °C’de F1 formülasyonun vizkoziteyi kayma hızı artışıyla beraber daha hızlı düşürdüğü görülmüştür. Bunun yanı sıra 37 °C’de F1 formülasyonundaki kollajen içeriğinin etkisiyle viskozitenin daha yüksek olduğu görülmüştür. Ancak kayma hızına karşı vizkozite değişimi P-F17 formülasyonu ile aynı parabolik eğriyi göstermiştir. Elde edilen viskozite değerleri ve Hagen-Poiseuille denkleminde yola çıkarak oda sıcaklığında F1 formülasyonunun standart bir şırınga ve uzman kişinin uyguladığı ortalama basınç ile enjekte edilebilir olduğu saptanmıştır (Allmendinger ve ark. 2014).



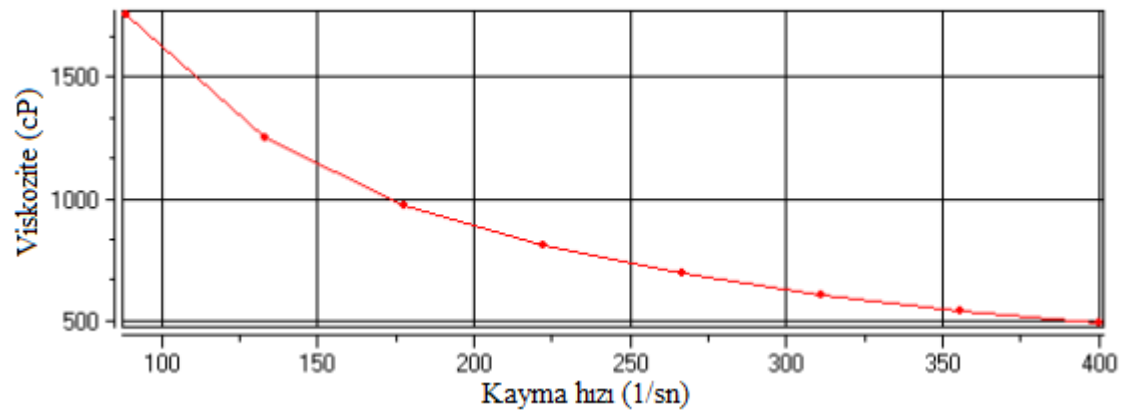
Şekil 5.5. 25 °C’deki P-F127’ye ait reogram



Şekil 5.6. 37 °C'deki P-F127'ye ait reogram



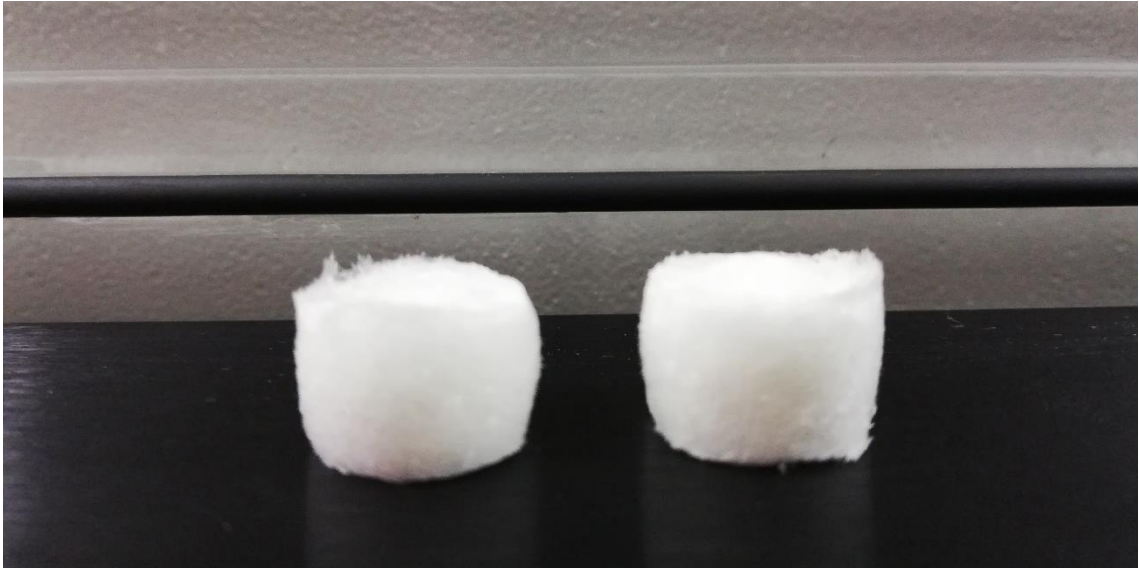
Şekil 5.7. 25 °C'deki F1 formülasyonuna ait reogram



Şekil 5.8. 37 °C'deki F1formülasyonuna ait reogram

5.3. Kitosan Disklerinin Karakterizasyonu

Bu kısımda, F3 formülasyonundaki kollajen ile ilgili gelişen kararlılık sorunu nedeniyle, kitosanın yara iyi edici özelliğinden faydalanılmak amacıyla, *in situ* jelin emdirilebileceği bir ortamın oluşturulması için hazırlanan kitosan sünger disklerin analizleri yapılmıştır. Bu diskler, tam kat hasarlı eklem için uygulanacak cerrahi müdahale sırasında o bölgeye yerleştirilebilecek nitelikte biyouyumlu olacak şekilde ve belirli zamanlarda F1 formülasyonunun içerisine enjeksiyonu gerçekleştirebilme kurgusu ile geliştirilmişlerdir. Böylelikle, hasarlı dokunun süngerimsi disk ile birbirine sürtünmesi azaltılacak, kitosanın temas ettiği bölgede hücre yenilenmesi sağlanacak ve içerisine enjekte edilen jelin daha uzun süre kalması ve kontrollü salınması mümkün olacak, jelin içerdiği kollajenin ise bu sayede biyoyararlanımı artacaktır. Plakalara konarak liyofilize edilmiş kitosan çözeltisinden elde edilen sünger disklerin görüntüsü Şekil 5.9'da verilmiştir.



Şekil 5.9. Kitosan diskler (yaklaşık olarak 1cm yarıçap ve 2cm yüksekliğe sahip)

Doğal bir biyopolimer olan kitosan, mükemmel hidrofilikliğe, biyobozunurluğa sahiptir, hücre büyümesini destekler ve kıkırdak dokularının glikozaminoglikan bileşenini taklit eder. Bu nedenle, kitosan yapışma proteinleri veya mevcut büyüme faktörleriyle etkileşime girebilir. Bu avantajları sayesinde kitosan, kıkırdak dokusu mühendisliği için iskele geliştirilmesinde yaygın olarak kullanılmıştır (Singh ve Pramanik, 2018). Diğer malzemelerle olan kitosan yapı iskeleti kompozitleri de

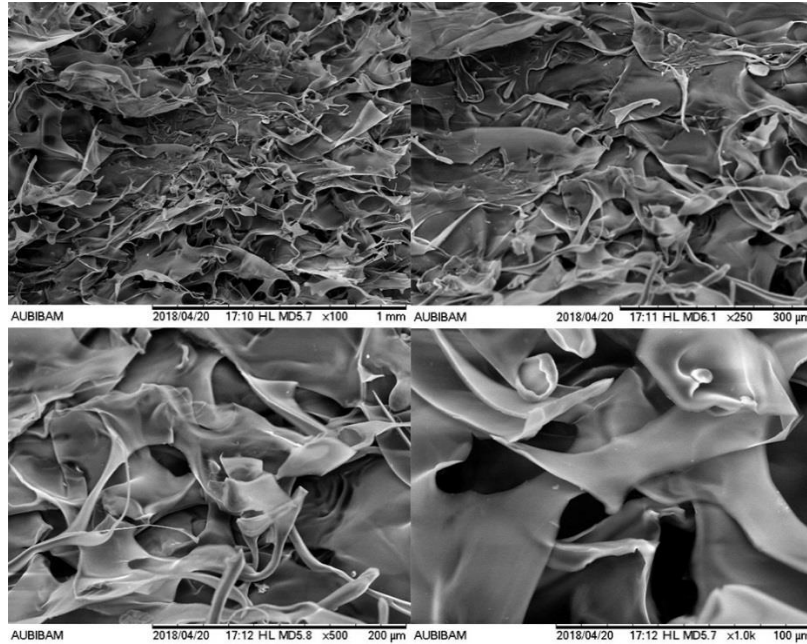
araştırılmıştır. Kollajen tip II, kondrosit kümelerinin *in vitro* yapışmasını artırmak için yaygın olarak kullanılır (Hu ve Nukavarapu, 2019).

Kollajen ve kitosanın üstün özellikleri birleştğinde kıkırdak dokusu için yüksek miktarda fayda sağlamaktadır. Kitosanın disklerinin iskele olarak kullanılması ve kollajenin hidrojel olarak bu iskele içerisine enjeksiyonunun, ciddi kusurlarda ortam reolojisinin düzenlenmesinde ve hücre göçünün engellenmesinde büyük avantaj sağlayacağı ön görülmektedir.

