





**ANJİYOGENİK MİKROİĞNELERİN GELİŞTİRİLMESİ VE  
KARAKTERİZASYONU**

**DEVELOPMENT AND CHARACTERIZATION OF ANGIOGENIC  
MICRONEEDLES**

**SOHRAT SALAMATI**

**PROF. DR. KEZBAN ULUBAYRAM**

**Tez Danışmanı**

Hacettepe Üniversitesi

Lisansüstü Eğitim-Öğretim ve Sınav Yönetmeliğinin

Biyomühendislik Anabilim Dalı için Öngördüğü

YÜKSEK LİSANS TEZİ olarak hazırlanmıştır.

2024



*Aileme...*



## ÖZET

### ANJİYOGENİK MİKROİĞNELERİN GELİŞTİRİLMESİ VE KARAKTERİZASYONU

Soghrat SALAMATI

Yüksek Lisans, Biyomühendislik Anabilim Dalı

Tez Danışmanı: Prof. Dr. Kezban ULUBAYRAM

Haziran 2024, 87 sayfa

Anjiyogenez doku onarımı sürecinde başta kök hücrelerin farklılaşması, hücre çoğalması ve migrasyonu gibi önemli hücresel süreçlerin devam ettirilebilmesi için dokuya oksijen taşınmasını sağlarken ayrıca doku hasarından dolayı meydana gelen hipoksi koşullarının doku üzerindeki etkisinin azaltılmasında önemli bir rol oynamaktadır. Östrojen hormonlarının ise memelilerde özellikle yumurtlama döneminde anjiyogenez sürecinde etkili olduğu bilinmektedir. Diğer taraftan son yıllarda penetrasyon artırıcı özellikleri nedeniyle mikroïgneli (MN) yamalar, çeşitli terapötiklerin transdermal uygulamaları için ideal platformlar olarak düşünülmektedir.

Bu tez kapsamında östrojen türevleri (estron (E1),  $\beta$ -estradiol (E2), estriol (E3)) içeren anjiyogenik mikroïgnelerin geliştirilmesi hedeflenmiştir. Bu amaçla kitosan (CS) ve poli(vinil alkol) (PVA) polimerleri harmanlanarak farklı çapraz bağlayıcılar (gluteraldehit, Glu), tetraetil ortosilikat (TEOS)) ile mikroïgneler hazırlanmış ve mekanik özellikleri karşılaştırılmıştır. Aynı zamanda farklı östrojen türevleri içeren mikroïgnelerin anjiyogenik etkileri ve *in vivo* cevapları incelenmiştir.

Üretilen mikroïgnelerin morfolojileri ışık ve taramalı elektron mikroskobu (SEM) ile incelenmiştir. E1 ve E2 içeren mikroïgnelerin yaklaşık 650  $\mu$ m iğne yüksekliğine sahip

kare tabanlı pyramidal, düzgün iğne yapısına sahip olduğu ancak E3 içeren mikroïğnelerin morfolojisinin bozulduğu ve düzgün iğne sayısının azaldığı görülmüştür. Diğer taraftan TEOS ve Glu ile çapraz bağlanmış E1 ve E2 yüklü MN'lerin morfolojik görünümünün benzer olduğu ve oluşan iğnelerin pürüzsüz ve düzenli bir şekilde sıralandığı gözlenmiştir. TEOS ve Glu kullanılarak çapraz bağlanan E1 veya E2 içeren MN'lerin mekanik karakterizasyonları tekstür cihazı ile incelenmiş olup TEOS konsantrasyonu ve glutaraldehit buharına maruz kalma süresinin, MN'lerin mekanik özelliklerini önemli ölçüde etkilediği görülmüştür. TEOS ile çapraz bağlanan grupların (MN-T), içermeyen MN gruplarına göre daha esnek ve daha yüksek bir kuvvette kırılma gösterdiği, E1 veya E2'nin ise mekanik özellikler üzerinde anlamlı bir değişim meydana getirmediği tespit edilmiştir. Diğer taraftan, Glu buharına maruz bırakılan E1 veya E2 içeren mikroïğnelerin uygulama süresinin artmasıyla daha kırılabilir bir yapıya sahip olduğu izlenmiştir. Mikroïğnelerin su tutma kapasiteleri incelendiğinde ise TEOS ile çapraz bağlı mikroïğnelerin yeterli çapraz bağa sahip olmadığı, su içinde çözündüğü ve kararlı bir yapı sergilemedikleri gözlenmiştir. Glu buharına maruz kalan mikroïğnelerin ise kararlı oldukları, 8. günde maksimum %1 kütle kaybına uğradığı ve uygulama süresinin artışıyla birlikte su tutma kapasitesinin azaldığı tespit edilmiştir. E2 içeren ve 15, 30 ve 60 dakika süreyle Glu buharına maruz bırakılan mikroïğnelerin % su tutma kapasitesi sırasıyla %88, 49 ve 31 olarak ölçülmüştür.

Östrojen yüklü MN'lerin anjiyogenez üzerindeki etkileri *in ovo* CAM deneyi ile incelenmiştir. Östrojen yüklü mikroïğnelerin tümünde, içermeyen gruplara göre istatistiksel olarak anlamlı derecede daha yüksek damarlanma tespit edilmiştir ( $p < 0.05$ ). Bu gruplar kendi aralarında karşılaştırıldığında ise damarlanma seviyelerine göre istatistiksel olarak anlamlı bir farklılık gözlenmemiştir ( $p > 0.05$ ). Bu sonuç, farklı östrojen türevlerinin anjiyogenez üzerinde benzer etkilere sahip olduğunu göstermiştir. Sonuç olarak östrojen türevleri içeren mikroïğnelerin güvenli dozda anjiyogenezi teşvik edici bir etkiye sahip olduğu tespit edilmiştir.

Geliştirilen mikroïğnelerin *in vivo* yanıtının değerlendirilmesi için E2 içeren ve glutaraldehit buharına maruz bırakılan mikroïğneler sıçanların deri altına implante edilmiştir. MN yamalarının *in vivo* implantasyonundan 14 gün sonra abdomen bölgesinden alınan örneklerin makroskopik incelemelerinde MN yamaların bağ dokusu içinde dokuyla bütünleşerek dokuya entegre olduğu gözlenmiştir.



Kontrol grubunun ve östrojen yüklü mikroığnelerin implantasyon sonrasında yabancı cisim granulatöz reaksiyonu gösterdiği tespit edilmiş olup bu sonuç beklenen bir tepki olarak değerlendirilmiştir. Diğer taraftan östrojen yüklü mikroığnelerde kontrol grubuna kıyasla artan inflamatuvar hücre varlığı ve damarlanma gözlenmiştir. Bu bulgu, östrojenin anjiyogenik ve inflamatuvar yanıtları tetikleyebileceğini göstermektedir. Ayrıca östrojen içeren mikroığnelerin fibroblast aktiviteyi tetiklediği ve kolajen fibril birikimini artırdığı gözlenmiştir.

Sonuç olarak geliştirilen östrojen yüklü mikroığnelerin anjiyogenik etkiye sahip oldukları ve çeşitli terapötik uygulamalarda güvenli olarak kullanım potansiyelinin olduğu gösterilmiştir.

**Anahtar Kelimeler:** Mikroığne, anjiyogenez, estron,  $\beta$ -estradiol, estriol TEOS, glutraldehit

## **ABSTRACT**

### **DEVELOPMENT AND CHARACTERIZATION OF ANGIOGENIC MICRONEEDLES**

**Soghrat SALAMATI**

**Master of Science, Department of Bioengineering**

**Supervisor: Prof. Dr. Kezban ULUBAYRAM**

**June 2024, 87 pages**

Angiogenesis plays a crucial role in tissue repair processes, ensuring the continuation of important cellular processes as stem cell differentiation, cell proliferation, and migration during tissue repair. It also plays a significant role in reducing the impact of hypoxia conditions caused by tissue damage by facilitating oxygen transport to the tissue. Estrogen hormones are known to be particularly effective in angiogenesis during mammalian ovulation. In recent years, microneedle (MN) patches, due to their penetration-enhancing properties, are considered ideal platforms for transdermal application of various therapeutics.

The morphologies of the produced microneedles were examined using light and scanning electron microscopy (SEM). Microneedles containing E1 and E2 exhibited square-based pyramidal structures with approximately 650  $\mu\text{m}$  needle height and a smooth needle structure, while the morphology of E3-containing microneedles was disrupted, and the number of smooth needles decreased. On the other hand, microneedles crosslinked with TEOS and Glu containing E1 and E2 showed similar morphological appearances, with smooth and regularly arranged needles. The mechanical characterization of microneedles crosslinked with TEOS was examined using a texture analyzer, revealing that the TEOS

concentration and exposure time to glutaraldehyde vapor significantly affect the mechanical properties of the microneedles. TEOS containing MN-T groups exhibited more flexibility and higher fracture strength compared to MN groups without TEOS, while E1 or E2 did not cause significant changes in mechanical properties. Furthermore, microneedles exposed to Glu vapor containing E1 or E2 became more fragile as the duration of Glu vapor application increased. When the water retention capacities of microneedles were examined, it was observed that TEOS-crosslinked microneedles did not have sufficient crosslinking, dissolved in water, and did not exhibit a stable structure. Microneedles exposed to Glu vapor were stable on the 8th day with a maximum mass loss of 1%. The water retention capacity of Glu-crosslinked microneedles decreased with increasing glutaraldehyde vapor exposure time. The water retention capacity of microneedles containing E2 and exposed to Glu vapor for 15, 30, and 60 minutes was measured as 88%, 49%, and 31%, respectively.

The effects of estrogen-loaded MNs on angiogenesis were examined using in ovo CAM experiments. In all estrogen-loaded microneedles, statistically significantly higher vascularization was observed compared to non-loaded groups ( $p < 0.05$ ). When compared among themselves, the highest vascularization was observed in the E3 loaded microneedle group, followed by the E2 and E1 groups, respectively. However, no statistically significant difference in vascularization levels was observed among the E3, E2, and E1 groups ( $p > 0.05$ ). This result indicates that different estrogen derivatives have similar effects on angiogenesis. Ultimately, it was observed that microneedles had a safe dose of angiogenic effect.

For the evaluation of the in vivo response of the developed microneedles, microneedles containing E2 and exposed to glutaraldehyde vapor were selected and implanted subcutaneously into rats. Macroscopic examination of the samples taken from the abdominal region 14 days after the in vivo implantation of MN patches revealed that the MN patches integrated with the tissue by being incorporated into the connective tissue. It was observed that both the control group and estrogen-loaded microneedles showed foreign body granulomatous reaction after implantation, which was considered an expected response. On the other hand, increased presence of inflammatory cells and vascularization were observed in estrogen-loaded microneedles compared to the control

group. This finding indicates that estrogen can trigger angiogenic and inflammatory responses. Additionally, it was observed that estrogen-containing microneedles stimulated fibroblast activity and increased collagen fibril accumulation.

In conclusion, it was demonstrated that the developed estrogen-loaded microneedles have angiogenic effects and have the potential to be safely used in various therapeutic applications.

**Keywords:** Microneedle, Angiogenesis, estrone,  $\beta$ -estradiol, estriol, TEOS, gluteraldeyde

## TEŞEKKÜR

Yüksek lisans eğitimimin bu zorlu ve değerli yolculuğunda bana destek olan, bilgi ve tecrübeleriyle ışık tutan herkese en içten teşekkürlerimi sunarım.

Öncelikle, değerli danışman hocam Prof. Dr. Kezban Ulubayram'a sonsuz minnettarlığımı ifade etmek isterim. Kendisinin engin bilgi birikimi, tutkulu çalışma azmi ve verdiği bilimsel ve manevi destek, sadece tez çalışmamı değil, aynı zamanda akademik ve kişisel gelişimimi de derinden etkiledi. Hocamın rehberliği, bu yolculuğumun en değerli kazanımlarından biri oldu.

Tez çalışmalarım süresince bilgi ve tecrübesiyle her zaman yanımda olan, anjiyogenez ve *in vivo* deneylerin yürütülmesinde bizzat katkı sağlayan değerli hocam Doç. Dr. Naşide Mangır Bolat'a,

Deneysel çalışmalarım sırasında bana yol gösteren, bilgi ve deneyimlerini cömertçe paylaşan Dr. Öğr. Üyesi Şükrü Öztürk'e,

Tez çalışmamın her aşamasında yanımda olan, sorularıma sabırla cevap veren ve desteklerini esirgemeyen Arş. Gör. Elif Cönger'e,

Histoloji deneylerinin yürütülmesinde ve yorumlanmasında değerli katkılar sunan Prof. Dr. Dilara Zeybek'e,

*In vivo* deneylerindeki kıymetli katkıları için Uzm. Dr. Kerim Şirinli'ye,

Mekanik testlerdeki desteği için Prof.Dr.Sevda Şenel'e, rehberliği için Doç. Dr. Selin Seda Timur'a ve katkıları için Ecz.Alperen Ağca'ya,

BIOTERM Araştırma Grubuna ve lab arkadaşlığı için Şeyma Nur Türkmen Koç'a,

En derin teşekkürlerimi sunarım. Her birinizin katkısı, çalışmamın kalitesini ve kapsamını artırmada paha biçilmez bir öneme sahipti.

Son olarak, bu yoğun süreç boyunca beni her koşulda seven, destekleyen ve yanımda olan sevgili aileme sonsuz minnetimi ifade etmek isterim. Sizlerin varlığı ve desteği, bu yolculuğu tamamlamamda en büyük güç kaynağım oldu. Ayrıca, bu zorlu süreçte desteğini hiç esirgemeyen, her an yanımda olan değerli yol arkadaşım Ay Naz'a özel bir teşekkür borçluyum. Senin anlayışın ve motivasyonun, bu yolculuğu çok daha anlamlı ve başarılı kıldı.

Ve bu yolculukta emeği geçen, adını sayamadığım herkese içtenlikle teşekkür ederim.

Bu tez alıŐması TÜBİTAK tarafından 220N323 nolu proje kapsamında desteklenmiŐ olup bu desteklerinden dolayı sonsuz Őükranlarımı sunarım.

## İÇİNDEKİLER

ÖZET .....	i
ABSTRACT .....	iv
TEŞEKKÜR.....	vii
İÇİNDEKİLER.....	ix
ŞEKİLLER DİZİNİ.....	xii
ÇİZELGELER DİZİNİ .....	xiv
SİMGELER VE KISALTMALAR .....	xv
1.GİRİŞ ve TEZİN AMACI .....	1
2. GENEL BİLGİLER.....	3
2.1. Östrojen Türevlerinin Anjiyogenez Üzerine Etkileri.....	3
2.2. Mikroıǧneler ve Tarihsel Gelişimi .....	6
2.3. Mikroıǧnelerin Sınıflandırılması .....	11
2.3.1. Katı Mikroıǧneler .....	11
2.3.2. Kaplı Mikroıǧneler .....	11
2.3.3. Çözünen Mikroıǧneler .....	12
2.3.4. İçi Boş Mikroıǧneler.....	12
2.3.5. Hidrojel Mikroıǧneler .....	13
2.4. Mikroıǧne Üretiminde Kullanılan Yöntemler ve Malzemeler.....	16
2.4.1. Mikrokalıplama .....	18
2.4.2. Fotolitografi .....	19
2.4.3. Isıl Şekillendirme .....	19
2.4.4. Elektroğirme .....	19
2.4.5. Çekirdek/Kabuk Elektroğirme.....	19
2.4.6. 3B Yazıcı.....	19
2.5. Mikroıǧnelerin Biyomedikal Uygulamaları .....	20
2.5.1. Transdermal İlaç Salımı .....	20
2.5.2. Deri Hastalıklarının Tedavisi .....	20
2.5.3. Ağrısız Biyosensörler .....	20
2.5.4. Rejeneratif Tıp ve Doku Mühendisliği.....	20

2.5.5. Kozmetik ve Estetik Alanlar .....	20
3. DENEYSEL ÇALIŞMALAR.....	22
3.1. Estradiol Türevlerinin Hücre Canlılığına Etkisi.....	22
3.2. Estradiol Türevlerinin Anjiyogenez Etkisinin incelenmesi .....	23
3.3. Kitosan/Poli(vinil alkol) Mikroğnelerin Üretimi.....	24
3.4. Mikroğnelerin Karakterizasyonu .....	27
3.4.1. FTIR Analizi .....	27
3.4.2. Mikroğnelerin Sitotoksite Analizi .....	27
3.4.3. Mikroğnelerin Morfolojik Analizi .....	27
3.4.4. Mikroğnelerin Mekanik ve Penetrasyon Analizleri .....	27
3.4.5. Mikroğnelerin DSC Analizi .....	28
3.4.6. Mikroğnelerin Su tutma ve Degradasyon Analizi .....	28
3.5. Mikroğnelerin Anjiyogenik Özelliklerinin İncelenmesi .....	29
3.6. Mikroğnelerin <i>In Vivo</i> Doku Yanıtının Histopatolojik Değerlendirilmesi .	29
3.6.1. Histolojik Analizler .....	30
3.6.2. Değerlendirme Kriterleri ve Skorumla .....	31
3.6.3. <i>In Vivo</i> Verilerinin İstatistiksel Analizi.....	31
4. SONUÇLAR VE TARTIŞMA.....	32
4.1. Östrojen Türevlerinin Hücre Canlılığına Etkisi.....	32
4.2. Östrojen Türevlerinin Anjiyogenik Etkisi .....	36
4.3. Mikroğnelerin Özellikleri .....	42
4.3.1. Mikroğnelerin FTIR Analizleri.....	42
4.3.2. Mikroğnelerin Mikroskop Görüntüleri .....	47
4.3.3. Östrojen Türevlerini İçeren Mikroğnelerin Toksisiteleri .....	54
4.3.4. Mikroğnelerin Mekanik ve Penetrasyon Özellikleri.....	56
4.3.5. Mikroğnelerin DSC Analizleri .....	62
4.3.6. Mikroğnelerin Su Tutma Kapasitesi .....	63
4.4. Mikroğnelerin Anjiyogenik Etkileri.....	65
4.5. Mikroğnelerin <i>In vivo</i> Yanıtı .....	69
5. YORUMLAR .....	75
6. KAYNAKLAR .....	77