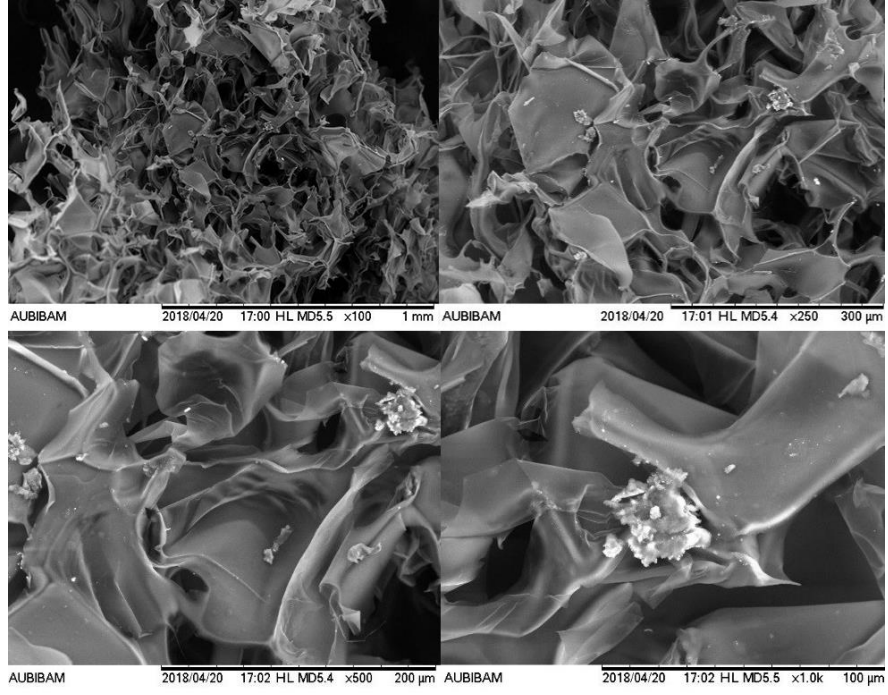
5.3.1. Kitosan disklerin SEM (Taramalı elektron mikroskopu) analizi

Hücrelerin doku iskeleleri, doku mühendisliğinde hücre çoğalması ve farklılaşması açısından önemlidir. Hücreler iskele yüzeyine tutunur ve yayılma gösterir. Bu nedenle kitosan disklerin morfolojik yapılarını incelemek amacıyla SEM analizi gerçekleştirilmiştir.

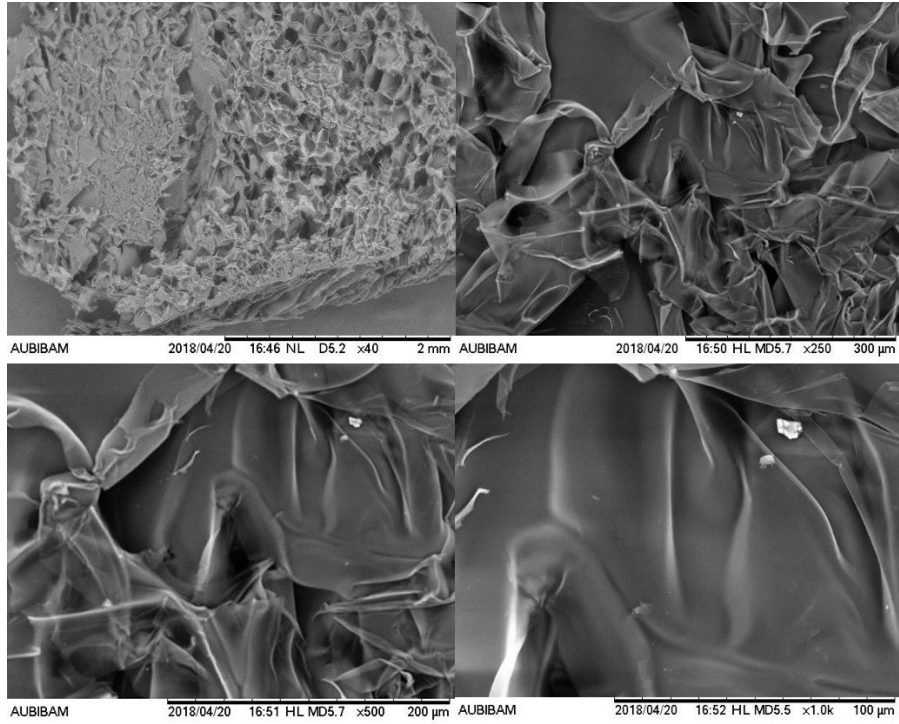
Üç farklı yoğunlukta hazırlanan kitosan disklerin SEM görüntüleri yüksek, orta ve düşük yoğunluklu olmak üzere sırasıyla Şekil 5.10, Şekil 5.11 ve Şekil 5.12’de gösterilmiştir. Yüzdelik oranları farklı olmakla birlikte tüm disklere aynı prosedür uygulanmıştır.



Şekil 5.10. Yüksek yoğunluklu kitosan disklerin çeşitli oranlarda ($\times 1.0k$ - $\times 500$ - $\times 250$ - $\times 100$) büyütülmüş masa üstü SEM görüntüleri



Şekil 5.11. Orta yoğunluklu kitosan disklerin çeşitli oranlarda ($x1.0k$ - $x500$ - $x250$ - $x100$) büyütülmüş masa üstü SEM görüntüleri



Şekil 5.12. Düşük yoğunluklu kitosan disklerin çeşitli oranlarda ($x1.0k$ - $x500$ - $x250$ - $x40$) büyütülmüş masa üstü SEM görüntüleri

Elde edilen görüntüler doğrultusunda yüksek yoğunluklu kitosan diskin daha rijit ve por büyüklüğünün daha fazla olduğu, gözenek boyutunun ve dağılımının daha tekdüze olduğu görülmüştür. Bu da por büyüklüğü ve dağılımının kitosanın yoğunluğu ile ilişkili olduğunu göstermektedir.

Xu ve Ark. (2017), kitosanın iyonik kuvvetine ve pH'a bağlı çözünürlüğüne dayanarak, yüksek mekanik mukavemet ve ayarlanabilir bir morfoloji elde etmek için yeni bir yöntem ile gözenekli kitosan yapı iskeleleri geliştirilmiştir. Harici çapraz bağlama maddesi olmadan, kitosan yapı iskeleleri, kitosan çözeltisinin konsantrasyonunu veya pH'ını değiştirmek gibi başka yöntemlerle geliştirilmiştir. Bununla birlikte, bu yöntemler, kitosanın düşük çözünürlüğü ve yüksek viskozitesi ile kesin olarak sınırlandırılmıştır. Çünkü kitosan yapı iskelelerinin yapısını ve özelliklerini kontrol etmek zordur. Dahası, bu yöntem harici çapraz bağlama ajanları, farklı enstrümanlar ve / veya teknik yeterlilik gerektirmez ve seri üretim için uygun şekilde ölçeklendirilebilir.

Disklerin oluşturulma amacı hazırlanan formülasyonu emdirmek bundan dolayı elde edilen veriler yeterli görülmüştür. Gözeneklerin ortalama boyutu SEM görüntülerine göre değerlendirildiğinde sırasıyla yaklaşık olarak 30-160µm, 20-180µm ve 30-100µm arasında değişmektedir. Gözenek boyut dağılımına bakıldığında bir düzensizlik mevcuttur. Bu durum görüntülerin alındığı kitosan disk lokasyonundan veya yöntemdeki parametrelerin birinden kaynaklandığı düşünülmektedir.

5.3.2. Kitosan disklerin dezentegrasyon çalışması

Po-Hui Chen ve ark. kitosan bazlı malzemelerin ek enzimler yardımı olmadan parçalanmasını hızlandırmak ve daha ekonomik bir yol sağlamak için kitosan-pektin kompozit membran çalışmasını gerçekleştirmiştir. Kompozit membranın parçalanması birkaç açıdan dikkate alınmıştır. Pektin için, sulu ortamdaki aşırı yüksek çözünürlük sınırlanmış ve kitosan, pektini iyonik etkileşimlerle stabilize etmiştir. Ayrıca pektinin sulu bir ortamda sürdürülebilirliği arttırılmıştır. Kitosan için, pektin ile kompozit oluşturmak parçalanmayı hızlandırmak için uygun bir yol olduğu saptanmıştır. Kitosan çok yavaş parçalanma oranı olan bir malzeme olduğundan dolayı bazen eleştirilmektedir (Chen ve ark., 2010).