EKLER .....	85
ÖZGEÇMİŞ .....	87

## ŞEKİLLER DİZİNİ

Şekil 2.1. Östrojen Türevleri: estron (E1), estradiol (E2) ve estriol (E3). .....	4
Şekil 2.2. A) Derinin yapısı ve mikroıǧnelerin deri dokusuna penetrasyonunun şematik gösterimi. B, C) Tez kapsamında üretilmiş transdermal polimerik mikroıǧneler. ....	8
Şekil 2.3. Mikroıǧnelerin kronolojik gelişimi. ....	9
Şekil 2.4. Mikroıǧne çeşitleri .....	15
Şekil 2.5. Mikrokalıpla yöntemi ile mikroıǧne üretimi.....	18
Şekil 2.6. Mikroıǧnelerin 3B yazıcı tekniği ile üretilmesi.....	19
Şekil 3.1. Silikon kalıplardaki mikroıǧne boyutları. A) Yükseklik:800 µm, B) Taban genişliği:.....	24
Şekil 3.2. Mikroıǧne üretim metodunun şematik gösterimi. ....	25
Şekil 3.3. Mikroıǧnelerin deri altına implasyonunun şematik gösterimi.....	30
Şekil 4.1. Östrojen türevlerinin vasküler endotel hücre canlılığına etkisi: A) Estron (E1), B) Estradiol (E2) ve C) Estriol (E3) (* p<0.05 ve **** p<0.0001).....	33
Şekil 4.2. Östrojen türevlerinin insan fibroblast hücre canlılığına etkisi: A) Estron (E1), B) Estradiol (E2) ve C) Estriol (E3) (** p<0.001 ve **** p<0.0001). ....	35
Şekil 4.3. Östrojen türevleri uygulanmış aortik halkaların 3. gün mikroskopik görüntüleri (10x).....	38
Şekil 4.4. Östrojen türevleri uygulanmış aortik halkaların 3. günde oluşan endotel filizlenme (A) ve ağ yapısı (B) uzunlukları (* p<0.05). ....	39
Şekil 4.5. Östrojen türevleri uygulanmış aortik halkaların 5. gün mikroskopik görüntüleri (10x).....	40
Şekil 4.6. Östrojen türevleri uygulanmış aortik halkaların 5. günde oluşan endotel filizlenme (A) ve ağ yapısı (B) uzunlukları (* p<0.05, ** p<0.01). ....	41
Şekil 4.7. Kitosan/PVA'nın TEOS ile çapraz bağlanması. ....	42
Şekil 4.8. Kitosan/PVA'nın glutraldehit ile çapraz bağlanması.....	43
Şekil 4.9. Östrojen türevlerinin FTIR spektrumları. ....	44
Şekil 4.10. MN, CS ve PVA'nın FTIR spektrumları. ....	45
Şekil 4.11. TEOS ve TEOS çapraz bağlı mikroıǧnelerin FTIR spektrumları. ....	46
Şekil 4.12. Glu ve Glu çapraz bağlı mikroıǧnelerin FTIR spektrumları.....	47
Şekil 4.13. Mikroıǧne (MN) ve TEOS (%1) ile çapraz bağlı farklı östrojen türevleri içeren mikroıǧnelerin SEM görüntüleri. ....	49
Şekil 4.14. TEOS (%2) ile çapraz bağlı östrojen türevleri içeren mikroıǧnelerin SEM görüntüleri....	50
Şekil 4.15. Glutraldehit buharına (15 dakika) maruz kalmış östrojen türevleri içeren mikroıǧnelerin SEM görüntüleri.....	51
Şekil 4.16. Glutraldehit buharına (30 dakika) maruz kalmış östrojen türevleri içeren mikroıǧnelerin SEM görüntüleri.....	52
Şekil 4.17. Glutraldehit buharına (60 dakika) maruz kalmış östrojen türevleri içeren mikroıǧnelerin SEM görüntüleri.....	53
Şekil 4.18. Üretilen mikroıǧnelerin boyutları. L1: merkez-merkez uzaklığı, L2: mikroıǧne tabanı, L3: MN uzunluğu (Ölçek uzunluğu: 200 µm).....	54

Şekil 4.19. Farklı çapraz bağlayıcı ajanlar kullanılarak hazırlanan östrojen veya östrojen türevleri yüklü mikroğnelerin toksisiteleri. A) %1 ve %2 TEOS kullanılarak hazırlanan E1, E2 veya E3 içeren mikroğnelerin % hücre canlılığı. B) 15, 30 veya 60 dak. gluteraldehit buharına maruz bırakılan mikroğnelerin % hücre canlılığı. Semboller ölçüm verilerini temsil etmektedir (** p<0.01).....	56
Şekil 4.20. TEOS ile çapraz bağlı östrojen türevleri içeren mikroğne yamaların kuvvet-mesafe grafikleri.....	58
Şekil 4.21. Gluteraldehit buharına maruz bırakılmış östrojen türevleri içeren mikroğnelerin kuvvet-mesafe grafikleri.....	58
Şekil 4.22. Mikroğne yamaların maksimum kırılma grafikleri: A) TEOS ile çapraz bağlı östrojen türevleri içeren mikroğne yamalar, B) Gluteraldehit buharına maruz bırakılmış östrojen türevleri içeren mikroğne yamalar.....	59
Şekil 4.23. Glu buharına maruz bırakılmış östrojen türevleri içeren mikroğnelerin parafilm penetrasyon test sonrası görüntüleri .....	61
Şekil 4.24. Üretimde kullanılan polimerin ve mikroğnelerin DSC termogramları .....	63
Şekil 4.25. Mikroğnelerin % su tutma kapasitesi .....	64
Şekil 4.26. Mikroğnelerin <i>in ovo</i> CAM deneyi fotoğrafları: 1. (binary) ve 2. (skeletonize) adım işlenmiş görüntüleri .....	68
Şekil 4.27. CAM alanında damar yoğunlukları .....	69
Şekil 4.28. MN-Glu60 ve östrojen içeren MN-Glu60E2 gruplarının ışık mikrosafı. MN-Glu60E2 grubuna ait örneklerde inflamatuvar hücreler ve damarlanmanın arttığı izlenmektedir. Sarı, mavi, siyah ve beyaz oklar sırasıyla damar, dev hücre, histosit ve kapsülü göstermektedir. Yıldız mikroğne yamayı göstermektedir .....	73
Şekil 4.29 MN-Glu60 ve MN-Glu60E2 gruplarının damarlanma ve inflamatuvar hücre skorları (** p<0.01).....	74
Şekil 4.30 MN-Glu60 ve MN-Glu60E2 gruplarının Masson Trikrom boyamalarına ait ışık mikrosafı. MN-Glu60E grubunda mikroğne çevresindeki doku reaksiyonunda kolajen fibrillerin arttığı izlenmektedir. Kolajen yeşil renk ile boyanmıştır. Yıldız mikroğne yamayı göstermektedir.....	74

## ÇİZELGELER DİZİNİ

Tablo 3.1. Üretilen MN'lerin kompozisyonu.....	26
Tablo 3.2. Skorlama kriterleri .....	31

## SİMGELER VE KISALTMALAR

ASC	:	Adipoz Kaynaklı Kök Hücre
BMSC	:	Kemik İliği Kaynaklı Kök Hücre
CAM	:	Koryoallantoik Membran
CS	:	Kitosan
DSC	:	Diferansiyel Tarama Kalorimetrisi
E1	:	Estrone
E2	:	$\beta$ -Estradiol
E3	:	Estriol
FTIR	:	Fourier Dönüşümlü Kızılötesi Spektroskopisi
H&E	:	Hematoksilen-Eozin Boyaması
iPSC	:	İndüklenmiş pluripotent kök hücre
MN	:	Mikroiğne
PVA	:	Poly(vinyl alcohol)
SEM	:	Taramalı Elektron Mikroskobu
TEOS	:	Tetraethyl ortosilikat



# 1. GİRİŞ VE TEZİN AMACI

Anjiyogenez, yeni kan damarlarının oluşumu süreci olup doku/yara iyileşmesi ve organ rejenerasyonu gibi birçok fizyolojik ve patolojik durumda kritik bir rol oynar. Örneğin; yara onarımında hemostatik fazda çok sayıda salgılanan anjiyogenik faktörler anjiyogenezi teşvik ederek, yerleşik endotel hücreleri, FGF, VEGF, PDGF, anjiyogenin, TGF- $\alpha$  ve TGF- $\beta$  dahil olmak üzere bir dizi anjiyogenik faktöre yanıt verirler [1-4]. Anjiyogenezi tetiklemek için eksojen faktörler birçok araştırmacı tarafından kullanılmıştır [5]. Protein ve protein kaynaklı faktörler (insülin, eritropoetin, spidroin, glipikan-1, sindekan-4 vb.) [5], büyüme faktörleri (Vasküler Endotelial Büyüme Faktörü (VEGF), Epidermal Büyüme Faktörü (EGF), Fibroblast Büyüme Faktörü (FGF), Transforme Edici Büyüme Faktörü (TGF- $\beta$ ), Trombosit Kaynaklı Büyüme Faktörü (PDGF)) [6], peptitler (LLKKK18, VIP, CW-49, Tylotoin, SR-0379, WRL3 [7, 8], kan kaynaklı faktörler (PRP, Hemoglobin) [9, 10], mikroRNA'lar (miR-92a, miR 200b'nin) [5], kök hücreler (ASC, BMSC, iPSC, PMSC) [5] ve küçük moleküller (NO, ATP) [11, 12], statinler [13], deferoksamin [14], hyaluronan oligosakkaritler [15], doğal bileşikler [16-18], birçok ilaç ve ilaç benzeri bileşikler ve makromoleküllerin anjiyogenez üzerine terapötik etkiler gösterdiği bildirilmiştir. Aynı zamanda östrojenin de anjiyogenez üzerine etkilerinin olduğu bildirilmiştir.

Kadınlarda, lokal ya da sistemik östrojen seviyesinin, menopoz öncesi ve sonrasında gösterdiği farklılıklara dayanarak, östrojenin yara iyileşmesi üzerinde olumlu etkilerinin olduğu, menopoz sonrası dönemde, hormon replasman tedavisi sonucunda hastalarda yara iyileşmesinin hızlandırdığı görülmüştür [19-22]. Hastalarda yaştan bağımsız olarak yara üzerine topikal östrojen uygulamasının, kollajen depolanmasını ve buna bağlı olarak granülasyon dokusunun yoğunluğunu artırdığını göstermektedir. Östrojen uygulaması, elastaz enzim aktivitesini azaltarak kollajen ve fibronektin depolanmasını artırarak, yara iyileşme sürecini desteklediği bildirilmiştir [23]. Yara iyileşmesinde majör olarak görev alan fibroblastlarda bulunan östrojen reseptörleri sayesinde, fibroblastların fonksiyonları da östrojen tarafından kontrol edilebilmektedir. Yapılan çalışmalarda, yara iyileşmesine önemli katkıları olan, TGF- $\beta$ 1 büyüme faktörünün fibroblast hücrelerindeki miktarının östrojen miktarı ile doğru orantılı olduğu tespit edilmiştir [24]. Diğer taraftan yapılan çalışmalar, östrojenin anjiyogenezi artırarak yara iyileşmesine katkıda bulunduğunu göstermiştir. Östrojen; anjiyogenezi düzenleyen bir sinyal protein olan VEGF'nin

üretimini düzenleyerek, anjiyogenezi artırmaktadır [25]. Matriks metalloproteinaz inhibitörü olan estradiol, kollajen sentezini uyararak kollajen üretiminde de önemli bir rol oynamaktadır [26].

Diğer taraftan birçok ilacın çözünme problemi ve farklı dokulardaki düşük geçirgenlikleri nedeniyle biyoyararlanımları düşüktür. Ayrıca peptit/protein yapıların vücut içinde hızlı degradasyonu veya büyüme faktörü gibi moleküllerin kısa ömürlü olması etkinliklerini azaltmaktadır. Bu nedenle bu dezavantajların üstesinden gelmek, biyoyararlanımlarını artırmak için birçok dozaj şekilleri geliştirilmiştir. Bunlar arasında transdermal sistemler olarak ortaya çıkan mikroiğneler son yıllarda araştırmacıların ilgi odağı olmuştur.

Mikroiğneler, deri gibi biyolojik engelleri invazif olarak geçebilen mikron boyutundaki iğne topluluklardır. Mikroiğnelerin uçları derinin epidermis tabakasından geçerek dermisin üst tabakasına kadar ulaşır. Böylece mikroiğneler kanama ve ağrıyı önleyerek sinir uçlarına temas etmeden ilaç uygulamaya olanak sağlarlar. İlaçların gastrointestinal sindirimin etkisine uğramadan uygulanmasını sağlarken aynı zamanda ilacın emilimini hızlandırma ve etki süresini uzatarak biyoyararlanımlarını artırmaktadır. Mikroiğneler sadece ilaç uygulamaları ile kısıtlı olmayıp aynı zamanda kozmetik ve teşhis gibi alanlarda da giderek artan bir ilgi görmektedir. Biyoalgılama için mikroiğne yaklaşımı, interstisyel sıvıdaki biyobelirteçlerin sürekli olarak izlenmesine olanak sağlar. Aynı zamanda mikroiğnelerin minimal invaziv bir teknoloji olarak anjiyogenez ve doku rejenerasyonu alanlarında önemli bir potansiyele sahiptir.

Bu tez kapsamında östrojen türevleri (estron (E1),  $\beta$ -estradiol (E2), estriol (E3)) içeren anjiyogenik mikroiğnelerin geliştirilmesi hedeflenmiştir. Bu amaçla kitosan ve poli(vinil alkol) polimerleri harmanlanarak farklı çapraz bağlayıcılar (gluteraldehit (Glu), tetraetil ortosilikat (TEOS)) ile kararlı mikroiğneler hazırlanmış ve mekanik özelliklerinin karşılaştırılmıştır. Aynı zamanda farklı östrojen türevleri içeren mikroiğnelerin anjiyogenik etkileri incelenmiştir.



## 2. GENEL BİLGİLER

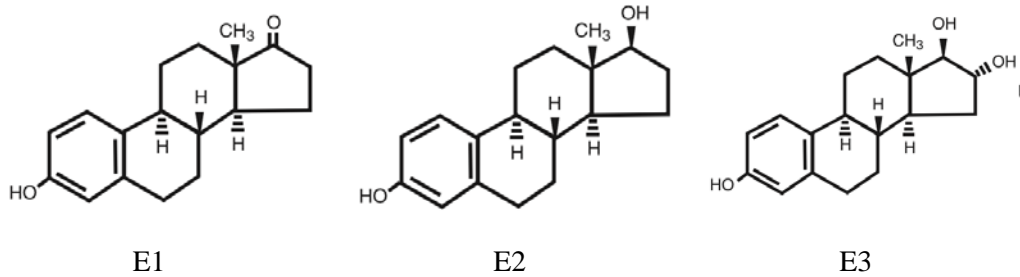
### 2.1. Östrojen Türevlerinin Anjiyogenez Üzerine Etkileri

Damarlar aracılığı ile dokulara besin ve oksijen taşınırken atıkların ve karbondioksitin uzaklaştırılması hücresel döngünün sağlıklı bir şekilde gerçekleşmesini sağlamaktadır. Sağlıklı dokularda damarlanma anjiyogenez ve vaskülogenez olmak üzere iki farklı yol ile gerçekleşmektedir. Vaskülogenez, endotel öncü hücrelerin endotel hücrelere dönüşerek birincil damar oluşumunu ifade etmektedir. Anjiyogenezde ise var olan damarların yapısındaki endotel hücreleri çoğalarak ve göç ederek yeni damar oluşumu gerçekleşir. Anjiyogenez sürecinde bir dizi olay sıralı olarak meydana gelmektedir: bazal membranın degradasyonu, endotel hücrelerinin çoğalması ve göçü, tüp oluşumu ve yeni damarların olgunlaşması [27]. Anjiyogenez temel olarak embriyonik gelişim sırasında, doku onarımında, adet döngüsünde, kas büyümesinde ve organ membranlarının yenilenmesinde düzenli veya kısa ömürlü olarak meydana gelmektedir. Patolojik durumlarda besinler ve gazlar açısından hücresel döngülerin sürdürülebilmesi iyileşme sürecinin durumunu belirleyen önemli faktörlerin başında gelmektedir. Özellikle doku bütünlüğünün bozulduğu durumlarda damar ağ yapısının da bozulmasıyla birlikte hücrelere gerekli besin ve oksijenin taşınması zorlaşırken bu durum iyileşme sürecinin uzamasına sebep olmaktadır. Anjiyogenez doku onarım sürecinde başta kök hücrelerin farklılaşması, hücre çoğalması ve migrasyonu gibi önemli hücresel süreçlerin devam ettirilebilmesi için dokuya oksijen taşınmasını sağlarken ayrıca doku hasarından dolayı meydana gelen hipoksi koşullarının doku üzerindeki etkisinin de azaltılmasında açısından da önemli bir rol oynamaktadır [28].

Doku rejenerasyonunu hızlandırmak için anjiyogenezin artırılması araştırmacılar tarafından sıklıkla tercih edilen bir yaklaşımdır. Anjiyogenezi tetiklemek için birçok eksojen faktörler uygulanmıştır. Bu sürece büyüme faktörleri (VEGF, FGF), spesifik yolaklar (WNT/ $\beta$ -katenin, PI3K) ve miRNA'lar (miR-210, miR-126) dahil olmaktadır [29]. Anjiyogenezin tetiklenmesi amacıyla dokuda büyüme faktörlerinin salgılanmasının artırılması, anjiyogenez ile ilgili yolakların aktivasyonunun artırılması veya moleküler seviyede anjiyogenezi tetiklemek amacı ile miRNA desteği kullanılmaktadır. Benzer şekilde östrojeninde anjiyogenez üzerinde etkili olduğu bilinmektedir.

Östrojen, ana dişi cinsiyet hormonları olup üreme ile ilgili olan ve olmayan sistemlerde kritik rol oynarlar. Östrojen, menapoz öncesi dönemde yumurtalıklarda, korpus luteum

ve plasentada yüksek miktarda kolesterolden sentezlenmesine rağmen karaciğer, kalp, deri ve beyin gibi gonad olmayan organlarda da az miktarda sentezlenmektedir. Kadınlarda fizyolojik koşullarda estron (E1), estradiol (E2) ve estriol (E3) olmak üzere üç farklı östrojen türevi bulunmaktadır (Şekil 2.1). Menopoz öncesi dönemde biyosentez yolağın temel ana ürünü E2'dir. E2 menopoz öncesi kadınlarda östrojenin en güçlü ve yaygın şekli olup kadın üreme dokularının ve ikincil cinsel özelliklerin geliştirilmesinden ve korunmasından sorumludur. E1, menopoz sonrası dönemde yağ dokuda adrenal dehidroepiandrosterondan sentezlenmektedir. Hamilelik boyunca plasentadan yüksek miktarda sentezlenen E3 ise en zayıf östrojen türevi olup E1'in 16-alfa hidroksilasyonundan sentezlenir. Bu östrojenler kadın üreme sisteminde farklı roller oynarlar ve değişen düzeylerde biyolojik etkilere sahiptirler. Genel olarak E2, E1'e göre 10 kat ve E3'e göre ise 100 kat daha fazla aktivite göstermektedir [30]. E2, metabolik olarak daha az aktif olan E1 ve E2 formuna dönüştürülerek veya E2'nin sülfatlanmasıyla yıkıma uğrar. Vücudumuzda östrojen sentezi 18 adet ekzon içeren CYP19 geni tarafından sentezlenen ve yumurtalıklar ile beyin dokusu başta olmak üzere birçok doku tipinde bulunan aromataz enzimi tarafında düzenlenmektedir [31, 32]. Aromataz enzimi hem dişi hem de erkek gonadlarında sentezlenmektedir. Erkeklerde ise testislerde sentezlenmekte olup spermatogenezde, sperm olgunlaşmasında ve sperm hareketliliğinde etkili olduğu ifade edilmiştir [33].



Şekil 2.1. Östrojen Türevleri: estron (E1), estradiol (E2) ve estriol (E3).

Yetişkin organizmalarda, dişi üreme sistemi dışında normal koşullar altında anjiyogenez neredeyse yoktur. Bu durum cinsiyet hormonlarının neo-anjiyogenezde etkili olabileceğini düşündürmüştür. Endotel hücre çoğalması ile ilişkilendirilen lupus gibi hastalıkların menopoz öncesi dönemdeki kadınlarda gözlenmesi bu düşüncüyü kuvvetlendirmektedir. Östrojen reseptörlerinin inhibe edildiği farelerde yapılan

çalışmaların sonuçları rahimde anjiyogenezin olumsuz yönde etkilendiği göstermiştir. Bununla birlikte östrojen reseptörü antagonistini kullanılarak yapılan çalışmalarda da anjiyogenezin inhibe olduğu gösterilmiştir [34]. Tüm bu çalışmalar östrojenlerin anjiyogenezde kritik rol aldıklarını kanıtlar niteliktedir.

Farklı doku tiplerinde östrojen tarafından oluşturulan etkiler transkripsiyonel (genomik) ve transkripsiyonel olmayan (non-genomik) sinyal yollarının aktivasyonu ile ilişkilidir. Östrojen, uzun ve kısa dönem etkilerini ER $\alpha$ , ER $\beta$  ve G-proteini östrojen reseptörü-1(GPER1) gibi alt türleri olan “*Estrogen Receptor (ER)*”larına bağlanarak göstermektedir. Östrojenler genomik etkilerini hücre içi ER’lere bağlanarak gösterirler. Hücre içi reseptörlere bağlanan östrojenlerin oluşturduğu reseptör-ligand kompleksleri hedef genin DNA üzerindeki regülatör bölgesine bağlanarak etki gösterirler. Östrojenler non-genomik etkilerini ise hücre membranında yer alan reseptörlere bağlanarak gösterirler. Östrojenler hücre membranında yer alan reseptörlere bağlandığında hücre içinde çeşitli sinyal yollarını aktive ederek biyolojik etkilerini gösterirler [35]. ER $\alpha$ , ER $\beta$  ve GPER1 reseptörleri sırasıyla *ESR1*, *ESR2* ve *GPER1* genleri tarafından kodlanmaktadır [36]. ER $\alpha$  vasküler dokularda ifade olurken, ER $\beta$  reseptörünün vasküler dokularındaki karakterizasyonu kapsamlı olarak yapılmamış olsa da insan endotel hücrelerinin ER $\beta$  ifade ettiği gösterilmiştir. Laminer kayma gerilimi altında kültürü yapılan insan endotel hücrelerinde fizyolojik konsantrasyonda E2 uygulandığında, östrojen ile ilişkili olduğu tespit edilen COX-2 geninin mRNA düzeyinde ifadesinin arttığı gösterilmiştir [37]. Bununla birlikte serebral ve periferik endotel hücrelerinde E2’nin hem *in vitro* hem de *in vivo* koşullarda VEGF aracılı anjiyogenezde kritik olan nitrik oksit düzeyini eNOS aktivasyonu ve ER-reseptör aracılı mekanizmalarla artırdığı tespit edilmiştir [38]. Tüm bunlara ek olarak E2 uygulamasının hem *in vitro* hem de *in vivo* koşullarda endotel hücre çoğalmasında artırdığı ve apoptozu inhibe ettiği gösterilmiştir. Ayrıca E2’nin HUVEC hücrelerinin adezyonunu ve migrasyonunu artırarak anjiyogenezi tetiklediği rapor edilmiştir. E2’nin pro-anjiyogenik etkisinden sorumlu mekanizmaları kapsamlı bir şekilde çalışılmış olup elde edilen veriler bu etkinin ER $\alpha$  aktivasyonu tarafından sağlandığını göstermiştir. Bununla birlikte E2’nin VEGF ifadesini artırdığı ve bu etkinin de ER $\alpha$  üzerinden gerçekleştiği tespit edilmiştir. Anjiyogenez boyunca, besinlerin hedef hücrelere iletiliminin hızlıca yapılabilmesi amacıyla endotel hücreleri, ihtiyaç duyduğu enerjiyi sentezleyebilmek için metabolik aktivitelerini hızlandırmak durumundadır. Yapılan çalışmalarda E2’nin bu süreçte önemli bir bileşen olduğu, endotel hücrelerinde

glikolizin artışı tetiklediği tespit edilmiştir [39, 40]. Hem genomik hem de genomik olmayan yollarla etkisini gösteren E2 gibi E1’de genomik ve non-genomik etkileşimlerle biyolojik fonksiyon göstermektedir. Sıçan aortik dokularında yapılan çalışmalarda E1’in genomik olmayan (“*non-geneomik*”) aktivitesinde PLC/DAG transdüksiyon yolak aktivasyonu ve NOS ile COX mekanizmaları arasındaki karşılıklı etkileşimin etkin mekanizmalar olduğu tespit edilmiştir [41]. Bununla birlikte E1’in ER’lere (ER $\alpha$  ve ER $\beta$ ) bağlanarak da etki gösterdiği ancak bağlanma afinitesinin E2’ye göre düşük, E3’e göre ise yüksek olduğu tespit edilmiştir [42]. Rauschemberger ve ark. yaptıkları çalışmada sıçan endotel hücrelerinde E1’in biyolojik fonksiyonlarını araştırmış ve elde ettikleri sonuçlar E1’in hücre çoğalmasını indüklediği ve hidrojen peroksit kaynaklı oksidatif stresi baskıladığı tespit edilmiştir. Ayrıca E1’in monositlerin endotel hücrelerine olan adezyonunu inhibe ettiği ve mitojenik aktivitesini MAPK yolağı üzerinden gösterdiği tespit edilmiştir [43]. Endotel öncül hücreleri kullanılarak yapılan başka bir çalışmada ise E1, E2 ve bunların kombinasyonları ayrı ayrı hücrelere uygulanmış olup hücre çoğalmasındaki etkisinin doz bağımlı olduğu ve hem sıçan hem de insan endotel öncül hücrelerinde GPER reseptörünün ifade edildiği tespit edilmiştir [44]. Ayrıca, vasküler düz kas hücreleri ve sıçan aortik halkaları ile yapılan çalışmalarda; E1’in non-genomik etkisinin MAPK kinaz bağımlı olduğu, genomik etkisini ise hücre çoğalması ve migrasyonunu etkileyen Protein kinaz C yolağının aktivasyonu ile gerçekleştirdiği bildirilmiştir [45].

## 2.2. Mikroİğneler ve Tarihsel Gelişimi

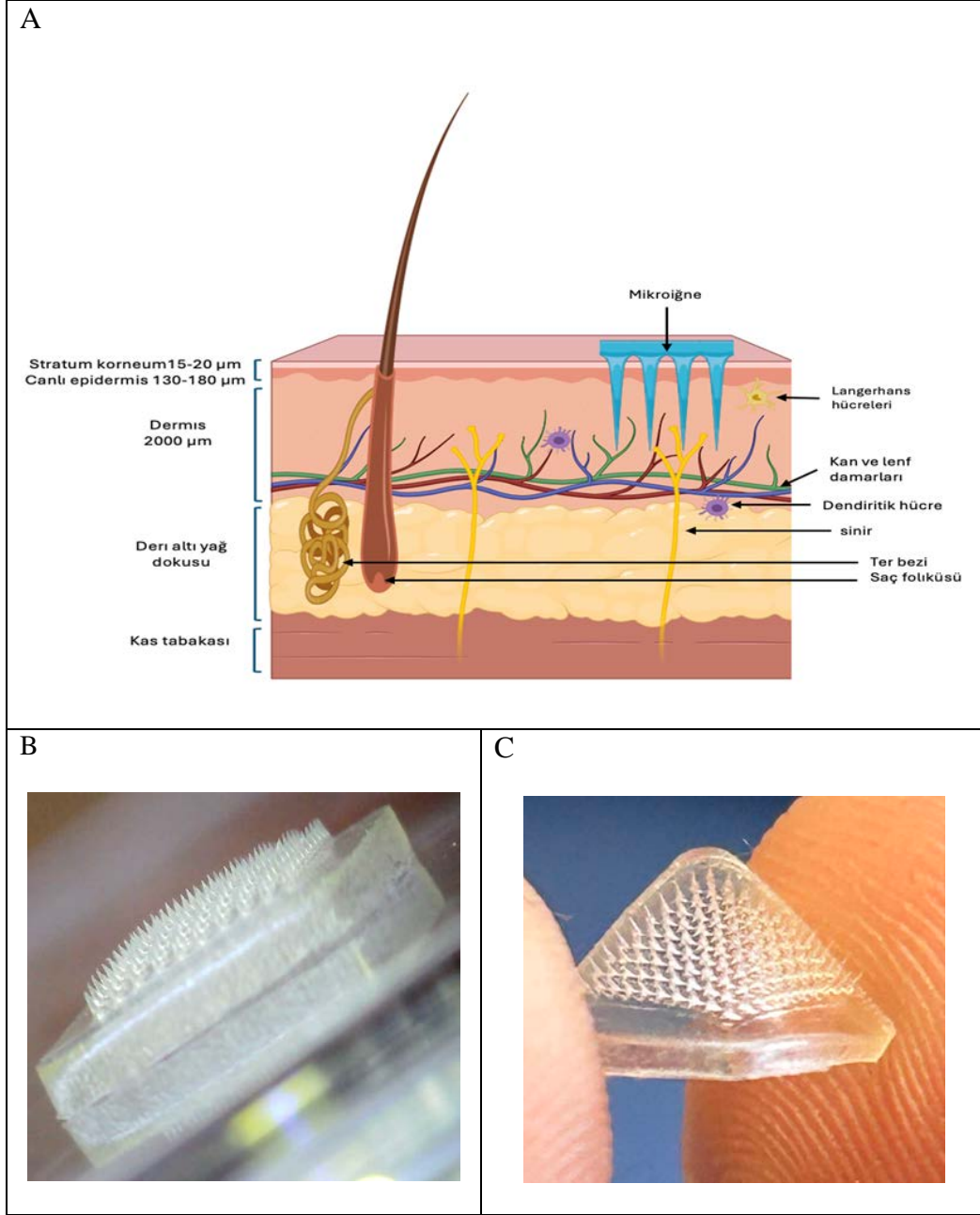
Mikroİğneler mikron boyutunda İğnelerden oluşan transdermal ilaç salımı sağlayan sistemlerdir (Şekil 2.2). Mikron boyutundaki bu İğneler derinin stratum korneum bariyer tabakası boyunca mikron ölçekli yollar oluşturarak derinin geçirgenliği arttırmakta ve böylece ilaçların, proteinlerin ve aşılardan girişine izin vermektedir. Mikroİğne uygulaması; ilaçların karaciğerde ilk geçiş etkisinin, pH dalgalanmalarının ve olası gastrointestinal sisteme olan yan etkilerinin önlenmesi gibi avantajlara sahiptir. Ayrıca alerji veya anafilaksi gibi istenmeyen bir etki oluşması durumunda İğne kolaylıkla çıkarılarak ilaç uygulaması sonlandırılabilir [46]. Ayrıca intravenöz ve intamüsküler uygulamalara göre ağrısız olması da hasta uyuncunu artırmaktadır.

İlaçların direkt olarak cilde uygulanması özellikle topikal ve transdermal ilaç salımında yaygın olarak kullanılan bir yöntemdir. Konvansiyonel topikal ilaç salım sistemleri (DDS), merhem, krem, jel, losyon veya yamalar gibi formülasyonları içerir. Bu formülasyonlar cildin dış tabakası olan stratum korneuma uygulanır ve ilaç deriden emilir. Ancak, stratum korneumun sıkı yapısı, birçok ilaç molekülünün deriden geçişini sınırlar ve düşük biyoyararlanıma neden olur. Konvansiyonel topikal DDS'ler ise üretim ve uygulama kolaylığına sahiptir, ancak düşük biyoyararlanım ve ilaç emilim hızları sınırlıdır.

Hipodermik enjeksiyon ise ilaçların doğrudan deri altı dokuya verilmesi için yaygın olarak kullanılan bir yöntemdir. Bu yöntem, ilaçların tam biyoyararlanımını sağlar ve hızlı sistemik etki göstermesine olanak tanır. Ancak, enjeksiyon uygulaması invaziv bir işlem olup ağrı, enfeksiyon, kanama veya hematom gibi riskleri de beraberinde getirir. Ayrıca, sağlık personeli ihtiyacı ve atık biyolojik materyalin uygun şekilde imha edilmesi gerekir. Hipodermik enjeksiyon hızlı sistemik etki gerektiren durumlarda tercih edilecek bir yöntemdir

Mikroiğneler ise transdermal ilaç dağıtımı için yeni bir yaklaşım sunar. MN'ler, 50-900 µm uzunluğunda ve 300 µm'den daha küçük çaplı katı veya içi boş iğnelere oluşur [32,33]. Diziler halinde düzenlenmiş iğneler, stratum korneumda mikron boyutlu fiziksel yollar oluşturarak ilaçların deriye nüfuz etmesini kolaylaştırır. Bu sayede, ilaçların biyoyararlanımı artırılabilir ve daha yüksek dozların uygulanmasına olanak sağlar. MN dizileri, azami 20.000 iğne/cm<sup>2</sup> yoğunluğa kadar üretilebilir ve dermisteki sinir uçlarına ulaşmadan sadece epidermisin üst tabakalarını delerek ağrısız bir uygulama sağlar.