Başka bir çalışmada Pavoni ve ark. Nişasta ve kitosan arasındaki etkileşimi, geliştirilen filmlerin biyobozunurluğu üzerinden etkisi değerlendirilmişlerdir. Bu çalışma, kitosan çözünürlüğü ve nişasta için kullanılan, asetik ve laktik asit çözeltilerin

(% 1 v/v) etkisiyle, mısır nişastası / kitosan bazlı filmlerin özelliklerini belirlemeyi amaçlamıştır. Filmler, döküm yoluyla hazırlanmış ve su buharı geçirgenliği, çekme dayanımı, uzama, elastik modül, antimikrobiyal aktivite ve biyobozunurluk analizleri belirlenmiştir. Biyolojik bozunma testleri için, tüm numuneler 15 gün sonra bozulmaya başladığı saptanmıştır. Ek olarak, tüm numunelerin 180 günden önce bozunmaya başladığı vurgulanarak plastik bir malzemeye göre avantajlı olduğu saptanmıştır (Pavoni ve ark., 2019).

Ağırlıkları belirli 3 farklı yoğunlukta 6 farklı kitosan disk'in 1 ay boyunca PBS ortamında ki dağılma verileri Tablo 5.6'da verilmiştir. Burada ki amaç sinovyal sıvı pH ortamında kitosan disklerin biyobozunurluk düzeyini belirlemektir.

Tablo 5.6. Kitosan disklerin ağırlık tablosu (n=2)

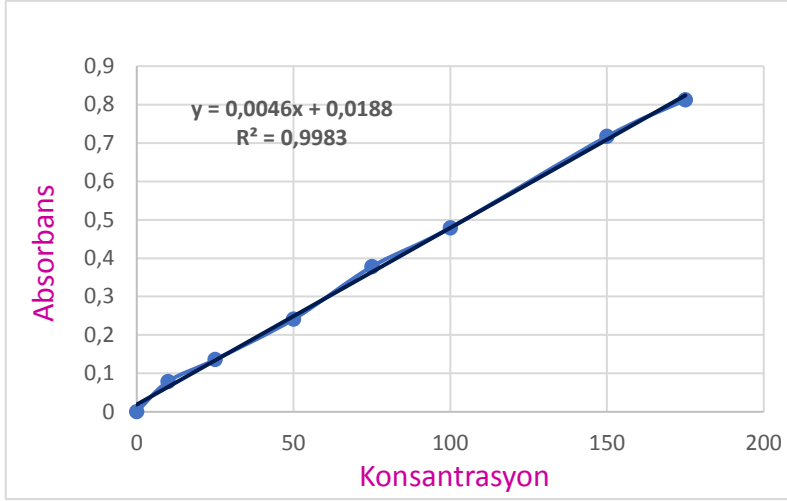
Kitosan Diskler			
Ortlama Disk ağırlıkları (mg)	Düşük yoğunluklu	Orta yoğunluklu	Yüksek yoğunluklu
Salımdan önce	37,525	34,675	26,325
30. Gün	34,475	33,025	25,370
Çözünme (%)	8,130	4,760	3,630

Elde edilen sonuçlara göre kitosanın 30 gün içerisindeki biyobozunurluk oranı yaklaşık olarak % 3,630 ila % 8,130 arasında saptanmıştır. Kitosanın cerrahi müdahale ile eklem içerisine yerleştirildikten sonra uzun süreli kalışının söz konusu olacağı düşünülmektedir. Bu çalışmada disklerin üzerine uygulanan herhangi bir kuvvet yoktur, bu nedenle herhangi bir basınç olmadan sıvı sirkülasyonu ile biyodegradasyonu 1 ay süreyle araştırılabilmiştir. Ayrıca, kirdak doku bölgesinde hücrede yoğunluğu olacağından biyodegradasyonun daha hızlı olması beklenmektedir.

5.4. In Situ Jelin In Vitro Salım Çalışmaları

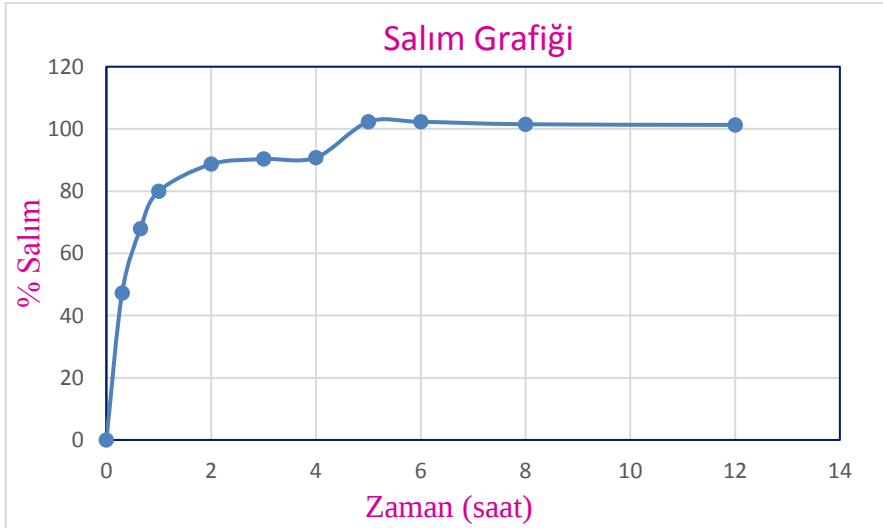
5.4.1. Emdirme yöntemine ait salım

Kollajene standart eğri, kollajenin PBS içindeki belirli konsantasyonları kullanılarak UV Spektrofotometre ile 280 nm dalga boyunda belirlenmiştir (Şekil 5.13). Kör ortamı olarak her konsantrasyona karşılık gelen ve P-F127 içeren PBS kullanılmıştır. Elde edilen grafik daha sonra salım çalışmasında kullanılmıştır. Çok üstün bir yöntem olmamasına rağmen, salım deneyinde ki elde edilen verilerin miktar analizleri için pratik bir yöntem olarak kullanılmıştır.



Şekil 5.13. Kollajene ait UV standart eğrisi

Salım çalışmaları 3 paralel deney ile gerçekleştirilmiştir. Kullanılan Sotax dissolüsyon hücrelerinin 3 tanesine F1 formülasyonunun bilinen miktarda emdirildiği kitosan disk yerleştirilmiştir, bir hücre sine de P-F127 jeli emdirilmiş disk konmuştur. Salım 12 saat boyunca gerçekleştirilmiştir. Belirlenen her saatte alınan örnekler, o saat dilimlerinde alınan P-F127'li örnekler kör olarak kullanılmıştır. Daha sonra UV spektrofotometresinden alınan sonuçlarla önce kümülatif salım hesaplanmış ve grafiğe aktarılmıştır (Şekil 5.14).



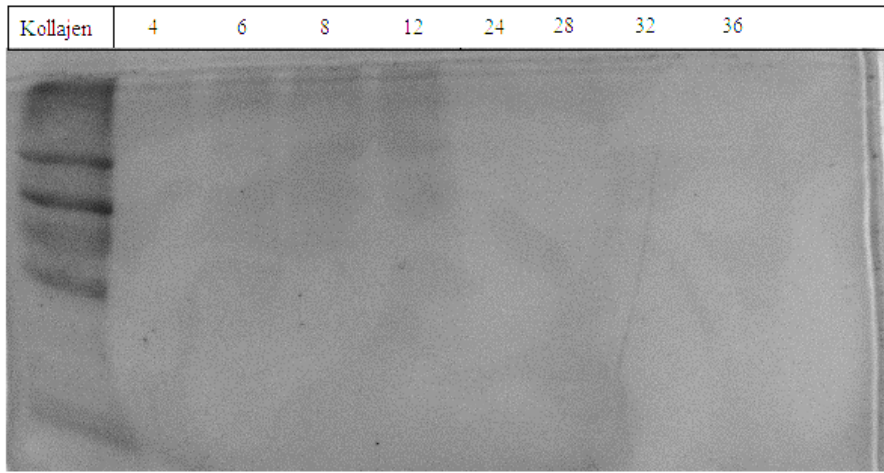
Şekil 5.14. Kollajenli formülasyonun salım grafiği

Salım profiline göre 5. saat sonunda kollajenin disklerden tamamen salındığı gözlenmiştir. Bu sonuç, beklenen uzatılmış salım profilinden uzak görülmektedir. Bunun nedeninin, kullanılan sotax hücresinin ızgarası üzerinde mebran bulunmaması ve

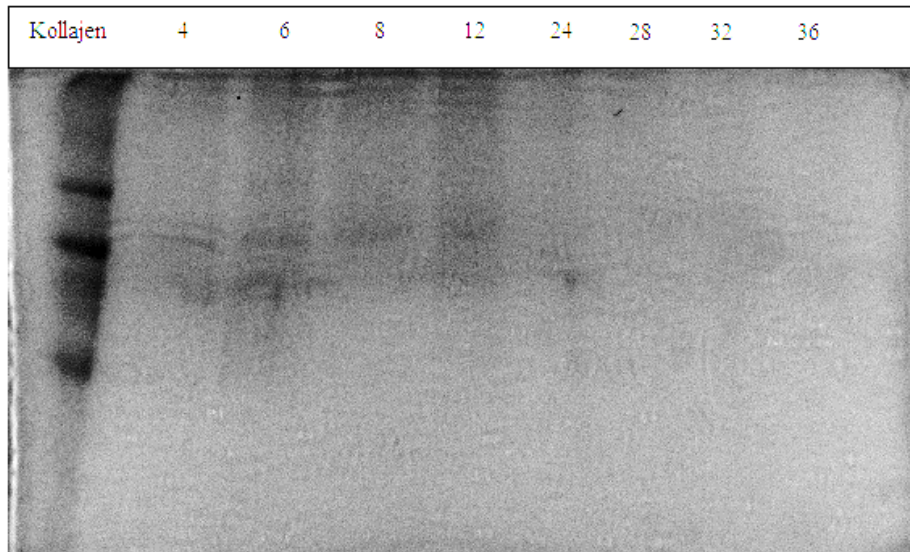
çözünme ortamı ile disklerin daha hızlı teması olduğu düşünülmektedir. Bu nedenle, ikinci bir salım çalışması hazırlanmıştır.