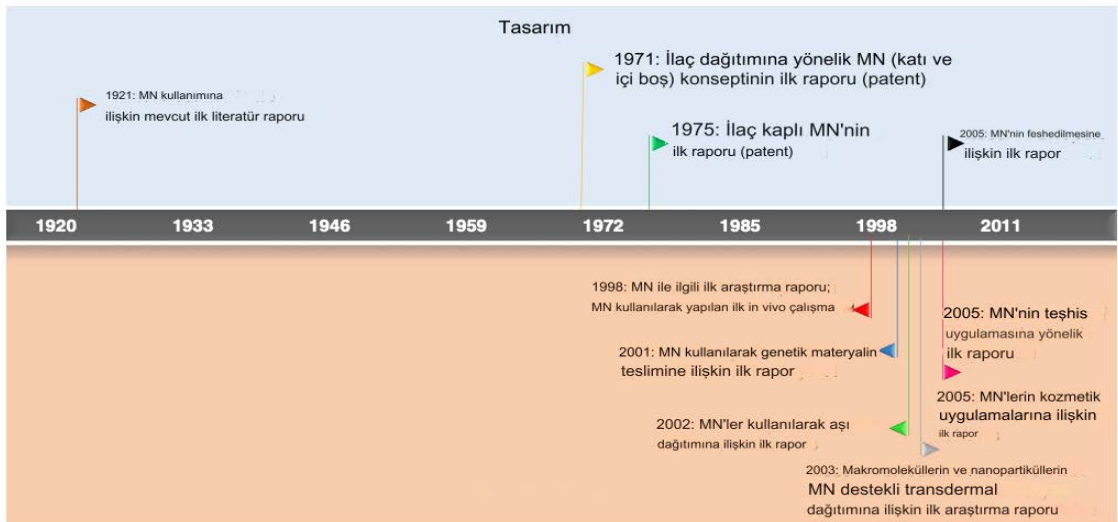
Mikroiğnelerin avantajları, ağrısız ve minimal invaziv olmaları, kendinden uygulama olanağı sunmaları, biyoyararlanımı artırmaları ve atık oluşturmamalarıdır. Bununla birlikte, mikroiğne dizilerinin üretimi ve ölçeklendirilmesi bazı kısıtlamalara sahiptir. Ayrıca, mikrokanalların tıkanması ve biyolojik sıvılarla temas sonrası çözünme gibi sorunları da bulunmaktadır.



Şekil 2.2. A) Derinin yapısı ve mikroiğnelerin deri dokusuna penetrasyonunun şematik gösterimi. B, C) Tez kapsamında üretilmiş transdermal polimerik mikroiğneler.

Mikroiğne (MN) terimi literatüründe ilk defa 1921 yılında Robert Chambers tarafından kullanılmıştır. Chambers, deniz yıldızı yumurtasının çekirdeğine iğne enjekte ederek mikro-diseksiyon işlemi gerçekleştirmiş ve bu amaçla MN kullanmıştır [47]. Aynı araştırmacının 1914 yılındaki çalışmasında da bir çekirge türü olan *Disosteira Carolina* ve bir hamamböceği türü olan *Periplaneta Americana*'nın erkek üreme hücrelerinin 'iğne' vasıtasıyla diseke edildiği bildirilmiştir [48].

Literatür incelendiğinde, ilaç uygulaması amacıyla MN'lerin kullanılması ilk olarak 17 Mayıs 1971 tarihinde ABD'de Martin S. Gerstel ve Virgil A. Place'in buluşuna ait patente dayandığı görülmektedir [49]. Gerstel ve Place tarafından MN konseptinin tanıtılmasına rağmen, "mikroiğne" terimi Henry ve ark. tarafından 1998 yılında kullanılmaya başlanmıştır [50]. Gerstel ve Place'in patentinde, MN'ler; ilaç rezervuarından salınan ve lokal veya sistemik ilaç dağıtımını amacıyla cildi delmeyi hedefleyen bir ilaç taşıyıcı sistem olarak tanımlanmaktadır. Söz konusu patentte hem katı hem de içi boş MN'ler açıklanmıştır. İlk ilaç kaplı MN bazlı cihaz ise Pistor Michel Louis Paul tarafından önerilmiştir. Bu patent, MN'lerin yüzeyine veya MN'ler ile ön işlem görmüş cildin üzerine uygulanan ilaç kombinasyonundan oluşan bir mikro-delme yapısına sahip cihazı tanımlamaktadır [51].



Şekil 2.3. Mikroiğnelerin kronolojik gelişimi [51].

Mikroiğnelerin transdermal ilaç sistemleri olarak kullanımına ait ilk araştırma raporu ise 1998 yılında yayınlanmıştır. Henry ve ark. reaktif iyon aşındırma mikro-fabrikasyon

teknolojisini kullanarak MN'leri geliştirmişlerdir ve insan derisinden alınan örneklerde kalseinin pasif topikal uygulamaya kıyasla MN uygulamasının geçirgenliğinin dört kat daha fazla olduğunu göstermiştir. Bu çalışma aynı zamanda yaklaşımın *in vivo* uygulanabilirliğini ve ağrı algısını rapor eden ilk çalışmadır. 2001'de Alza Corporation, antisens oligonükleotitlerin transdermal verilmesi için katı metalik MN'lerin geliştirmiştir [52]. Dermal immünizasyon için MN teknolojisinin kullanımına ilişkin ilk rapor 2002 yılında yayınlanmıştır. Mikszta ve ark. fare modelinde çıplak plazmid DNA ile aşılama için silikon MN'lerin etkinliğini rapor etmiştir [52]. Çalışma ayrıca eritema ve ödem skorlarına dayanarak insan deneklerinde MN'lerin güvenilirliğini değerlendirmiştir. Makromoleküller ve nanopartiküllerin MN destekli transdermal verilmesinin uygulanabilirliğini rapor eden ilk çalışma ise 2003 yılında McAllister ve ark. tarafından yayınlanmıştır. İnsan kadavra derisinden insülin, albümin ve 100 nm boyutundaki lateks partiküllerin verilmesi için katı ve oyuk MN'ler kullanılmıştır [53].

Mikroiğneler, cilt yüzeyini delerek ilacın veya biyolojik maddenin hedef dokulara ulaşmasını sağlamaktadır. Geleneksel iğne enjeksiyonlarına kıyasla mikroiğnelerin daha az invaziv olması ve daha az ağrıya neden olması gibi avantajları bulunmaktadır. Ayrıca mikroiğnelerin tasarımı, ilacın daha etkili bir şekilde salınmasını sağlamaktadır. Bunun nedeni ilaçların hedef dokulara doğrudan iletilirken metabolik parçalanmadan kaçılmasıdır [54].

Mikroiğnelerin yukarıda bahsedildiği üzere daha az invaziv olmaları, daha az ağrıya neden olmaları ve ilaçların daha etkili bir şekilde teslim edilmesini sağlamaları gibi avantajları bu teknolojinin giderek artan popülerliğini açıklamaktadır. Araştırmacılar, mikroiğnelerin tasarımı ve kullanımı konusundaki çalışmalarını sürdürmekte ve bu teknolojinin araştırmalarda ve klinikte nasıl daha etkili bir şekilde kullanılabileceğini araştırmaktadır [55].

Mikroiğneler, biyolojik engelleri (örneğin deri) minimal invazif bir şekilde aşan mikro ölçekli iğnelerdir. Mikroiğnenin boyutları kan damarlarına ve sinirlere dokunmayı önler, böylece ağrı veya kanamaya neden olmaz. Bu nedenle mikroiğneler üstün salım verimliliğine sahip bir ilaç taşıyıcı sistemi olarak kabul edilmektedir. İlaç salım özelliklerine göre, mikroiğneler genel olarak beş kategoriye ayrılabilir. Bunlar; katı, içi boş, kaplanmış, çözünen ve gözenekli mikroiğnelerdir [56].



## 2.3. Mikroïgnelerin Sınıflandırılması

Mikroïgneler üretim süreci, uygulama, malzeme bileşimi ve tasarım gibi çeşitli faktörlere göre sınıflandırılabilir. Mikroïgnelerin genel sınıflandırması ise ilaç salımına göre yapılmış olup bunlar katı, kaplanmış, çözünen, içi boş ve hidrojel mikroïgneler olarak tanımlanmıştır.

### 2.3.1. Katı Mikroïgneler

Katı mikroïgneler, deri üzerinde geçici gözenekler oluşturarak ilaç moleküllerinin bu gözeneklerden dağılımını sağlayan sistemlerdir. Bu uygulama iki aşamada gerçekleştiğinden kullanım açısından dezavantaj oluşturmaktadır [57].

Katı mikroïgneler; silikon, paslanmaz çelik, titanyum, metal ve polimerlerden üretilmektedir. Bu mikroïgneler dürtme ve yama yaklaşımı ile çalışmaktadır. Dürtme işleminde, mikron ölçekli çıkıntılarla cilt katmanında mikron boyutunda kanallar oluşturulur. Böylece, sonrasında uygulanacak ilaç formülasyonu deriye kolay bir şekilde nüfuz edebilir. İlaç, sistemik etki için kılcallardan alınabilir veya topikal bir etki için kullanılabilir. İlaç formülasyonu, topikal bir yama veya jel, krem, merhem, losyon veya jel gibi yarı katı bir bileşim olabilir [58-61]. Literatürde bildirilen ilk katı mikroïgne dizisi Hashmi ve arkadaşları tarafından silikon levhaya yerleştirilmiş ve *in vitro* dağıtım için tasarlanmıştır [62].

### 2.3.2. Kaplı Mikroïgneler

Kaplanmış mikroïgneler, katı mikroïgnelerin suda çözünür ilaç formülasyonlarıyla ince bir tabaka halinde kaplanmasıyla oluşturulur. Bu mikroïgnelerin çalışma mekanizması iki aşamadan meydana gelir: kaplama ve batırma. İlk aşamada mikroïgne ilaç formülasyonu ile kaplanır. Daha sonra kaplı mikroïgne cilde batırılır ve kaplanan ilaçlar deriye geçerek hızlıca emilir. Bu işlemden sonra mikroïgne cilt dışına çekilir. Mikroïgneye yüklenebilecek ilaç miktarı, iğnenin boyutu ve kaplama tabakasının kalınlığına bağlıdır [59, 63, 64]. Kaplanmış mikroïgnelerin bazı dezavantajları bulunmaktadır. Kaplama işleminin verimsiz olması, kaplı tabakanın cilde batırma esnasında ayrılması veya mikroïgnenin çekilmesi sonrası kaplama tabakasının ciltte kalması gibi sorunlar yaşanabilir [65]. Kaplanmış mikroïgneler için önemli bir hususta ilaç kaplaması için uygun tekniğin seçilmesidir. Kaplama işlemi genellikle daldırma, mürekkep püskürtmeli baskı veya çeşitli sprey kurutma teknikleriyle gerçekleştirilir.

Kaplama verimliliğini artırmak için mikroıgne yüzeyinin hidrofiliğini artıran yüzey aktif maddeleri de kullanılabilir [63, 64].

### **2.3.3. Çözünen Mikroıgneler**

Çözünen mikroıgneler, biyoyumlu polimerler veya şekerlerden üretilen çözünür matriksler kullanılarak mikrokalıplama yöntemiyle elde edilmektedir. Cilde yerleştirildikten sonra, vücut sıvısıyla temas ederek uçları çözünür ve ilaç salımı gerçekleşir. Salım kinetiği, kullanılan polimerin çözünme hızına bağlıdır. Dolayısıyla kompozisyonun veya üretim yönteminin ayarlanmasıyla salım kinetiği kontrol edilebilir [66, 67]. Çözünen mikroıgnelerin büyük bir avantajı uygulama sonrası tamamen çözünerek atık bırakmamasıdır [68].

Çözünen mikroıgneler, ilacın biyolojik olarak parçalanabilen polimerler içine yüklenmesiyle üretilir [69]. Mikroıgne stratum korneuma temas ettikten sonra çözünme gerçekleşir ve ilaç salınımı başlar. Diğer mikroıgne uygulamalarından farklı olarak, çözünme gerçekleştiği için mikroıgnenin yerleştirildikten sonra çıkarılması gerekmez. Bu sayede işlem tek adımda gerçekleştirilmiş olur. Çözünen mikroıgnelerin bu mekanizması "batır ve bırak" şeklinde adlandırılır. Polimerin deri içerisinde çözünür olması, uzun süreli tedavi için biyoyumluluğu artıran önemli bir avantajdır [70].

### **2.3.4. İçi Boş Mikroıgneler**

İçi boş mikroıgnelerin tasarımı, ilaçla doldurulacak içi boş bir kısım ve ucundaki deliklerden oluşur. Hipodermik enjeksiyona benzer bir mekanizmaya sahiptir [71]. Bu sistem, dürtme ve akış mekanizmasıyla çalışarak ilacın cilde enjekte edilmesini sağlamaktadır. İlaç cilde uygulandığında doğrudan dermisin üst kısmına ya da epidermise iletilir. İçi boş mikroıgneler, seramik, cam, metal ve silikon kullanılarak üretilir [64, 65].

Katı mikroıgnelerin dürtme ve yama mekanizmasının bazı kısıtlamaları bulunmaktadır. Mikroıgnelerin uygulanıp çıkarılmasının ardından cildin hızlıca iyileşmesinden dolayı oluşan mikrokanallar hızlıca çöker ve uygulanan ilaç deriyi geçemez. Bu, katı mikroıgnelerin başlıca sorunlarından biridir. İçi boş mikroıgneler ise stratum korneumda tedavi süresi gereğince tutulduğu için sıvı ilaç formülasyonları cilde doğrudan verilebilir. Bunların diğer avantajı ise doku örneklemesi için de kullanılabilmesidir ki bu sağlık hizmetlerinde önemli bir yere sahiptir [63, 64].

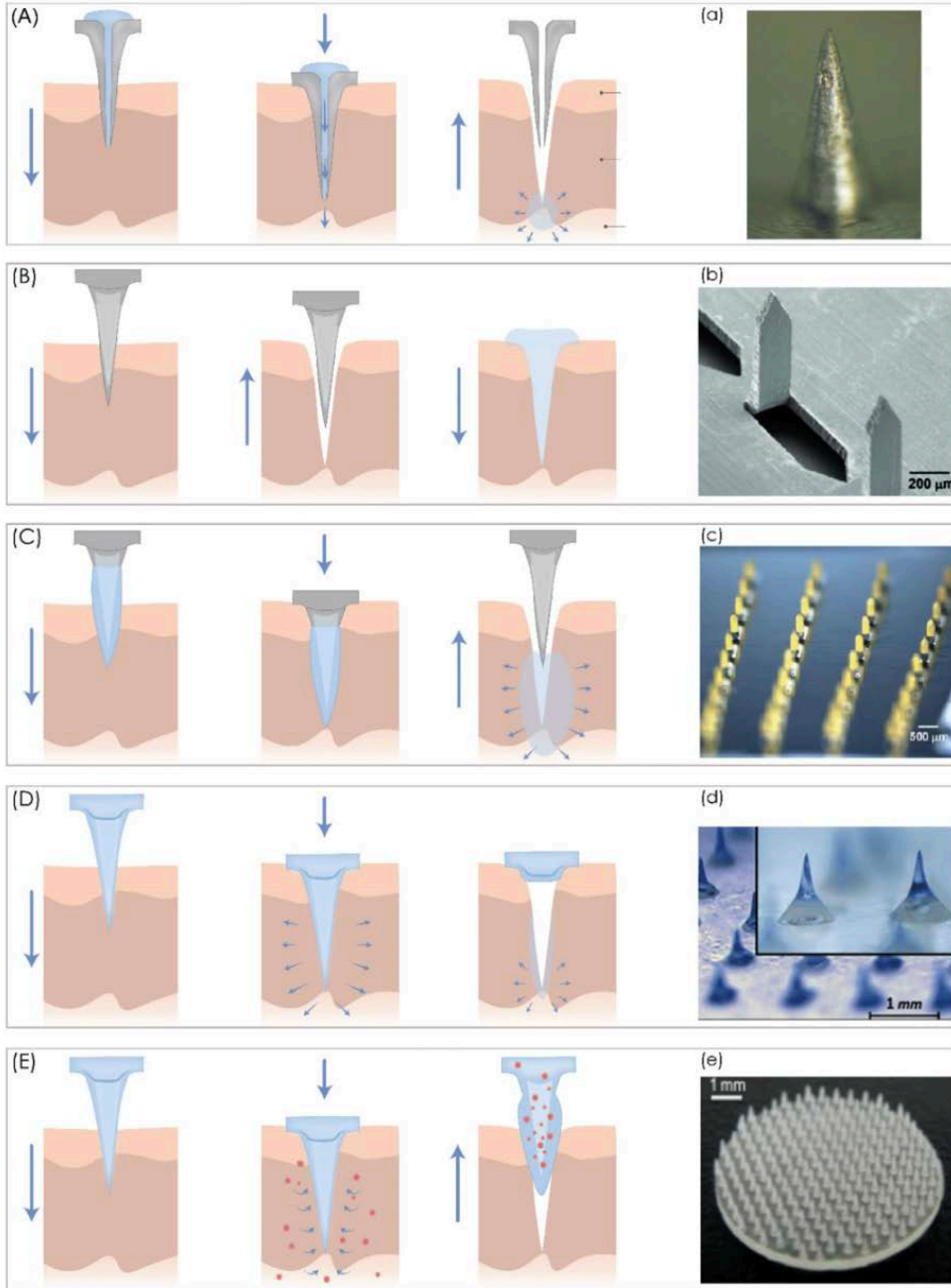
İçi boş mikroığneler genellikle yüksek ağırlıklı moleküller olan proteinler ve aşılar için kullanılmaktadır. İlaçların tüm dozunun bir kerede verildiği durumda akış hızı ve salım basıncı istenilen düzeyde ayarlanabilmektedir [55, 63]. İçi boş mikroığneler katı mikroığnelere göre üstünlükleri olmakla birlikte ilaç kanalları bulunduğu için üretimleri daha karmaşık ve zordur. Diğer bir dezavantajı ise mikrokanal tıkanması gibi sorunların oluşabilmesidir. Bu sorun ise mikroığnelerin deliklerinin merkezden uzağa taşınması ile düzeltilebilir [65, 72].

### **2.3.5. Hidrojel Mikroığneler**

Çapraz bağlı polimerik mikroığnelerden oluşan ve bir ilaç rezervuarı içeren entegre sistemlerdir. Cilde uygulandıklarında iğne uçları dokudan sıvıyı emerek şişer ve ilacın difüzyonunu indükler. İlaç salımı hidrojel çapraz bağ yoğunluğuna bağlıdır [73]. Uygulama sonrası hidrojel mikroığneler bozulmadan çıkarılabilir veya az miktarda kalıntı bırakırlar [74]. Hidrojel mikroığneler süper şişebilen hidrofilik çapraz bağlı polimerlerden elde edilmektedir. Bu polimerler deride vücut içi sıvının varlığı nedeniyle şişerken aynı zamanda kanallar oluşturarak rezervuardan salınan ilacın mikrodamarların içine girmesini sağlarlar. İĞneleme olmadan önce bu sistem sadece cilt bariyerini bozmak için kullanılır. Hidrojel mikroığneler esnektir ve deriden kolay bir şekilde bozulmadan çıkarılırlar [60, 65, 75].

Hidrojel mikroığnelerin kullanımında birçok polimer/polimer karışımları kullanılmaktadır. Bunlar arasında kitosan (CS) ve poli(vinil alkol) (PVA) yaygın olarak kullnılan polimerlerdir. Kitosan, doğal bir polisakkarit olan kitinin alkali ortamlarda işlenmesiyle elde edilen bir polimerdir. Deniz kabuklularının kabuklarından ve bazı mantar türlerinden elde edilen bu mucizevi polimer, çeşitli endüstriyel ve tıbbi uygulamalarda geniş bir kullanım alanına sahiptir. Kitosanın biyoyumluluk, antibakteriyel özelliği ve biyoçözünür olması medikal alanda yaygın kullanılmasını sağlamaktadır. Özellikle yara iyileşmesi, ilaç taşıyıcısı ve doku rejenerasyonu gibi alanlarda önemli bir rol oynamaktadır. Ayrıca gıda takviyeleri, su arıtma ve tarım gibi alanlarda da yaygın olarak kullanılmaktadır. Kitosanın evre dostu ve biyolojik olarak parçalanabilen özellikleri, onu çevresel uygulamalarda da popüler bir seçenek haline getirmektedir. Bu nedenle kitosanın çok yönlü kullanımı ve çeşitli avantajları bilim dünyasında ve endüstride önemli bir ilgi odağı olmuştur.

PVA ise sentetik bir polimer olup araştırma ve endüstriyel uygulamalarda geniş bir kullanım alanına sahiptir. PVA; çözünür, esnek, dayanıklı ve yapışkan bir yapıya sahiptir. PVA'nın en önemli özelliklerinden biri suda çözünebilmesidir. Bu özellik PVA'yı birçok su bazlı uygulama için ideal hale getirmektedir. Özellikle yapıştırıcılar, boya, tekstil, ilaçlar, gıda ambalajı ve tarım gibi alanlarda su bazlı ürünlerin üretiminde yaygın olarak kullanılmaktadır. Bununla birlikte, PVA'nın suda çözünürlüğü bazı uygulamalarda istenmeyen bir özellik olabilir. Bu durumlarda PVA, suya dayanıklı hale getirilmek üzere çeşitli kimyasal işlemlerden geçirilir. PVA'nın bir diğer önemli özelliği ise biyouyumluluktur. Bu özellik, PVA'nın tıbbi uygulamalarda kullanılmasına olanak sağlamaktadır. Özellikle yara iyileşmesinde, tıbbi pansumanlarda ve ilaç taşıyıcı sistemlerinde PVA yaygın olarak kullanılmaktadır. PVA, yüksek su çözünürlüğü sayesinde, bu tıbbi uygulamalarda kolayca biyolojik olarak parçalanabilir ve vücut tarafından emilebilir.



Şekil 2.4. Mikroïğne çeşitleri: A) İçi boş Mikroïğneler: Deriyi deler ve sıvı ilaç formülasyonunu iğne lümeni içinden salar. İçi boş mikroïğnelerin mikroskop görüntüsü (a). B) Katı Mikroïğneler: Deride mikrokanallar oluşturur ve ilaç geçirgenliğini artırır. Katı mikroïğnelerin SEM görüntüsü (b). C) Kaplamalı Mikroïğneler: İlacın kaplama filminden deriye geçişini sağlar. Kaplamalı mikroïğnelerin mikroskop görüntüsü (c). D) Çözünen Mikroïğneler: Yapının çözünmesi ile ilaç salınır. Çözünen mikroïğnelerin mikroskop görüntüsü (d). E) Hidrojel Mikroïğneler: Doku sıvılarıyla şişen mikroïğnelere ilaç salımı gerçekleşir. Hidrojel mikroïğne fotoğrafı (e) [76].

## 2.4. Mikroıgne Üretiminde Kullanılan Yöntemler ve Malzemeler

Mikroıgnelerin üretiminde; titanyum, paslanmaz çelik, paladyum, silikon, seramik, poli(laktik asit) (PLA), poli(glikolik asit) (PGA) ve kopolimerleri (PLGA) gibi birçok malzeme yaygın olarak kullanılmaktadır [77]. Seçilen malzemenin; biyouyumluluk, maliyet etkinliği, kullanım kolaylığı, yüksek aşınma direnci ve mekanik dayanıklılık gibi birçok özelliği karşılaması gerekmektedir [70]. Bu özellikler, mikroıgnelerin güvenli ve verimli bir şekilde kullanılabilmesini sağlamaktadır. Mikroıgneler, çok çeşitli uygulamalar için farklı şekil ve boyutlarda üretilmektedir. Mikroıgne üretiminde sıklıkla kullanılan malzemeler aşağıda sunulmuştur.

**Silikon:** Silikon, benzersiz özellikleriyle mikroyapı ve mikro-elektromekanik sistem üretiminde sıklıkla tercih edilmektedir [78]. Esnekliği sayesinde istenilen şekil ve boyutlarda kolayca şekillendirilebilir. Ayrıca yüksek mekanik dayanıklılıkları sayesinde cildi başarıyla delerek transdermal ilaç salımını mümkün kılmaktadır [79]. Katı, içi boş ve kaplanmış silikon mikroıgneler üretilebilmektedir. Ancak yüksek maliyet, uzun üretim süreleri ve kırılardan kaynaklanan olası sağlık riskleri dezavantajları arasındadır [80]. Var olan üretim teknikleri ve toplu üretim imkanları ile maliyetleri düşürülebilmektedir [81].

**Metal:** Paslanmaz çelik, titanyum, paladyum, paladyum-kobalt alaşımları ve nikel gibi metaller mikroıgne üretiminde kullanılmaktadır [82]. Bunlar biyouyumlu olup mekanik özellikler açısından avantaj sunmaktadırlar [83]. Paslanmaz çelik ilk kullanılan metal iken titanyum ise mikroıgneler için iyi bir alternatif olup özellikle biyosensör ve transdermal sistemlerde tercih edilmektedir [84].

**Seramik:** Alümina ( $Al_2O_3$ ) başlıca seramik türlerinden biridir. Yüksek kimyasal direnci, sıkıştırma dayanımı ve biyouyumluluğu avantajlarını oluşturmaktadır [9]. Ancak çekme kuvveti altında kırılındır ve mekanik özellikleri açısından dezavantajlıdır [85].

**Polimer:** Polimerler; biyouyumlulukları, biyobozunurlukları, düşük toksisiteleri ve düşük maliyetleri nedeniyle mikroıgne üretiminde yaygın olarak kullanılmaktadır. Çözünür/biyobozunur ve hidrojel mikroıgnelerin yanı sıra katı, içi boş ve kaplanmış polimerik mikroıgnelerin üretimi de mümkündür. Mukavemet bakımından metallere göre daha düşük performans göstermektedir ancak esnek yapıları sayesinde daha avantajlı bir uygulama sağlamaktadırlar [57]. Gelecek nesil polimerik mikroıgne kullanıma hazır testler ve ilaç salımlı yamaların geliştirilmesinde tercih edilen fabrikasyon yöntemlerinin fotolitografi, kalıp kalıplama, 3D baskı ve mikroışleme olacağı gittikçe daha açık hale

gelmektedir [86]. Diğer taraftan metaller, silikonla karşılaştırıldığında bazı toksisite sorunlarına rağmen, mikroigne üretimi için iyi mekanik özellikler ve biyouyumluluk sağlamaktadır. Fotokimyasal aşındırma, elektrokaplama ve lazer kesme, katı ve içi boş metalik mikroignelerin üretiminde kullanılan yaygın tekniklerdir [87].

Mikroigneler ilk olarak silikondan üretilmiştir. Mikroelektronik endüstrisi mikroigne üretimine uyarlanabilecek entegre devreler üretmek için araçlar sağlamıştır. Günümüzde silikon mikroigne üretiminde en yaygın şekilde kullanılan malzemedir. Bu teknoloji yaygın bir ilgi uyandırmış ve seri üretim için potansiyel sağlamıştır ancak üretim teknolojisi, özel temiz oda tesislerinde bulunan pahalı ekipman kullanan karmaşık ve çok adımlı süreçler gerektirmektedir. 3B baskı ve iki-foton polimerizasyonu (TPP) gibi alternatif üretim süreçleri, son yıllarda geliştirilen yeni dönüştürücü teknolojiler vaat etmektedir. Bu katmanlı üretim yöntemleri, 3B yapılar oluşturmak için katman katman işleme yaklaşımını kullanır. Mikroigneler için geliştirilen diğer mikrofabrikasyon yöntemlerinin aksine, bu hızlı prototipleme yöntemleri pahalı temiz oda tesisleri gerektirmez ve karmaşık geometriler daha kısa sürede ve daha az teknik uzmanlıkla gerçekleştirilebilir. Bu, bakım noktası teşhisi veya ilaç salımı için mikroakışkan elementlerin entegrasyonunu gerektiren mikroigne yama dizilerinin üretimi için büyük bir avantajdır. TPP mikroteknolojisinin Nanoscribe GmbH (Almanya) gibi şirketler tarafından yakın zamanda ticarileştirilmesi, mikron altı çözünürlükle hassas ve esnek üretim sağlamıştır [88].

Mikroigne fabrikasyonu için diğer üretim süreçleri arasında enjeksiyon kalıplama, sıcak kalıplama, lazer delme, litografi artı elektro-formlandırma, çekme litografisi ve 3B baskı yer alır. Silikon üzerinde DRIE, mikro-kalıplama, fotolitografi, litografi, elektrokaplama, kalıplama (LIGA) kullanılarak derin X-ışını litografisi mikroigne fabrikasyonu için en yaygın kullanılan üretim teknolojileri arasındadır. Ancak bazı bu yöntemlerle, özellikle DRIE ile 400 µm'den daha uzun mikroignelerin üretimi zordur. Çekme litografisi, 1600, 1200 ve 600 µm yüksekliklerinde yüksek aspekt oranlı mikroigneler için kullanılmıştır [89]. Bu teknik, SU-8 epoksi reçinesi gibi viskoelastik termoset bir polimerin spin kaplamadan sonra termal kürlenmeyi ve akışkan formda kontrollü çekmeyi içerir.

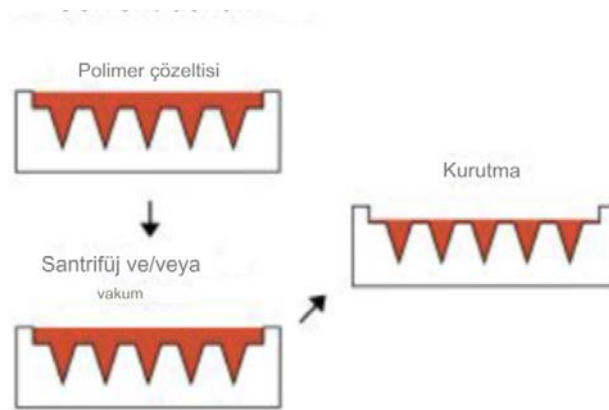
Silikon mikroignelerin fabrikasyonundaki zorluklar, karmaşık çok adımlı fabrikasyon süreçleri ve pahalı temiz oda araçları gerektirmesi nedeniyle yüksek maliyet göz önüne alındığında silikonun hala bu alanda baskın olması şaşırtıcı olabilir. Dahası, tipik silikon

mikroiğnelerin uzunlukları, kan kapillerlerine ulaşmak ve test için kan çekmek için yeterli değildir [90]. Ayrıca silikon mikroiğne üretim teknikleri, hızlı prototipleme ile uyumlu değildir ve 3D baskı gibi diğer üretim yöntemlerinin sağladığı esnekliğe sahip değildir. Silikon yerine polimerlerden mikroiğne üretmenin avantajlı alternatif yöntemleri aşağıda ele alınmıştır. Mikroiğnelerin üretimi için çeşitli metotlar kullanılmaktadır. Bu metotların seçimi, mikroiğnelerin boyutu, geometrisi, mekanik özellikleri ve amaçlanan uygulamaya bağlıdır. Yaygın olarak kullanılan metotlar aşağıda özetlenmiştir.

#### 2.4.1. Mikrokalıplama

Mikroiğnelerin üretiminde kullanılan önemli yöntemlerden biri mikro kalıplama tekniğidir. Bu teknik çeşitli şekil ve boyutlarda katı veya oyuk mikroiğnelerin üretilmesine olanak sağlamaktadır. Mikro kalıplama yönteminde ilk adım istenilen mikroiğne dizisinin negatif kalıbını oluşturmaktır. Bu kalıp, genellikle seçilen malzemeye uygun olacak şekilde silikon veya diğer uygun malzemelerden yapılmaktadır. Mikroiğnelerin üretiminde kullanılacak polimer seçilir. Seçilen polimer, biyouyumlu, mekanik olarak sağlam ve işlemeye uygun olmalıdır. Seçilen polimer çözeltisi kalıbın içine dökülür ve kalıp dolgunu halde bekletilir. Belirli bir süre sonra MN'ler kalıptan çıkarılır. Kalıptan çıkarılan mikroiğneler gerekirse ek işlemlere tabi tutulabilir.

Mikro kalıplama tekniği mikroiğnelerin şekli, boyutu ve diziliş özelliklerini kontrol etmeye olanak sağlar. Ayrıca, bu teknik büyük ölçekli üretim için uygundur [91]. Farklı kalıp malzemeleri (silikon, metal, PDMS vb.) ve polimer çözeltileri kullanılabilir.



Şekil 2.5. Mikrokalıpla yöntemi ile mikroiğne üretimi.



#### 2.4.2. Fotolitografi

Mikro-elektromekanik sistemlerin üretiminde yaygın olarak kullanılan fotolitografi tekniği mikroığne üretimine de uyarlanmıştır. Bu yöntemde foto-duyarlı polimer üzerine ışık tutularak mikroığne kalıbı oluşturulur. Sonraki adımlarda kalıp içine polimer çözeltisi dökülerek mikroığneler elde edilir [92].

#### 2.4.3. Isıl Şekillendirme

Isıl şekillendirme yöntemi polimer malzemeyi ısıtarak şekillendirmeye dayanır. Bu yöntemde, ısıtılmış polimer kalıplara aktarılır ve soğutularak şekillendirilir. Isıl şekillendirme ile metal, plastik veya silikon mikroığneler üretilebilir [92].

#### 2.4.4. Elektroğirme

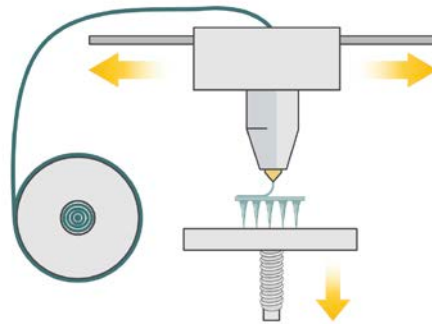
Elektroğirme, nanolifler veya mikroığne-lif kompozit yapılar elde etmek için kullanılmaktadır. Yüksek voltaj altında polimer çözeltisi elektro-ęirme cihazına verilerek ve toplayıcı üzerine lifin birikmesi sağlanır [93].

#### 2.4.5. Çekirdek/Kabuk Elektroğirme

Bu yöntem, çekirdek ve kabuk olmak üzere farklı iki bileşenden oluşan kompozit mikroığneler üretmek için kullanılmaktadır. Çekirdek ve kabuk çözeltileri ayrı kanallardan elektro-ęirme cihazına beslenir [93].

#### 2.4.6. 3B Yazıcı

3B yazıcılar, mikroığnelerin üretiminde kullanılabilecek yeni bir teknolojidir. Bu yöntemde, bilgisayar tarafından kontrol edilen bir sistemle polimerik malzeme katman katman işlenerek mikroığneler üretilir [94].



Şekil 2.6. Mikroığnelerin 3B yazıcı tekniği ile üretilmesi.

## **2.5. Mikroïgnelerin Biyomedikal Uygulamaları**

Mikroïgneler, son yıllarda birçok biyomedikal alanda umut verici bir teknoloji olarak öne çıkmaktadır. Minimal invaziv yapıları ve kontrollü ilaç/biyoaktif madde salımı özellikleri sayesinde çeşitli uygulamalarda kullanılmaktadır.