5.4.2. Enjekte etme yöntemine ait salım

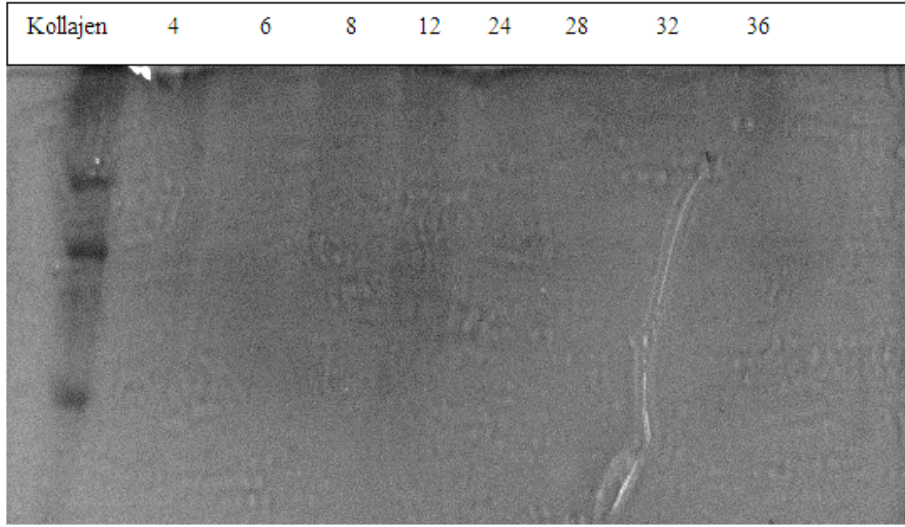
Salım işlemi ideal sonuç verebilmesi için 5 paralel numune ile gerçekleştirilmiştir. Totalde 1 disk P-F127 'li jeli içerirken diğer 5 disk F1 formülasyonu içermektedir. Düşük, orta ve yüksek olmak üzere 3 farklı yoğunlukta disk kullanılmıştır. Salım 36 saat boyunca gerçekleştirilmiştir. Numunelerden saat başı 500 µL örnek alınmıştır ve SDS-PAGE ile salım profili değerlendirilmiştir. Bu sonuçlar Şekil 5.15, Şekil 5.16 ve Şekil 5.17’de gösterilmiştir.



Şekil 5.15. Düşük yoğunluklu kitosan disk salım görüntüsü



Şekil 5.16. Orta yoğunluklu kitosan disk salım görüntüsü



Şekil 5.17. Yüksek yoğunluklu kitosan disk salım görüntüsü

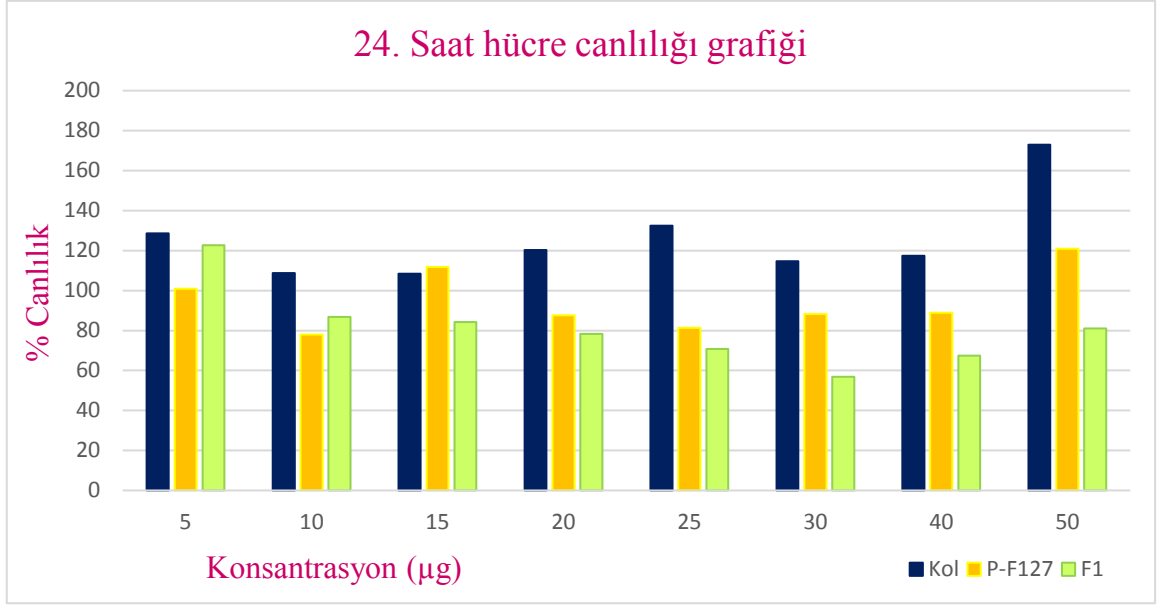
Jha ve ark. (2011) kollajen esaslı doku iskelesi tasarımı çalışmasında farklı sıcaklıklarda kollajenin SDS-PAGE görüntülerini karşılaştırmıştır. 4 °C'de tutulan protein fraksiyonları 1 saat boyunca 50, 60, 70, 80 veya 90 °C'ye ısıtılmıştır. Isıtmaya maruz kalan tüm numunelerin, SDS jellerinde bulunan protein bantlama modellerinde saptanabilir değişiklikler görülmüştür. Kollajen 70 °C'ye maruz kaldığında kollajen ait zincirlerinin % 50'sinin 1 saat içinde kaybolduğunu saptanmıştır.

Bu çalışmada elde edilen sonuçlar doğrultusunda maksimum salımın 12. Saate gerçekleştiği jel görüntülerinden anlaşılmaktadır. Daha sonra yoğunluğun azaldığı görülmektedir.

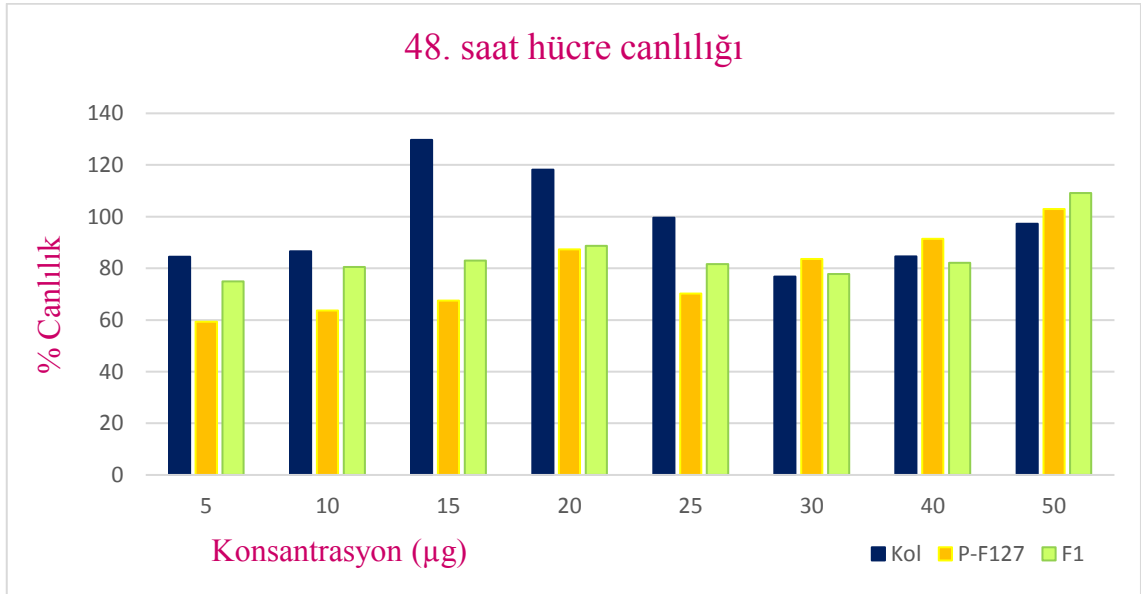
Emdirme yönteminde kullanılan Sotax hücreleri ile yapılan çalışma ile karşılaştırıldığında, disklerin çözücü ortamı ile temasının azaltılması sonucunda salımın yavaşladığını gözlenmiştir.

5.6. Sitotoksosite ve Hücre Çoğalması Çalışması

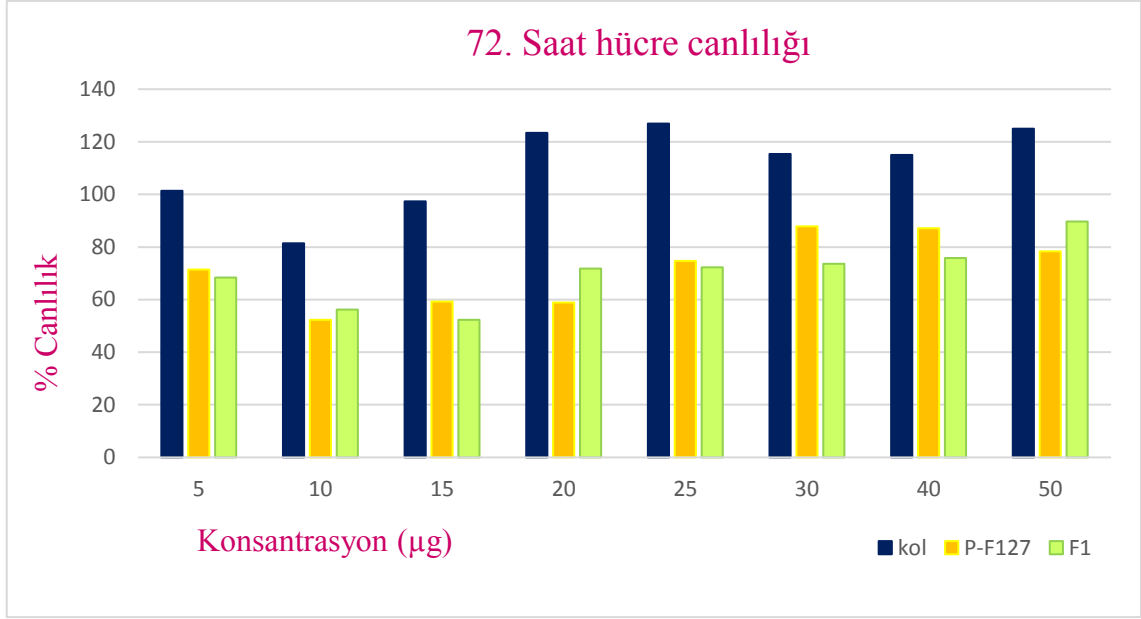
Formülasyon uygulanmış hücrelerin MTT testi ile yapılan sitotoksosite sonuçları Şekil 5.18, Şekil 5.19 ve Şekil 5.20'de verilmiştir.



Şekil 5.18. 24. Saatteki hücre canlılık grafiği



Şekil 5.19. 48. Saatteki hücre canlılık grafiği



Şekil 5.20. 72. Saatteki hücre canlılık grafiği

Grafiklerde görüldüğü üzere sadece denizanası kollajeni uygulanmış plakalarda hücre canlılığının % 172'ye kadar çıktığı belirlenmiştir. F1 formülasyonunun ve P-F127 jelinin toksik özellik göstermediği gözlemlenmiştir. F1 formülasyonunun içerdiği kollajenin, kollajen çözeltisine benzer etki göstermemesinin sebebinin, besiyeri ortamının sirkülasyonlu bir ortam olmaması ve kollajenin hücrelere yoğunlaşan jel nedeniyle salınarak ulaşamamasından kaynaklandığı düşünülmektedir. Yap ve Yang (2016), L929 fare fibroblast hücrelerini içeren P-F127, karboksimetil heksanoil kitosan (CA) ve glutaraldehitten (GA) oluşan yeni bir hidrojel sistemini geliştirmiştir. In vitro hücre kültürü çalışması, F-127/CA/GA hidrojellerinin sitotoksik olmadığını ortaya koymuştur. Dahası, kapsüllenmiş L929'un canlılığı 5 günlük kuluçkadan sonra %106 oranına ulaştığı belirtilmiştir. Bu sonuçlara dayanarak, bu F127/CA/ GA hidrojelleri doku mühendisliği uygulamaları için hücreleri kapsüllemek için kullanılabilir özellikte olduğu belirtilmiştir (Yap ve Yang, 2016). Bu bilgi dahilinde, P-F127'nin toksik olmadığı ve hücrelerin jel ile daha uzun süre ile muamele edildiğinde çoğalmalarının mümkün olacağına işaret etmektedir.

6. SONUÇ ve ÖNERİLER

Bu tez çalışmasında, kartilaj doku hasarı onarımı için alternatif jel formülasyonu geliştirmiştir. Bunun için ısı duyarlı FDA onaylı P-F127 sentetik polimeri kullanılmıştır. Hazırlanmış olan formülasyon, oda ısısında çözelti, sinoviyal zar geçilerek iki kıkırdak arasına enjeksiyonu sonrasında vücut sıcaklığında jelleşen özellik gösteren formda formüle edilmiştir. Bu jelleşme, formülasyonun içerdiği hücre yenileyici özellikteki denizanasından elde edilen kollojenin daha uzun süre eklem içinde kalmasını dolayısıyla hasarlı kıkırdak dokuyla temasının arttırılmasını sağlayacak karakterdedir. Aynı zamanda uygulanması kolay, üretim maliyetleri ucuz, biyouyumlu, onarıcı, cerrahi operasyona olan ihtiyacı azaltacak ve toksik olmayan bir formülasyon niteliğindedir.

Bu formülasyonun, eklem içerisinde daha uzun süre kalması ve enjeksiyon tekrarının azaltılması için, tam kat eklem hasarlı olgularda kullanılmak amacıyla kitosan sünger disklerin hazırlanması çalışmaya dahil edilmiştir. Böylelikle tam kat hasarlı eklem sorunları için gerekli olan cerrahi müdahale sırasında o bölgeye yerleştirilebilecek hücre yenileyici özellikte, biyouyumlu ve belirli zamanlarda F1 formülasyonunun içerisinde enjeksiyonunun gerçekleştirilebileceği bir kombin yapı elde edilmiştir. Böylelikle, hasarlı eklem bölgesindeki dokunun birbirine sürtünmesi, araya sokulmuş olan kitosan sünger disk ile azaltılacak, kitosanın temas ettiği bölgede hücre yenilenmesi sağlanacak ve içerisine enjekte edilen jelin daha uzun süre kalması ve kontrollü salınması mümkün, jelin içerdiği kollajenin ise bu sayede biyoyararlanımı arttırılmış olacaktır.

Gelecekte, hazırlanan bu sistemin *in vivo* çalışmaları ve bu çalışma baz alınarak, hazırlanan jelin içerisine kollajen haricinde/birlikteliğinde farklı tedavi edici ajanlar (büyüme hormonları, antienflamatuvar ilaçlar gibi) da yüklenerek çalışmaların yapılması planlanmaktadır.

KAYNAKÇA

- Abbas, K., Boutier-Pischon, A., Auger, F., Françon, D., Almario, A., & Frapart, Y. M. (2016). In vivo triarylmethyl radical stabilization through encapsulation in Pluronic F-127 hydrogel. *Journal of Magnetic Resonance*, **270**, 147-156.
- Abrams, M. J., & Goentoro, L. (2016). Symmetrization in jellyfish: reorganization to regain function, and not lost parts. *Zoology*, **119**(1), 1-3.
- Almeida, H., Amaral, M. H., Lobao, P., & Lobo, J. M. S. (2014). In situ gelling systems: a strategy to improve the bioavailability of ophthalmic pharmaceutical formulations. *Drug discovery today*, **19**(4), 400-412.
- Allmendinger, A., Fischer, S., Huwyler, J., Mahler, H. C., Schwarb, E., Zarraga, I. E., & Mueller, R. (2014). Rheological characterization and injection forces of concentrated protein formulations: an alternative predictive model for non-Newtonian solutions. *European journal of pharmaceuticals and biopharmaceutics*, **87**(2), 318-328.
- An, Y. H., & Martin, K. L. (Eds.). (2003). *Handbook of histology methods for bone and cartilage* (pp. 361-374). Totowa, NJ: Humana Press.
- Aydınlı, A. (1995). Göze uygulanan jel preparatlarının formülasyonu üzerine araştırmalar. Ankara Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü, Yüksek Lisans Tezi.
- Ayhan, E., Kesmezacar, H., & Akgun, I. (2014). Intraarticular injections (corticosteroid, hyaluronic acid, platelet rich plasma) for the knee osteoarthritis. *World journal of orthopedics*, **5**(3), 351.
- Barnes, H. A., Hutton, J. F., & Walters, K. (1989). Chapter 7. *An introduction to rheology*, 115
- Bassleer, C. T., Combal, J. P. A., Bougaret, S., & Malaise, M. (1998). Effects of chondroitin sulfate and interleukin-1 β on human articular chondrocytes cultivated in clusters. *Osteoarthritis and cartilage*, **6**(3), 196-204.
- Başaran, B. (2008). Siprofloksasin ve Hidroksipropil-beta-siklodekstrin kompleksini içeren oftalmik in-sitü jel formülasyonlarının geliştirilmesi ve değerlendirilmesi, Ankara Üniversitesi, Sağlık Bilimleri Enstitüsü, Farmasötik Teknoloji Anabilim Dalı, Yüksek Lisans Tezi.
- Benjamin, M., & Ralphs, J. R. (1998). Fibrocartilage in tendons and ligaments an adaptation to compressive load. *The Journal of Anatomy*, **193**(4), 481-494.