### **2.5.1. Transdermal İlaç Salımı**

Mikroïgneler, ilaçların deriden etkin bir şekilde verilmesini sağlamaktadır. Deri bariyer fonksiyonunu geçici olarak bozmak için kullanılan mikroïgneler, büyük moleküllü ilaçların dahi deriden geçişine olanak tanır. Proteinler, peptitler, aşular ve oligonükleotitler gibi biyomoleküller bu sayede transdermal olarak verilebilmektedir [95].

### **2.5.2. Deri Hastalıklarının Tedavisi**

Mikroïgneler aracılığıyla biyolojik ajanlar, aşular veya gen tedavisi doğrudan cildin epidermal ve dermal tabakalarına uygulanabilir. Bu sayede deri kanseri, egzama, sedef hastalığı gibi durumlarda hedeflenmiş ve etkin tedaviler mümkün olabilmektedir [96].

### **2.5.3. Ağrısız Biyosensörler**

İçi boş mikroïgneler, ağrısız bir şekilde küçük miktarlarda biyolojik sıvı örneği almak için kullanılabilir. Kan şekeri, laktik asit, kolesterol ve ilaç düzeylerinin sürekli izlenmesi bu teknoloji sayesinde daha konforlu hale gelmektedir [97].

### **2.5.4. Rejeneratif Tıp ve Doku Mühendisliği**

Mikroïgneler, büyüme faktörlerinin, kök hücrelerin veya biyolojik ajanların kontrollü bir şekilde dokuya verilmesinde rol oynayabilir. Doku iyileşmesi, rejenerasyonu ve yenilenmesi için bu platformlar umut verici araçlardır [93, 98].

### **2.5.5. Kozmetik ve Estetik Alanlar**

Mikroïgnelerin transdermal uygulama yetenekleri, kozmetik ve estetik ürünlerin deriye etkin penetrasyonunu sağlamak için hali hazırda kullanılmaktadır. Cildi yenileme,

sıkılaştırma, leke giderme gibi amaçlarla aktif bileşenlerin derialtı tabakalara penetrasyonu mümkün olabilmektedir [99].

### 3. DENEYSEL ÇALIŞMALAR

#### 3.1. Estradiol Türevlerinin Hücre Canlılığına Etkisi

Vasküler endotel hücreleri (vEH) laboratuvarımızda yürütülmüş olan projeler kapsamında sığır aort damarından izole edilerek karakterize edilmiş ve stoklanmıştır. Bu çalışmada da mevcut stoklar kullanılmıştır. vEC'lerin kültürü kollajen kaplı kültür kaplarında, bileşiminde %10 FBS (Sigma Aldrich, ABD), %1 l-glutamin (Cegrogen, Almanya), %0,1 penisilin-streptomisin (Cegrogen, Almanya) ve 125 µg/mL heparin (Biochrom, ABD) bulunan yüksek şeker içeriğine sahip DMEM (Cegrogen, Almanya) kullanılarak yapılmıştır. İnsan kaynaklı dermal fibroblast hücreleri (iFibH, ATCC), bileşiminde %10 FBS, %1 l-glutamin ve %0,1 penisilin-streptomisin bulunan düşük şeker içeriğine sahip DMEM (Cegrogen, Almanya) kullanılarak yapılmıştır. Her iki hücre tipi uygun sayıya getirilerek tripsinizasyon ile hücre kültür kabının yüzeyinden kaldırılarak sayılmış ve çalışmalar yapılmıştır.

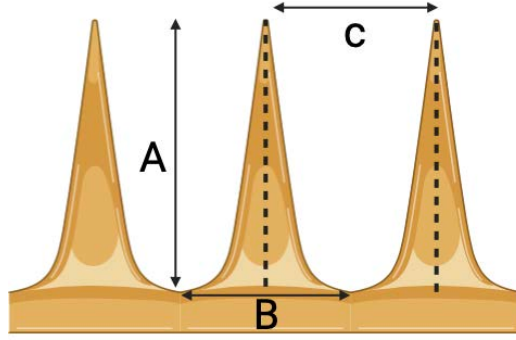
Estron (E1, Sigma Aldrich, ABD), Estradiol (E2, Sigma Aldrich, ABD) ve Estriol'ün (E3, Sigma Aldrich, ABD) vEH ve hFibH'in canlılığına olan etkilerinin tespit edilmesi amacıyla her iki hücre tipi kuyucuk başına  $1.10^4$  hücre olacak şekilde hücre kültür kabına dağıtılmış ve 24 saat kültür yapılarak hücrelerin tutunması sağlanmıştır. 24 saat sonunda  $10^{-3}$  –  $10^5$  nM konsantrasyon aralığında E1, E2 ve E3 içeren çalışma solüsyonları hazırlanarak hücrelere uygulanmıştır (n=6). 48 saat sonunda MTT analizi yapılarak konsantrasyona bağlı hücre canlılığı tespit edilmiştir. Bu amaçla, hücrelerin üzerindeki besi ortamı bileşiminde %10 MTT bulunan serumsuz DMEM ile değiştirilmiş ve 4 saat standart hücre kültürü koşullarında inkübasyon yapılmıştır. 4 saat sonunda oluşan formazan kristalleri DMSO kullanılarak çözdürülmüş ve 570 nm dalga boyunda ölçüm yapılarak absorbans değerleri ölçülmüştür. Elde edilen değerler kullanılarak % hücre canlılığı hesaplanmıştır. Negatif kontrol grubu olarak büyüme ortamı ve pozitif kontrol grubu olarak ise %10 DMSO içeriğine sahip büyütme ortamı kullanılmıştır. Elde edilen sonuçlar tek yönlü ANOVA yöntemi kullanılarak istatistiksel analiz yapılmış ve gruplar arasında çoklu karşılaştırma Tukey yöntemi kullanılarak yapılmıştır.

### **3.2. Estradiol Türevlerinin Anjiyogenez Etkisinin incelenmesi**

Östrojen türevlerinin anjiyogenik etkileri aortik halka deneyi ile analiz edilmiştir. Aortik halka deneyi laboratuvarımızda optimizasyonu yapılmış ve sıklıkla çalışılan bir yöntemdir. Deneyde aortik halka donörü olarak tavuk embriyoları kullanılmıştır. Aortik halkaları alınacak yumurtalar Tavukçuluk Araştırma Enstitüsünden temin edilmiş ve yumurtalar inkübatöründe 14 gün boyunca 37°C’de inkübe edilmiştir. Daha sonra embriyolara dekapitasyon ile terminal işlem yapılmıştır. Aortik halkanın en az hasarla ve bir bütün halinde çıkartılabilmesi için aşamalı bir protokol takip edilmiştir. Öncelikle embriyoların göğüs kafesi açılmış ve aort damarının önündeki ve etrafındaki dokular uzaklaştırılmıştır. Aort damarlarının kalp-vücut hattı boyunca açıkça görüldüğü durumda aort damarları kalp ile vücuttan çıkartılmıştır. Aort damarları alındıktan sonra bir sonraki aşamaya kadar PBS içerisinde saklanmıştır. Sonraki aşamada diseksiyon mikroskobu kullanılarak aort damarları kalpten ayrılmıştır ve tek bir köke bağlı 5 aort damarı birbirinden ayrılarak etrafındaki yağ ve bağ dokular tamamen temizlenmiştir. Aort damarları 1 mm’lik halkalara bölünerek toplanmıştır. 48 kuyucuklu plakaların her birine 20 µL ECM Gel (Sigma-Aldrich, USA) damlatılarak 3B ortam oluşturulmuş ve üzerine bu aortik halkalar yerleştirilmiştir. Bütün halkalar yerleştirildikten sonra jelleşmenin gerçekleşmesi amacı ile 30 dk. boyunca 37 °C’de inkübasyon yapılmıştır. İnkübasyon süresinin sonunda E1, E2 ve E3 hormonlarından hazırlanmış stok çözeltileri 5 farklı konsantrasyonda (100 pM, 10 pM, 1 nM, 10 nM, 100 nM) seyreltilerek deney grupları hazırlanmıştır. Aortik halka kültüründe ve seyreltme çözeltileri olarak %2,5 FBS içeren DMEM (HG) kullanılmıştır. Her bir aortik halka üzerine 250 µL besi ortamı eklenerek 37 °C’de kültüre başlanmıştır (0. gün). Farklı konsantrasyonlarda östrojenler kullanarak östrojenlerin anjiyogenez üzerinde doza bağlı etkisinin incelenmesi amaçlanmıştır. Aortik halka kültürünün 3. ve 5. günlerinden alınan görüntülerin analizi yapılarak östrojenlerin anjiyogenez üzerinde zamana bağlı etkisi incelenmiştir. Mikroskopik görüntüler anjiyogenezin değerlendirilmesi amacı ile iki farklı parametreye göre analiz edilmiştir. Image J kullanılarak aortik halkaların dış çeperinden itibaren en uzak noktaya ulaşmış endotel filizlenme uzunlukları (n=3) ve endotel filizlenmelerinin ve dallanmalarının oluşturduğu ağ yapısının 4 farklı noktasından alınan ağ yapısı uzunlukları ölçülerek istatistiksel analizler gerçekleştirilmiştir.

### 3.3. Kitosan/Poli(vinil alkol) Mikroıǵnelerin Üretimi

Kitosan/poli(vinil alkol) (CS/PVA) mikroıǵnelerin üretimi için poli(dimetilsiloksan) (PDMS) kalıplar (Micropoint Technologies Pte Ltd, Singapur) temin edilmiş ve mikroıǵneler pyramidal silikon kalıp kullanılarak üretilmiştir. Mikroıǵnelerin üretimi için taban yapısı olarak dörtgen piramit geometrisi tercih edilmiştir. Bu geometrinin tercih edilmesinin nedeni, deriyi daha etkin bir şekilde delebilmesi ve mikroıǵnelerin daha sağlam bir yapıya sahip olmasıdır. PDMS kalıplarda her bir mikroıǵnenin tabanı  $0.8 \times 0.8$  cm<sup>2</sup> boyutlarında olup mikroıǵneler  $10 \times 10$ 'luk bir dizilimle sıralanmıştır. Mikroıǵnelerin yüksekliği 800 µm, taban genişliği 200 µm ve merkez-merkez uzaklığı 500 µm'dir (Şekil 3.1).

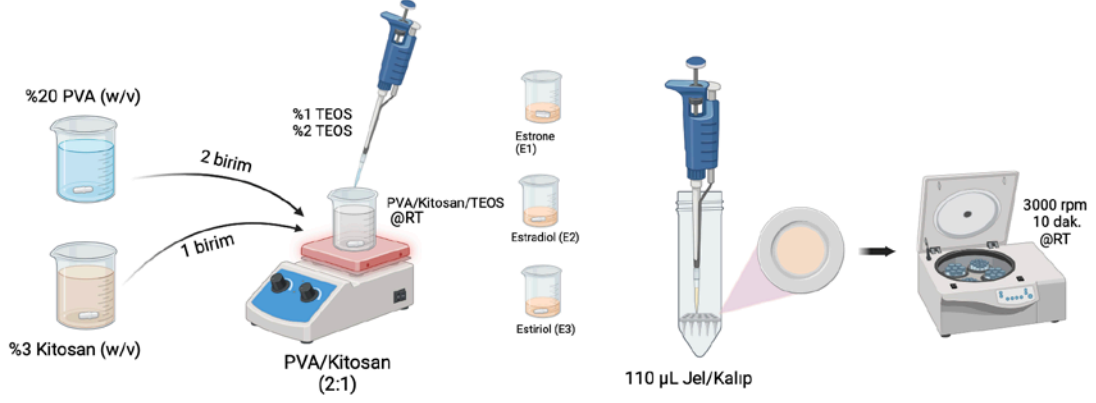


Şekil 3.1. Silikon kalıplardaki mikroıǵne boyutları. A) Yükseklik: 800 µm, B) Taban genişliği: 200 µm, C) Merkez-Merkez uzaklığı 500 µm.

Mikroıǵnelerin üretiminden önce PDMS kalıplar temizlenmiştir. Daha sonra kitosan asetik asit içinde çözdürülerek %3'lük çözeltisi hazırlanmış ve pH'sı 6-7 aralığına ayarlanmıştır. Kullanılan kitosan düşük molekül ağırlıklı olup deasetilasyon oranı %77,5'dir (Sigma Aldrich/İzlanda). Daha sonra %20'lik PVA (Mw=145000, Sigma Aldrich/Almanya) çözeltisi ile 2:1 oranında karıştırılarak oda sıcaklığında 30 dakika boyunca karıştırmaya devam edilmiştir. Ardından, %2'lik tetraetilortosilikattan (TEOS) çözeltisi eklenerek 30 dakika daha karıştırma işlemi gerçekleştirilmiştir.

Mikroıǵnelere üç farklı östrojen türevi (estrone, β-estradiol ve estriol) yüklenmiştir. Bu amaçla östrojen türevleri 1 mg tartılarak uygun çözücüde 1 mL'lik çözeltileri hazırlanmıştır. β-estradiol için etanol, estriol için aseton, estron için ise dimetilsülfoksit (DMSO) çözücü olarak kullanılmıştır. Çapraz bağlayıcı olarak östrojen içeren polimer çözeltilerine %1 ve %2 (v/v) oranlarında TEOS 1 mL etanolde karıştırılmış ve 3 mL

polimer çözeltilisine eklenmiştir. Daha sonra 100 µL polimer çözeltisi kalıplara dökülmüş ve 3000 rpm'de 10 dakika santrifüj edilmiştir (Şekil 3.1). Örnekler daha sonra 31°C'de 24 saat kurumaya bırakılmıştır.



Şekil 3.2. Mikroığne üretim metodunun şematik gösterimi.

Mikroiğnelerin kararlılıklarını artırmak için ikinci bir yol olarak mikroığneler gluteraldehit buharına maruz bırakılmıştır. Bu amaçla mikroığneler kurutma işleminden sonra 15, 30 ve 60 dakika süresince % 25'lik (v/v) gluteraldehit buharı ile çapraz bağlanmaya tabi tutulmuş ve daha sonra mikroığneler yıkanarak gluteraldehitin fazlası uzaklaştırılmıştır.

Tablo 3.1. Üretilen MN'lerin kompozisyonu.

MN	CS % (w/v)	PVA % (w/v)	E1 10µg	E2 10µg	E3 10µg	TEOS % (v/v)	Gluteraldehit Vapor (dakika)		
							15	30	60
MN	3	20	-	-	-	-	-	-	-
MN-T1E1	3	20	+	-	-	1	-	-	-
MN-T1E2	3	20	-	+	-	1	-	-	-
MN-T1E3	3	20	-	-	+	1	-	-	-
MN-T2E1	3	20	+	-	-	2	-	-	-
MN-T1E2	3	20	-	+	-	2	-	-	-
MN-T1E3	3	20	-	-	+	2	-	-	-
MN-Glu15	3	20	-	-	-	-	+	-	-
MN-Glu15E1	3	20	-	+	-	-	+	-	-
MN-Glu15E2	3	20	-	-	+	-	+	-	-
MN-Glu15E3	3	20	-	-	+	-	+	-	-
MN-Glu30	3	20	-	-	-	-	-	+	-
MN-Glu30E1	3	20	+	-	-	-	-	+	-
MN-Glu30E2	3	20	-	+	-	-	-	+	-
MN-Glu30E3	3	20	-	-	+	-	-	+	-
MN-Glu60	3	20	-	-	-	-	-	-	+
MN-Glu60E1	3	20	+	-	-	-	-	-	+
MN-Glu60E2	3	20	-	+	-	-	-	-	+
MN-Glu60E3	3	20	-	-	+	-	-	-	+



### **3.4. Mikroïğnelerin Karakterizasyonu**

#### **3.4.1. FTIR Analizi**

Etken maddelerin ve hazırlanan mikroïğnelerin kimyasal yapıları Fourier Dönüşümlü Kızılötesi Spektroskopisi (FTIR, Thermo Scientific/Nicolet iS50, ABD) ile 4000 - 500  $\text{cm}^{-1}$  dalga boyu aralığında incelenmiştir.

#### **3.4.2. Mikroïğnelerin Sitotoksite Analizi**

Östrojen türevlerini içeren ve farklı çapraz bağlayıcılar kullanılarak hazırlanan mikroïğnelerin hücre üzerinde toksik etki gösterip göstermediklerinin araştırılması amacıyla laboratuvarımızda rutin olarak kullanılan indirekt toksisite analizi yapılmıştır. Bu amaçla TEOS içeren (%1 ve %2) ve gluteraldehit buharına maruz bırakılarak (15, 30 ve 60 dak.) çapraz bağlanmış E1, E2 ve E3 içeren mikroïğneler 45 dak. UV altında sterilize edilmiştir ve 2 defa PBS ile yıkanmıştır. Yıkanan örnekler 500  $\mu\text{L}$  büyütme ortamı ile 72 saat standart hücre kültür koşullarında inkübe edilmiş (n=3) ve ekstraktlar elde edilmiştir. Elde edilen ekstraktlar 96 gözlü kültür kabında kültürleri yapılan fare fibroblast hücrelerine (L-929,  $1.10^4$  hücre/kuyucuk) uygulanmış (n=12) ve 24 saat inkübasyon yapılmıştır. 24 saat sonunda MTT yapılarak % hücre canlılığı hesaplanmıştır.