- Bijlsma, J. W., Berenbaum, F., & Lafeber, F. P. (2011). Osteoarthritis: an update with relevance for clinical practice. *The Lancet*, **377(9783)**, 2115-2126.
- Bobić, V. (1996). Arthroscopic osteochondral autograft transplantation in anterior cruciate ligament reconstruction: a preliminary clinical study. *Knee Surgery, Sports Traumatology, Arthroscopy*, **3(4)**, 262-264.
- Bobić, V., & Noble, J. (2000). Articular cartilage—to repair or not to repair. *The Journal of bone and joint surgery. British volume*, **82(2)**, 165-166.
- Breinan, H. A., Hsu, H. P., & Spector, M. (2001). Chondral defects in animal models: effects of selected repair procedures in canines. *Clinical Orthopaedics and Related Research®*, **391**, S219-S230.
- Brittberg, M., Lindahl, A., Nilsson, A., Ohlsson, C., Isaksson, O., & Peterson, L. (1994). Treatment of deep cartilage defects in the knee with autologous chondrocyte transplantation. *New england journal of medicine*, **331(14)**, 889-895.
- Buckwalter, J. A. (1998). Articular cartilage: injuries and potential for healing. *Journal of Orthopaedic & Sports Physical Therapy*, **28(4)**, 192-202.
- Byrne, M. E., Park, K., & Peppas, N. A. (2002). Molecular imprinting within hydrogels. *Advanced drug delivery reviews*, **54(1)**, 149-161.
- Chen, P. H., Kuo, T. Y., Kuo, J. Y., Tseng, Y. P., Wang, D. M., Lai, J. Y., & Hsieh, H. J. (2010). Novel chitosan–pectin composite membranes with enhanced strength, hydrophilicity and controllable disintegration. *Carbohydrate Polymers*, **82(4)**, 1236-1242.
- Chubinskaya, S., Haudenschild, D., Gasser, S., Stannard, J., Krettek, C., & Borrelli Jr, J. (2015). Articular cartilage injury and potential remedies. *Journal of orthopaedic trauma*, **29**, S47-S52.
- Chung, C., & Burdick, J. A. (2008). Engineering cartilage tissue. *Advanced drug delivery reviews*, **60(2)**, 243-262.
- Cıncık, H. (2000). Nazal septuma homogreft kartilaj implantasyonu, Gülhane Askeri Tıp Akademisi, Haydarpaşa Eğitim Hastanesi, Kulak Burun Boğaz Anabilim Dalı, İstanbul.
- Coutts, R. D., Healey, R. M., Ostrander, R., Sah, R. L., Goomer, R., & Amiel, D. (2001). Matrices for cartilage repair. *Clinical Orthopaedics and Related Research (1976-2007)*, **391**, S271-S279.

- Çalıkoğlu, A. C. (2011). Cartilage tissue engineering on three dimensional scaffolds using human tooth germ stem cells, Master's Thesis, Yeditepe University Department of Biotechnology, İstanbul.
- Çelik, E., Dejeneratif kıkırdak hasarlarına yönelik enjekte edilebilir hidrojel sistemlerinin geliştirilmesi ve karakterizasyonu, Doktora Tezi, Hacettepe Üniversitesi, Biyomühendislik Anabilim Dalı, Ankara, (2018).
- Çevirme, M. F. (2014). Deneysel olarak oluşturulan cerrahi sonrası travmatik kulak kıkırdak doku iyileşmesi üzerine botulinum toksin-a'nın etkisi, Uzmanlık Tezi, İstanbul Üniversitesi Cerrahpaşa Tıp Fakültesi, Plastik, Rekonstrüktif ve Estetik Cerrahi Anabilim Dalı, İstanbul.
- De Wolf, F. A. (2003). Chapter V Collagen and gelatin. *Industrial Proteins in Perspective*, 133–218.
- Demirdögen, B. (2012). Kıkırdak doku onarımı için hiyalüronik asit temelli yapı iskelelerinin geliştirilmesi ve hücre kültürlerinde kullanımı, Doktora Tezi, Ankara Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü, Kimya Anabilim Dalı, Ankara.
- Dubey, N. K., & Deng, W. P. (2018). Polymeric gels for cartilage tissue engineering. In *Polymeric Gels* (pp. 505-525). Woodhead Publishing.
- Duyar, H. A., & Sönmez, G. (2006). Denizanası İşleme Teknolojisi. *E.Ü. Su Ürünleri Dergisi* **23**, 403-405.
- Drury, J. L., & Mooney, D. J. (2003). Hydrogels for tissue engineering: scaffold design variables and applications. *Biomaterials*, **24(24)**, 4337-4351.
- Erdoğan, N. D. (2012). Kıkırdak greftle birlikte enjektabl dolgu maddesi kullanımının, kıkırdak sürvisine etkilerinin araştırılması, Tıpta Uzmanlık Tezi, Eskişehir Osmangazi Üniversitesi Tıp Fakültesi, Kulak Burun Boğaz Hastalıkları Anabilim Dalı, Eskişehir.
- Escobar-Chávez, J. J., López-Cervantes, M., Naik, A., Kalia, Y., Quintanar-Guerrero, D., & Ganem-Quintanar, A. (2006). Applications of thermo-reversible pluronic F-127 gels in pharmaceutical formulations. *Journal of Pharmacy & Pharmaceutical Sciences*, **9(3)**, 339-58.
- Eyre, D. R., Weis, M. A., & Wu, J. J. (2006). Articular cartilage collagen: an irreplaceable framework. *European Cells and Materials*, **12(1)**, 57-63.
- Frantz, C., Stewart, K. M., & Weaver, V. M. (2010). The extracellular matrix at a glance. *Journal of Cell Science*, **123(24)**, 4195-4200.

- Freeman, M. A. R. (Ed.). (1979). *Adult articular cartilage* (p. 487). London: Pitman Medical.
- Gioffredi, E., Boffito, M., Calzone, S., Giannitelli, S. M., Rainer, A., Trombetta, M., ... & Chiono, V. (2016). Pluronic F127 hydrogel characterization and biofabrication in cellularized constructs for tissue engineering applications. *Procedia CIRP*, **49**, 125-132.
- Goh, C. H., Heng, P. W. S., & Chan, L. W. (2012). Alginates as a useful natural polymer for microencapsulation and therapeutic applications. *Carbohydrate Polymers*, **88(1)**, 1-12.
- Göl, N. (2015). Development and characterization of injectable alginate/sericin/chondroitin sulphate microspheres for cartilage tissue engineering, The Graduate School of Natural and Applied Sciences of Middle East Technical University, The Degree of Master of Science in Biotechnology, Ankara.
- Gümüşderelioğlu, M. (2010). Doku mühendisliği ve ürünleri. *Bilim ve Teknik*, **516**, 70-75.
- Gürer, B. (2011). İn situ kırıldak doku mühendisliği, Uzmanlık Tezi, Mersin Üniversitesi Tıp Fakültesi, Ortopedi ve Travmatoloji Anabilim Dalı, Mersin.
- Güven, U. M. (2016). Antihistaminik etkili oftalmik kontrollü salım gösteren farklı sistemler üzerinde çalışmalar. Anadolu Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü. Doktora Tezi.
- Haberal, B. (2015). Tam kat kırıldak hasarlarının pedikülü ve serbest sinoviya grefti ile tedavisi: hayvan modelinde karşılaştırılmalı çalışma.
- Hall, A. C., Horwitz, E. R., & Wilkins, R. J. (1996). The cellular physiology of articular cartilage. *Experimental Physiology: Translation and Integration*, **81(3)**, 535-545.
- Harkness, R. D. (1961). Biological functions of collagen. *Biological Reviews*, **36(4)**, 399-455.
- HB, N., Bakliwal, S. R., & Pawar, S. P. (2010). In-situ gel: new trends in controlled and sustained drug delivery system. *International Journal of PharmTech Research* **2(2)**, 1398-1408.
- Hu, M. Y., & Nukavarapu, S. (2019). Woodhead Publishing : Scaffolds for cartilage tissue engineering. In *Handbook of Tissue Engineering Scaffolds*, **1**, 211-244.
- Huxley-Jones, J., Robertson, D. L., & Boot-Handford, R. P. (2007). On the origins of the extracellular matrix in vertebrates. *Matrix Biology*, **26(1)**, 2-11.