#### **3.4.3. Mikroïğnelerin Morfolojik Analizi**

Üretilen mikroïğnelerin görüntüleri ışık mikroskobu (Leica DM4000 B) ve Taramalı Elektron Mikroskobu (SEM, GAIA3+Oxford XMax 150 EDS) ile incelenerek morfolojileri ve iğne boyutları analiz edilmiştir.

#### **3.4.4. Mikroïğnelerin Mekanik ve Penetrasyon Analizleri**

Mikroïğnelerin mekanik dayanımı ve elastik özellikleri Tekstür Analizörü kullanılarak basma testi ile belirlenmiştir. Bu test, mikroïğnelerin dayanıklılığını, kırılma noktalarını ve deformasyon davranışlarını analiz etmek için kullanılmaktadır. Bu amaçla mikroïğneler hazırladıktan sonra cihazın numune alım yerine iğneler yukarıya bakar şekilde konulmuştur. Cihazın probu iğnelere maksimum kuvvet uyguladıktan sonra iğneler kırıldığını geri dönerek, yamalara uygulanan kuvvet-mesafe grafikleri elde edilmiştir (n=3).

Mikroïğnelerin mekanik özelliklerini incelemek için literatürde yaygın olarak kullanılan diğer bir test ise Parafilm M® testidir. Bu tez çalışmasında mikroïğnelerin parafilm

katmanlarındaki penetrasyonlarını incelemek için sert bir yüzey üzerine 10 katman Parafilm M® yerleştirilmiş ve mikroiğne grupları, iğneler Parafilm M® ile temas edecek şekilde konumlandırılmıştır. Ardından, mikroiğnelerin üzerine yaklaşık 1 dakika süreyle 5 kg'lık (49N) bir ağırlık uygulanmıştır. Daha sonra, mikroiğneler Parafilm M® üzerinden çıkarılmış ve dijital el mikroskobu altında deformasyonlar incelenmiştir. Ek olarak, her Parafilm M® katmanı birbirinden ayrılarak oluşan delikler tespit edilmiştir.

### 3.4.5. Mikroiğnelerin DSC Analizi

Mikroiğnelerin termal özellikleri (camsı geçiş sıcaklıkları (T<sub>g</sub>) ve erime sıcaklıkları (T<sub>m</sub>) Diferansiyel Taramalı Kalorimetri (DSC, Perkin Elmer DSC-8000) ile azot atmosferi altında incelenmiştir. Analizler 30°C – 400 °C sıcaklık aralığında ve 10 °C/dakika ısıtma hızı ile gerçekleştirilmiştir.

### 3.4.6. Mikroiğnelerin Su tutma ve Degradasyon Analizi

Mikroiğnelerin su tutma kapasitelerini ölçmek için mikroiğneler öncelikle -80°C'de 4 saat boyunca dondurulmuş ve ardından gece boyunca bir liyofilizatörde kurutulmuştur. Liyofilizasyon işleminden sonra mikroiğnelerin başlangıç kuru ağırlıkları (W<sub>0</sub>) bir hassas terazi kullanılarak ölçülmüştür. Daha sonra mikroiğneler saf su içinde 3 saat ve 24 saat boyunca oda sıcaklığında bekletilmiş, sudan çıkarılmış ve yüzeyindeki fazla su uzaklaştırıldıktan sonra ağırlıkları (W) kaydedilmiştir. Mikroiğnelerin su tutma kapasiteleri 3 ve 24 saat sonunda ayrı ayrı aşağıdaki formül ile hesaplanmıştır:

$$\text{Su Tutma kapasitesi (\%)} = \left[ \frac{(W - W_0)}{W_0} \right] \times 100$$

MN'lerin bozunma davranışını incelemek için numuneler -80°C'de dondurulmuş ve liyofilizatörde kurutulmuştur. Kurutulmuş MN'lerin ağırlıkları hassas terazide tartılmış (W<sub>0</sub>) ve daha sonra saf su içinde oda sıcaklığında bekletilmiştir. Numuneler belli zaman aralıklarında çıkarılarak dondur-kurut işlemi yapıldıktan sonra ağırlıkları ölçülmüştür (W<sub>t</sub>) (n=3). Daha sonra aşağıdaki formül ile % kütle kaybı hesaplanmıştır.

$$\text{Kütle kaybı (\%)} = \left[ \frac{(W_0 - W_t)}{W_0} \right] \times 100$$

### 3.5. Mikroğnelerin Anjiyogenik Özelliklerinin İncelenmesi

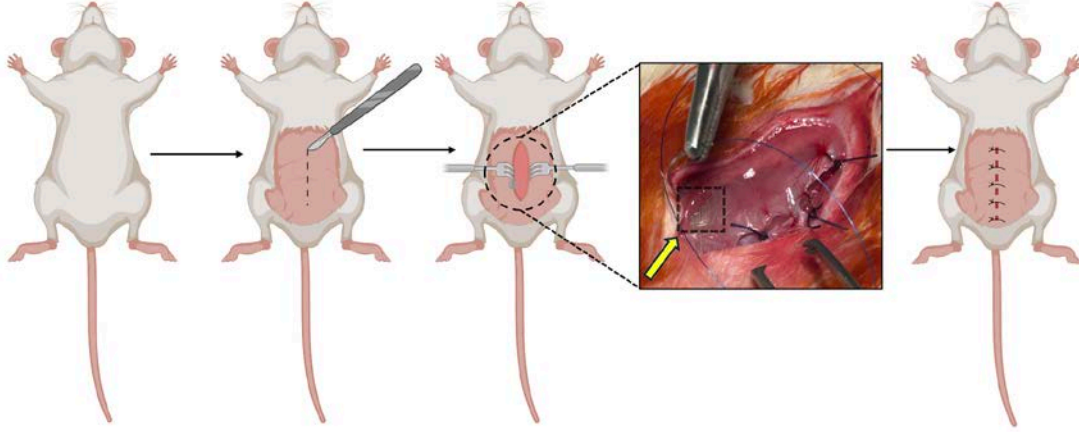
Östrojen türevleri yüklü MN'lerin anjiyogenik etkisi *in ovo* tavuk embriyosu koryoallantoik membran (CAM) yöntemi ile tayin edilmiştir. Bu amaçla döllenmiş tavuk yumurtaları kullanılmıştır. Döllenmiş tavuk yumurtaları SPF T.C Tarım ve Orman Bakanlığı İzmir Bornova Veteriner Kontrol Enstitüsü'nden temin edilmiştir. Yumurtalar öncelikle %20'lik etanol ile silinmiş ve ardından 45 dakika boyunca ultraviyole (UV) ışınlarına maruz bırakılarak sterilize edilmiştir. Sterilizasyon işleminden sonra yumurtalar 37.5°C'de ve %70 nemli ortamda 3 gün boyunca kuluçka makinesinde (Cimuka Kuluçka Makineleri Ltd. model: PD30SH) tutulmuştur. 3.günün sonunda yumurtalar temiz bir ortama alınmış ve yumurta kabuklarının alt kısmına elektrikli matkap ile çapı yaklaşık 0.8 mm olan küçük bir delik açılmıştır. Bir enjektör yardımı ile embriyoyu kabuktan uzaklaştırmak için yumurtanın beyazından yaklaşık 10 mL çekilmiştir ve delik bantlanmıştır. Ardından pencere açılacak bölgedeki kabuk inceltilerek yaklaşık 1.5 cm x 1.5 cm ölçülerine sahip bir pencere açılmıştır. 7.günde açılan pencere bölgesindeki kabuk, steril bir cımbız yardımıyla çıkarılmıştır. CAM'lere uygulanacak MN'ler (MN-Glu60, MN-Glu60E1, MN-Glu60E2, MN-Glu60E3) 45 dk. UV ile steril edildikten sonra açılan bölgeye yerleştirilmiş ve pencere steril bir bant ile kapatılmıştır. Yumurtalar tekrar kuluçka makinesine konulmuştur. 12.günde yumurtalar kuluçka makinesinden alınmış ve pencere bölgesi fotoğraflama için genişletilmiştir. Membranın altına CAM üzerindeki damarlanmanın açıkça görüntülenebilmesi için beyaz krem enjekte edilmiş ve CAM, mikroğne uygulama bölgesinde oluşan değişikliklerin (damar oluşumu, enflamasyon, kanama vb.) gözlenmesi için fotoğraflanmıştır. Fotoğraflar, Image J programı kullanılarak analiz edilmiş ve elde edilen veriler t-test ile istatistiksel olarak değerlendirilmiştir.

### 3.6. Mikroğnelerin *İn Vivo* Doku Yanıtının Histopatolojik Değerlendirilmesi

Üretilen mikroğnelerin *in vivo* doku yanıtının değerlendirilmesi amacıyla mikroğneler 300- 400 gr ağırlığında ve doğurgan çağıdaki dişi sıçanların deri altına implant edilmiştir. Bu amaçla kontrol grubu olarak MN-Glu60 mikroğnelerin ve en yüksek glutaraldehit buharına maruz kalmış ve E2 içeren mikroğnelerin doku yanıtları inflamasyon, damarlanma ve kolajen açısından değerlendirilmiştir.

Mikroğnelerin implantasyonu hayvanlara anestezi verildikten sonra, karın alt kısmında 2 cm'lik bir insizyon yapılarak yerleştirilmiştir. Mikroğneler yerleştirildikten sonra 5/0

Prolen sütür materyali ile tek bir dikiş ile etraf dokulara tespit edilmiştir. Ardından karın ön duvarı usulüne uygun olarak kapatılmıştır. İmplantasyon sonrası 14. günde hayvanlar sakrifiye edilerek dokuları histolojik inceme için ayrılmıştır.



şekil 3.3. Mikroığnelerin deri altına implasyonunun şematik gösterimi.

### 3.6.1. Histolojik Analizler

Histolojik analizler için fiksasyon işleminden geçirilen dokular, parafin içerisine gömülmüş ve 7 mikron kalınlığında kesitler alınmıştır. Daha sonra bu kesitler, Mayer'in hematoksilen eozin ve Masson'un trikromu boyama yöntemleri kullanılarak boyanmış ve mikroskop altında incelenmiştir. Gerçekleştirilen yöntemler aşağıda kısaca özetlenmiştir.

**Hematoksilen Eozin Boyama Yöntemi:** Boyama için alınan doku kesitleri deparafinizasyon işlemi için, öncelikle bir gece boyunca 60°C'deki etüvde bekletilmş ve ardından toplamda 45 dakika süreyle (3 defa 15'er dakika) ksilol solüsyonunda tutulmuştur. Ksilolden ıkarılan ve kurutulanan kesitler daha sonra, rehidratasyon amacıyla önce %96'lık alkolde toplam 20 dakika (2 defa 10'ar dakika), ardından %80'lik alkolde 10 dakika bekletilmştir. eşme suyunda yıkanan kesitler, 15 dakika Mayer's Hematoksilin solüsyonu içinde bekletilerek boyanmıştır. Tekrar yıkanan kesitler, amonyaklı suya daldırılıp çıkarıldıktan sonra tekrar eşme suyuyla yıkanmıştır. Bir sonraki aşamada, kesitler eozin solüsyonunda 1 dakika bekletilerek boyanmıştır. Dehidratasyon için önce %80'lik, ardından iki kez %96'lık alkoller kullanılmıştır. En az 45 dakika ksilol ile şefflaştırma işleminden sonra, kesitler entellan ile kapatılmıştır.

**Masson'un Trikromu Boyama Yöntemi:** Deparafinize edilen kesitler, sırasıyla %96, %96 ve %80'lik alkoller içinde 10'ar dakika rehidrate edildikten sonra çeşme suyunda yıkanmıştır. Hematoksilen solüsyonunda 25 dakika bekletildikten sonra yıkanıp amonyaklı suya batırılmıştır. Yıkama sonrası 20 dakika trikrom boya solüsyonunda bekletilmiştir. Ardından 3 dakika asetik asit solüsyonunda bekletilen kesitler, sırasıyla %80 ve %96'lık alkollerden geçirilip kurutulmuştur. Kurutulan kesitler, en az 45 dakika ksilol ile şeffaflaştırıldıktan sonra entellan ile kapatılmıştır. Hematoksilen eosin ve Masson'un trikrom boyası ile boyanan kesitler, dijital kameralı (Leica DC490, Wetzlar-Almanya) ışık mikroskobu (Leica 6000B) ile incelenip ve fotoğraflanmıştır.

### 3.6.2. Değerlendirme Kriterleri ve Skorlama

Her örnekte eksplant çevresindeki dokuda çakışmayan 5 farklı alan 200X büyütmede inflamatuvar hücrelerin ve damarların varlığı açısından Tablo 3.12'de belirtilen kriterlere göre değerlendirme yapılarak skorlama gerçekleştirilmiştir [100, 101].

Tablo 3.2 Skorlama kriterleri.

Değerlendirme Kriteri	Skor				
	0	1	2	3	4
İnflamasyon	Yok	0 ile 5 arasında İnflamatuvar hücre	6 ile 10 arasında İnflamatuvar hücre	11 ile 20 arasında İnflamatuvar hücre	20'den fazla İnflamatuvar hücre
Damarlanma	Yok	1 ile 5 arasında kan damarı	6 ile 10 arasında kan damarı	11 ile 20 arasında Kan damarı	20'den fazla Kan damarı

### 3.6.3. *In Vivo* Verilerinin İstatistiksel Analizi

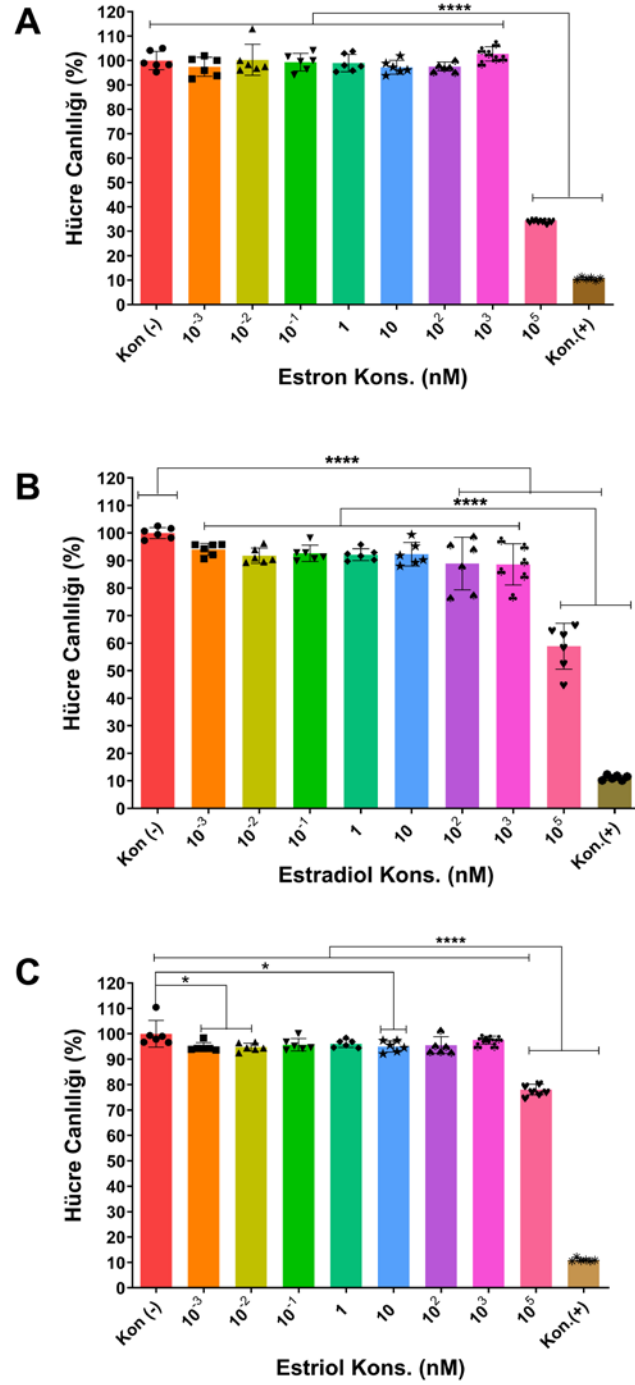
Polimorfonükleer lökosit, mononükleer hücre, bağ dokusu organizasyonu, damarlanma skorlamaları ve dev hücre sayımı verilerinin istatistiksel analizleri, tek yönlü ANOVA testi kullanılarak yapılmıştır. Gruplar arasındaki farklılıkların istatistiksel anlamlılığı ise Tukey post-hoc testi ile değerlendirilmiştir.  $p < 0.05$  değeri istatistiksel anlamlılık sınırı kabul edilmiş ve sonuçlar;  $p < 0.05$ ,  $*p < 0.01$ ,  $***p < 0.001$  ve  $****p < 0.0001$  şeklinde ifade edilmiştir. İstatistiksel analizler GraphPad programının 10 versiyonu kullanılarak gerçekleştirilmiştir.