- Jha, B. S., Ayres, C. E., Bowman, J. R., Telemeco, T. A., Sell, S. A., Bowlin, G. L., & Simpson, D. G. (2011). Electrospun collagen: a tissue engineering scaffold with unique functional properties in a wide variety of applications. *Journal of Nanomaterials*, **2011**, 7.
- Jiang, F., Hörber, H., Howard, J., & Müller, D. J. (2004). Assembly of collagen into microribbons: effects of pH and electrolytes. *Journal of structural biology*, **148**(3), 268-278.
- Jung, Y. S., Park, W., Park, H., Lee, D. K., & Na, K. (2017). Thermo-sensitive injectable hydrogel based on the physical mixing of hyaluronic acid and Pluronic F-127 for sustained NSAID delivery. *Carbohydrate polymers*, **156**, 403-408.
- Junqueira, L. C. U., & Carneiro, J. (2005). Chapter 7: Cartilage, *Basic histology: text and atlas*, 172- 180.
- Kabanov, A. V., Batrakova, E. V., & Alakhov, V. Y. (2002). Pluronic® block copolymers as novel polymer therapeutics for drug and gene delivery. *Journal of controlled release*, **82**(2-3), 189-212.
- Kang, M. L., Jiang, H. L., Kang, S. G., Guo, D. D., Lee, D. Y., Cho, C. S., & Yoo, H. S. (2007). Pluronic® F127 enhances the effect as an adjuvant of chitosan microspheres in the intranasal delivery of Bordetella bronchiseptica antigens containing dermonecrototoxin. *Vaccine*, **25**(23), 4602-4610.
- Kant, V., Gopal, A., Kumar, D., Gopalkrishnan, A., Pathak, N. N., Kurade, N. P., ... & Kumar, D. (2014). Topical pluronic F-127 gel application enhances cutaneous wound healing in rats. *Acta histochemica*, **116**(1), 5-13.
- Kantarcıoğlu. İ. (2017). Denizanası kollajeni/misvak hibrit membranların üretimi ve periodontal doku grefti olarak kullanımının araştırılması. Yüksek lisans tezi.
- Karaduman, B. (2017). Taramalı elektron mikroskobu ile kriminolojik saç analizi. Uludağ Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Kriminalistik Anabilim Dalı. Yüksek Lisans Tezi.
- Kaya, Ş. (2015). Alternatif irrigasyon solüsyonlarının smear tabakasının kaldırılmasındaki etkinliğinin taramalı elektron mikroskobu ile değerlendirilmesi. Ondokuz Mayıs Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü Endodonti Anabilim Dalı. Yüksek Lisans Tezi.
- Khateb, K.A., Ozhmukhametova, E. K., Mussin, M. N., Seilkhanov, S. K., Rakhypbekov, T. K., Lau, W. M., & Khutoryanskiy, V. V. (2016). In situ gelling systems based

- on Pluronic F127/Pluronic F68 formulations for ocular drug delivery. *International journal of pharmaceutics*, **502(1-2)**, 70-79.
- Krishnan, Y., & Grodzinsky, A. J. (2018). Cartilage diseases. *Matrix Biology*, **71**, 51-69.
- Kulkarni, A. R., Soppimath, K. S., & Aminabhavi, T. M. (1999). Controlled release of diclofenac sodium from sodium alginate beads crosslinked with glutaraldehyde. *Pharmaceutica Acta Helvetiae*, **74(1)**, 29-36.
- Layne, E. (1957). Spectrophotometric and turbidimetric methods for measuring proteins. *Methods in Enzymology*, **3**, 447-454
- Le, A. D., Enweze, L., DeBaun, M. R., & Dragoo, J. L. (2019). Platelet-rich plasma. *Clinics in sports medicine*, **38(1)**, 17-44.
- LeBaron, R. G., & Athanasiou, K. A. (2000). Ex vivo synthesis of articular cartilage. *Biomaterials*, **21(24)**, 2575-2587.
- Lee, C. R., Grodzinsky, A. J., & Spector, M. (2001). The effects of cross-linking of collagen-glycosaminoglycan scaffolds on compressive stiffness, chondrocyte-mediated contraction, proliferation and biosynthesis. *Biomaterials*, **22(23)**, 3145-3154.
- Lesku, J. A., & Ly, L. M. (2017). Sleep origins: restful jellyfish are sleeping jellyfish. *Current Biology*, **27(19)**, R1060-R1062.
- Lewandowska-Łańcucka, J., Gilarska, A., Buła, A., Horak, W., Łatkiewicz, A., & Nowakowska, M. (2019). Genipin crosslinked bioactive collagen/chitosan/hyaluronic acid injectable hydrogels structurally amended via covalent attachment of surface-modified silica particles. *International Journal of Biological Macromolecules*, **136**, 1196-1208
- Li, M., Han, M., Sun, Y., Hua, Y., Chen, G., & Zhang, L. (2019). Oligoarginine mediated collagen/chitosan gel composite for cutaneous wound healing. *International journal of biological macromolecules*, **122**, 1120-1127.
- Zhang H. P., Deng L. X., Wang X. Y., Min S. J., Yang M. Y., Yang L., He W., Zhu L. J. (2011). Preparation and Characterization of Composite Hydrogel Beads Containing Sericin and Sodium Alginate. *Science of Sericulture*, **3**, 456-460.
- Liao, S., Chan, C. K., & Ramakrishna, S. (2008). Stem cells and biomimetic materials strategies for tissue engineering. *Materials Science and Engineering: C*, **28(8)**, 1189-1202.

- Matsusue, Y., Yamamuro, T., & Hama, H. (1993). Arthroscopic multiple osteochondral transplantation to the chondral defect in the knee associated with anterior cruciate ligament disruption. *Arthroscopy: The Journal of Arthroscopic & Related Surgery*, **9(3)**, 318-321.
- Mauck, R. L., Soltz, M. A., Wang, C. C., Wong, D. D., Chao, P. H. G., Valhmu, W. B., ... & Ateshian, G. A. (2000). Functional tissue engineering of articular cartilage through dynamic loading of chondrocyte-seeded agarose gels. *Journal of biomechanical engineering*, **122(3)**, 252-260.
- Menon, J., & Mishra, P. (2018). Health care resource use, health care expenditures and absenteeism costs associated with osteoarthritis in US healthcare system. *Osteoarthritis and cartilage*, **26(4)**, 480-484.
- Mercan D. (2011). The role of pluronic F68 and F127 combined growth factors and stem cells in reducing ketamine induced neurotoxicity. Master's thesis.
- Meyer, U., & Wiesmann, H. P. (2006). Chapter 2: Bone and cartilage. *Bone and cartilage engineering*, 7-43
- Miller, M. D., Thompson, S. R., & Hart, J. (2012). Articular tissue. *Review of Orthopaedics E-Book*, **1**, 39-48
- Nanjawade, B.K., Manvi, F.V., Manjappa, A.S. (2007). In situ-forming hydrogels for sustained ophthalmic drug delivery. *J. Controll. Rel.*, **122**, 119- 134.
- Özbalçılar, B. (2012). Türkiye denizlerinde bulunan Akdeniz ve İndo-Pasifik kökenli denizanalarının filogenetiği, Yüksek lisans tezi.
- Özemre, M. Ö., Seçgin, C. K., Gülşah, A. (2016). Yumuşak doku kalsifikasyonları ve ossifikasyonları: Derleme, *Acta Odontologica Turcica*, **(33)3**, 166-175.
- Özer, S. (2018). Parenteral verilişe uygun lityum içeren in situ jelleşen sistem hazırlanması ve in vitro değerlendirilmesi, Anadolu Üniversitesi, Sağlık Bilimleri Enstitüsü, Farmasötik Teknoloji Anabilim Dalı, Yüksek Lisans Tezi.
- Palmer, A. K. (1989). Triangular fibrocartilage complex lesions: a classification. *The Journal of hand surgery*, **14(4)**, 594-606.
- Pavoni, J. M. F., Luchese, C. L., & Tessaro, I. C. (2019). Impact of acid type for chitosan dissolution on the characteristics and biodegradability of cornstarch/chitosan based films. *International journal of biological macromolecules*, **138**, 693-703.

- Pelegrino, M. T., de Araújo, D. R., & Seabra, A. B. (2018). S-nitrosoglutathione-containing chitosan nanoparticles dispersed in Pluronic F-127 hydrogel: Potential uses in topical applications. *Journal of Drug Delivery Science and Technology*, **43**, 211-220.
- Peterson, L., Vasiliadis, H. S., Brittberg, M., & Lindahl, A. (2010). Autologous chondrocyte implantation: a long-term follow-up. *The American journal of sports medicine*, **38**(6), 1117-1124.
- Pham, L., Dang, L. H., Truong, M. D., Nguyen, T. H., Le, L., Le, V. T., ... Tran, N. Q. (2019). A dual synergistic of curcumin and gelatin on thermal-responsive hydrogel based on Chitosan-P123 in wound healing application. *Biomedicine & Pharmacotherapy*, **117**, 109183.
- Pieper, J. S., Oosterhof, A., Dijkstra, P. J., Veerkamp, J. H., & Van Kuppevelt, T. H. (1999). Preparation and characterization of porous crosslinked collagenous matrices containing bioavailable chondroitin sulphate. *Biomaterials*, **20**(9), 847-858.
- Poole, A. R., Kojima, T., Yasuda, T., Mwale, F., Kobayashi, M., & Lavery, S. (2001). Composition and structure of articular cartilage: a template for tissue repair. *Clinical Orthopaedics and Related Research*®, **391**, S26-S33.
- Pugliano, M., Vanbellinthen, X., Schwinté, P., Benkirane-Jessel, N., & Keller, L. (2017). Combined Jellyfish Collagen Type II, Human Stem Cells and Tgf-B3 as a Therapeutic Implant for Cartilage Repair. *Stem Cell Research & Therapy*, **7**(382) 2.
- Qian, S., Wong, Y. C., & Zuo, Z. (2014). Development, characterization and application of in situ gel systems for intranasal delivery of tacrine. *International journal of pharmaceutics*, **468**(1-2), 272-282.
- Rasmussen, K., Rauscher, H., & Mech, A. (2017). Physicochemical Characterization. In *Adverse Effects of Engineered Nanomaterials* 15-49. Academic Press.
- Rawat, S., Warade, S. ve Lahoti, S. (2010). In situ gel formulation of ornidazole for the treatment of periodontal disease. *Current Pharma Research*, **1** (1), 60-69.
- Roman, M. D., Fleaca, R. S., Boicean, A., Bratu, D., Birlutiu, V., RUS, L. L., ... & Mitariu, S. I. C. (2017). Assesment of Synovial Fluid pH in Osteoarthritis of the HIP and Knee. *REVISTA DE CHIMIE*, **68**(6), 1242-1244.

- Ruiz, J., Mantecon, A., Cadiz, V., Synthesis and properties of hydrogels from poly (vinyl alcohol) and ethylenediaminetetraacetic dianhydride, *Polymer*, **42(15)**, 6347-6354, 2001
- Schmolka, I. R. (1977). A review of block polymer surfactants. *Journal of the American Oil Chemists' Society*, **54(3)**, 110-116.
- Sheehy, E. J., Cunniffe, G. M., & O'Brien, F. J. (2018). Collagen-based biomaterials for tissue regeneration and repair. In *Peptides and Proteins as Biomaterials for Tissue Regeneration and Repair* (pp. 127-150). Woodhead Publishing.
- Singh, B. N., & Pramanik, K. (2018). Fabrication and evaluation of non-mulberry silk fibroin fiber reinforced chitosan based porous composite scaffold for cartilage tissue engineering. *Tissue and Cell*, **55**, 83-90.
- Singh, P. K., Pawar, V. K., Jaiswal, A. K., Singh, Y., Srikanth, C. H., Chaurasia, M., ... & Dube, A. (2017). Chitosan coated PluronicF127 micelles for effective delivery of Amphotericin B in experimental visceral leishmaniasis. *International journal of biological macromolecules*, **105**, 1220-1231.
- Song, E., Kim, S. Y., Chun, T., Byun, H. J., & Lee, Y. M. (2006). Collagen scaffolds derived from a marine source and their biocompatibility. *Biomaterials*, **27(15)** 2951-2961.
- Sop, E., S. (2013). Doku genişletme amaçlı hidrojel sentezi, karakterizasyonu ve şişme kinetiği. Hacettepe Üniversitesi Kimya Mühendisliği Anabilim Dalı. Yüksek Lisans Tezi.
- Spiller, K. L., Maher, S. A., & Lowman, A. M. (2011). Hydrogels for the repair of articular cartilage defects. *Tissue engineering part B: reviews*, **17(4)**, 281-299.
- Steadman, J. R., Rodkey, W. G., & Briggs, K. K. (2003). Microfracture Chondroplasty: Indications, Techniques, and Outcomes. *Sports Medicine and Arthroscopy Review*, **11(4)**, 236-244.
- Stevens, J., & Khetarpal, S. (2018). Platelet-rich plasma for androgenetic alopecia: A review of the literature and proposed treatment protocol. *International journal of women's dermatology*, **5**, 46-51
- Stockwell, R. A. (1991). Cartilage failure in osteoarthritis: relevance of normal structure and function. A review. *Clinical Anatomy: The Official Journal of the American Association of Clinical Anatomists and the British Association of Clinical Anatomists*, **4(3)**, 161-191.

- Suh, J. K. F., & Matthew, H. W. (2000). Application of chitosan-based polysaccharide biomaterials in cartilage tissue engineering: a review. *Biomaterials*, **21(24)**, 2589-2598.
- Taşer, Y. (2017). Denizanalarının farklı alanlarda değerlendirilmesi (Cnidaria= Coelenterata). Master's thesis.
- Teichtahl, A. J., Wluka, A. E., Davies-Tuck, M. L., & Cicuttini, F. M. (2008). Imaging of knee osteoarthritis. *Best Practice & Research Clinical Rheumatology*, **22(6)** 1061-1074.
- Temenoff, J. S., & Mikos, A. G. (2000). Tissue engineering for regeneration of articular cartilage. *Biomaterials*, **21(5)**, 431-440.
- Tıgılı, R. S. (2009). Kıkırrdak doku rejenerasyonunda kitosan doku iskelesi destekli biyoreaktör performansının incelenmesi, Doktora Tezi, Hacettepe Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Kimya Mühendisliği Anabilim Dalı, Ankara.
- Tissue, B. M. (2002). Ultraviolet and visible absorption spectroscopy. *Characterization of Materials*, 1-13.
- Wagermaier, W., & Fratzl, P. (2012). Collagen. In *Polymer science: A comprehensive reference* (pp. 35-55). Elsevier.
- Wenk, M. R., Fernandis, Z. A., (2007) ‘Manual for Biochemistry Protocols’, World Scientific, River Edge, NJ, USA 21-27.
- Westerink, M. J., Smithson, S. L., Srivastava, N., Blonder, J., Coeshott, C., & Rosenthal, G. J. (2001). ProJuvant™(Pluronic F127®/chitosan) enhances the immune response to intranasally administered tetanus toxoid. *Vaccine*, **20(5-6)**, 711-723.
- Wong, M., Wuethrich, P., Egli, P., & Hunziker, E. (1996). Zone-specific cell biosynthetic activity in mature bovine articular cartilage: a new method using confocal microscopic stereology and quantitative autoradiography. *Journal of orthopaedic research*, **14(3)**, 424-432.
- Wu, Y., Liu, Y., Li, X., Kebebe, D., Zhang, B., Ren, J., ... & Liu, Z. (2018). Research progress in in-situ gelling ophthalmic drug delivery system. *Asian Journal of Pharmaceutical Sciences*, **14**, 1-15
- Xu, Y., Xia, D., Han, J., Yuan, S., Lin, H., & Zhao, C. (2017). Design and fabrication of porous chitosan scaffolds with tunable structures and mechanical properties. *Carbohydrate polymers*, **177**, 210-216.

- Ülker, N. (2013). Işık-etkili kemik doku mühendisliği. Hacettepe Üniversitesi, Biyomühendislik Anabilimdalı. Yüksek Lisans tezi.
- Vandenhoute, M., Snoeck, D., Vanderleyden, E., De Belie, N., Van Vlierberghe, S., & Dubruel, P. (2017). Stability of Pluronic® F127 bismethacrylate hydrogels: Reality or utopia. *Polymer Degradation and Stability*, **146**, 201-211.
- Yamaoka, H., Asato, H., Ogasawara, T., Nishizawa, S., Takahashi, T., Nakatsuka, T., ... & Takato, T. (2006). Cartilage tissue engineering using human auricular chondrocytes embedded in different hydrogel materials. *Journal of Biomedical Materials Research Part A*, **78(1)**, 1-11.
- Yap, L. S., & Yang, M. C. (2016). Evaluation of hydrogel composing of Pluronic F127 and carboxymethyl hexanoyl chitosan as injectable scaffold for tissue engineering applications. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*, **146**, 204-211.
- Yılmaz, C. (2010). Kıkırdak yaralanmalarının tedavisinde osteokondral otolog transferi ve mozaikplasti, *TOTBİD Dergisi*, **9(3)**, 131-147.
- http-1: www.accessmedicine.com
- http-2: <https://www.orthobullets.com/basic-science/9017/articular-cartilage>
- http-3: <https://physivantage.com/pages/muscle-power>
- http-4: http://www.intotheblue.it/en_GB/
- http-5: <https://www.geograph.org.uk/>
- http-6: <https://www.chromedia.org/>
- http-7: <https://www.implen.de/>