## 4. SONUÇLAR VE TARTIŞMA

### 4.1. Östrojen Türevlerinin Hücre Canlılığına Etkisi

Östrojen türevlerinin (E1, E2 ve E3)  $10^{-3}$ - $10^5$  nM konsantrasyon aralığında Vasküler Endotel Hücre (vEH) ve Deri Fibroblast Hücre (iFibH) canlılığına etkileri MTT ile incelenmiş ve elde edilen veriler sırasıyla Şekil 4.1 ve 4.2’de sunulmuştur.

vEH’lerine  $10^5$  nM’den düşük olan konsantrasyonlarda ( $10^{-3}$ - $10^3$  nM) östrojen türevleri uygulandığında hücre canlılığı %88 ve üzerinde ölçülmüş olup herhangi bir toksisite tespit edilememiştir.  $10^5$  nM konsantrasyonunda uygulanan E1, E2 ve E3’ün hücre canlılığı sırasıyla %34,5, %58,89 ve %78 olarak ölçülmüş olup test edilen diğer konsantrasyonlara ve negatif kontrol grubuna göre anlamlı bir düşüş göstermiştir ( $p<0.0001$ ). (Şekil 4.1). E1 ile muamele edilmiş vEH’inde  $10^{-3}$  ve  $10^3$  nM konsantrasyonlarda ölçülen hücre canlılığı negatif kontrol grubu ile benzer bulunmuştur ( $p>0.05$ ) (Şekil 4.1A).  $10^2$  ve  $10^3$  nM E2’ye maruz bırakılan vEH’lerde canlılık sırasıyla %88,9 ve %88,6 olarak ölçülmüştür. Bu değerler negatif kontrol grubuna göre anlamlı olarak düşük bulunmuş olmakla birlikte ( $p<0.01$ ) toksik olmayan aralıktadır (Şekil 4.1B). Benzer şekilde,  $10^{-3}$ ,  $10^{-2}$  ve 10 nM konsantrasyonlarda E3 ile muamele edilmiş hücrelerde canlılık %95 olarak hesaplanmıştır (Şekil 4.1C). Sonuç olarak 48 saat boyunca E1, E2 ve E3’e maruz bırakılan vEH’inde  $10^3$  nM ve daha düşük konsantrasyonlarda herhangi bir toksisite tespit edilmemiş olup  $10^5$  nM konsantrasyonda ise yüksek toksisite gözlenmiştir. Bu sonuçlar östrojen türevlerinin  $10^5$  nM’den düşük konsantrasyonların hücre çoğalması üzerinde toksik bir etkisinin olmadığı ve devam eden çalışmalarda  $10^{-3}$  ve  $10^3$  nM aralığında E1, E2 ve E3 kullanılabileceğini göstermiştir.

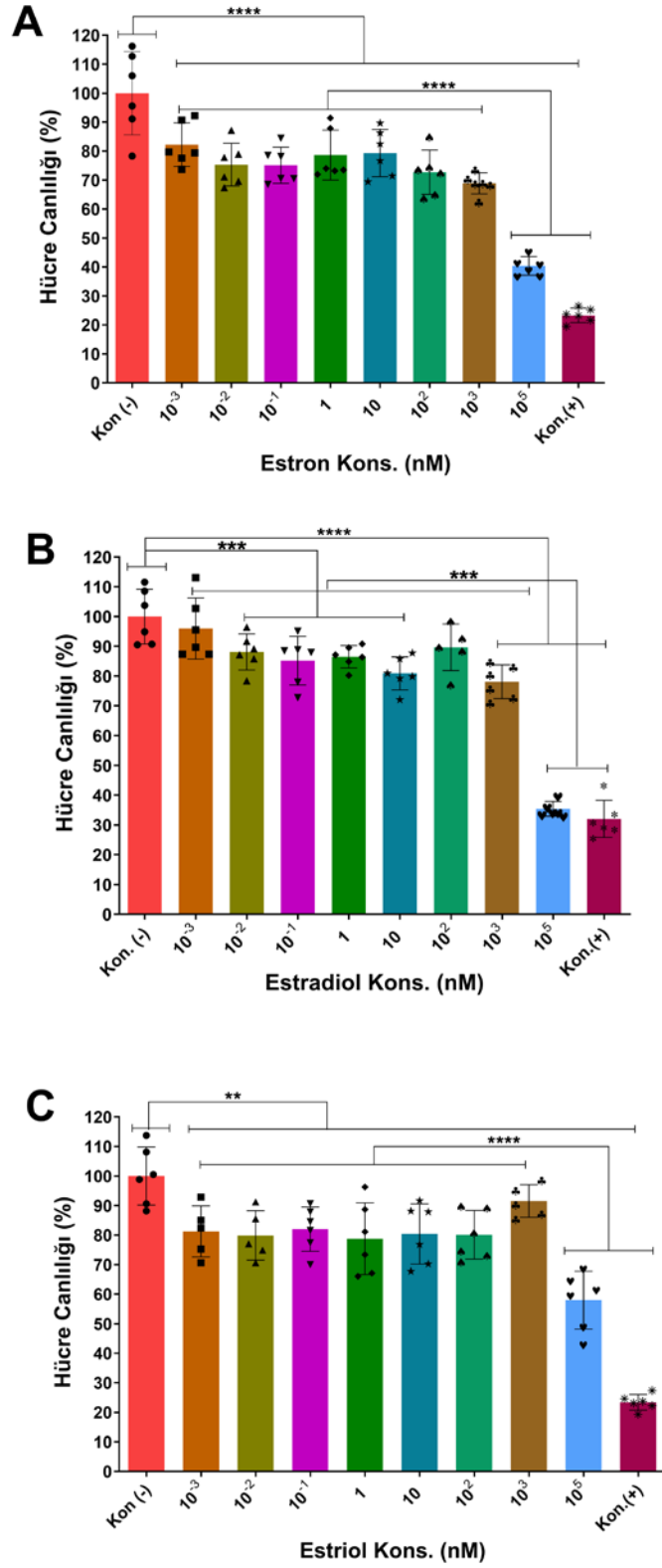


Şekil 4.1. Östrojen türevlerinin vasküler endotel hücre canlılığına etkisi: A) Estron (E1), B) Estradiol (E2) ve C) Estril (E3) (\* p<0.05 ve \*\*\*\* p<0.0001).

Östrojen türevlerinin fibroblast hücre canlılığı üzerine etkisi  $10^{-3}$  –  $10^5$  nM konsantrasyon aralığında tespit edilmiş ve sonuçlar Şekil 4.2’de verilmiştir. E1, E2 ve E3’ün fibroblast hücreleri üzerine etkisinin benzer olduğu, negatif kontrol grubu ile kıyaslandığında hücre canlılığında düşüş neden olduğu ancak bunun  $10^5$  nM grubu dışında toksik aralıkta olmadığı gözlenmiştir. Negatif kontrol grubu ile kıyaslandığında,  $10^5$  nM E1, E2 ve E3 uygulandığında hücre canlılığı anlamlı bir şekilde azalmakta olup sırasıyla %40,38, %35,41 ve %58,02 olarak bulunmuştur ( $p<0.05$ ). E1’in test edildiği konsantrasyonlarda hücre canlılığı  $10^3$  nM olan grupta %68 ölçülürken diğer tüm gruplarda %70’in üzerinde hesaplanmış olup toksik olmadığı tespit edilmiştir.  $10^5$  nM E1 uygulanan hücrelerde ise canlılık test edilen diğer tüm konsantrasyonlara göre anlamlı olarak düşük bulunmuştur ( $p<0.05$ ) (Şekil 4.2A).  $10^5$  nM E2 ve E3 uygulanan hücrelerde de canlılık diğer gruplara göre anlamlı olarak düşük bulunmuştur ( $p<0.05$ ). Fibroblast hücrelere  $10^{-3}$ - $10^2$  nM aralığında E2 ve E3 uygulandığında canlılık %80’in üzerinde hesaplanmış olup toksisite tespit edilmemiştir (Şekil 4.2B ve C).

Sonuç olarak; fizyolojik konsantrasyonlarda ( $10^{-3}$  - $10^3$  nM) [32] test edilen östrojen türevlerinin hem endotel hem de fibroblast hücrelerinin canlılıklarını artırmadıkları,  $10^5$  nM konsantrasyonunda ise düşürdükleri tespit edilmiştir. Bununla birlikte literatürde östrojen türevlerinin hücre çoğalmasını artırdığı bildirilmiştir [102, 103]. Bunun muhtemel sebebinin E1, E2 ve E3’ün uygulama süresi olabileceği düşünülmüştür. Ayrıca MTT analizi mitokondrial aktivitenin ölçülmesi prensibine dayanan bir yöntemdir. Dolayısıyla test edilen konsantrasyonlarda hücrelerin metabolik aktivitelerinin değişmemiş olma ihtimali de göz ardı edilmemelidir. Bununla birlikte östrojen türevlerinin genomik ve non-genomik düzeyde gösterdikleri etki mekanizmaları düşünüldüğünde hem fibroblast hem de endotel hücrelerinde moleküler düzeydeki değişimlerin incelenmesi gerekmektedir.





Şekil 4.2. Östrojen türevlerinin insan fibroblast hücre canlılığına etkisi: A) Estron (E1), B) Estradiol (E2) ve C) Estriol (E3) (\*\*\*)  $p < 0.001$  ve \*\*\*\*)  $p < 0.0001$ ).

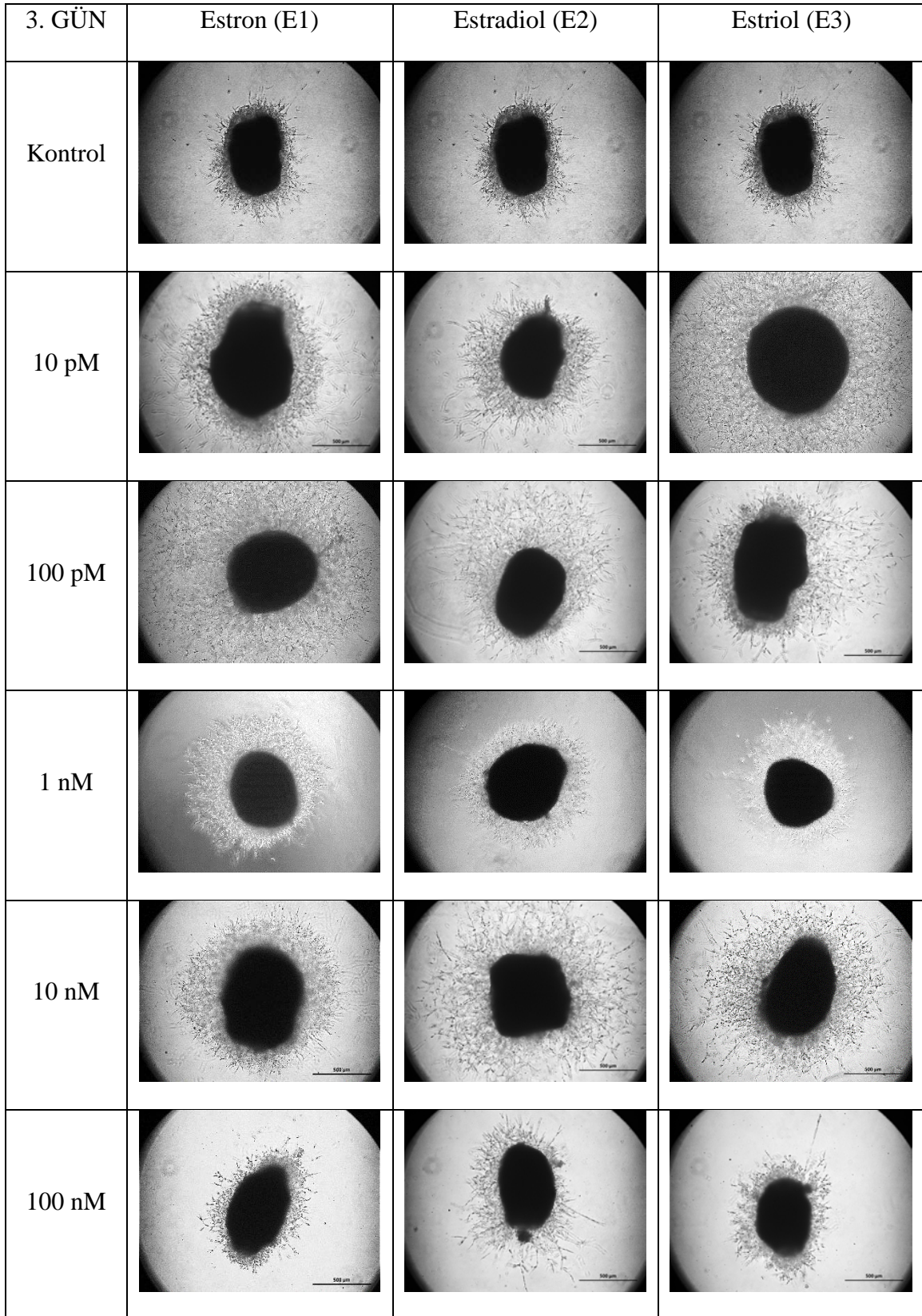
## 4.2. Östrojen Türevlerinin Anjiyogenik Etkisi

Östrojen hormonlarının memelilerde özellikle yumurtalama döneminde anjiyogenez sürecine dahil olduğu bilinmektedir [104]. Bu tez kapsamında östrojen türevlerinin (E1, E2, E3) anjiyogenez üzerinde doza ve zamana bağlı etkileri aortik halka deneyi ile araştırılmıştır. Bu yöntem anjiyogenez çalışmalarında endotel hücrelerinin 2-boyutlu ortamda kültür edilerek tüp oluşumunun tayin edilmesine göre çok daha gelişmiş bir metottur. Anjiyogenez tanımında belirtilen var olan damardan yeni damar oluşumu sürecinin direkt olarak *in vitro* koşullarda taklit edilmesine olanak sağlamaktadır. Aortik halka yöntemi 1990 yılında Nicosia ve Ottinetti tarafından *in vitro* ve *in vivo* çalışmalar arasındaki boşluğu doldurmak amacı ile “*ex vivo* organ kültürü” olarak tasarlanmıştır [105]. Anjiyogenez sırasında birçok hücre, sitokin ve hormon sürecine dahil olmaktadır. Östrojen hormonları ise vasküler endotel büyüme faktörünün (VEGF) düzenlenmesi, endotel hücreleri üzerinde bulunan östrojen reseptörlerinin aktivasyonu, vasküler bazal membranın degradasyonunda görev alan enzimlerin aktivasyonu, reseptörler aracılığı ile endotel hücre çoğalması ve migrasyonunun tetiklenmesinde rol oynayarak anjiyogenez sürecine dahil olmaktadır [106].

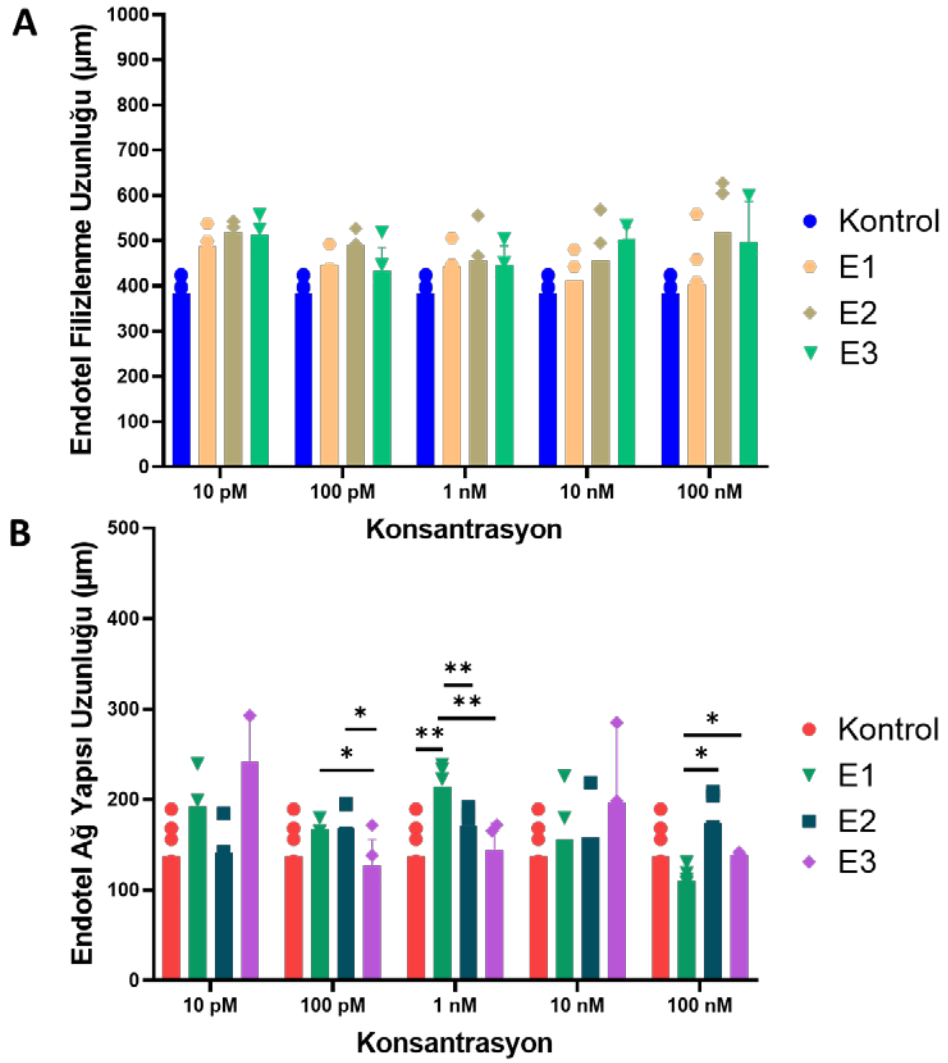
Bu tez çalışmasında aortik halka kaynağı olarak embriyonik dönemde olması dolayısıyla hücre kültürü koşullarında daha etkili yanıt veren tavuk embriyoları kullanılmıştır. Aortik halkalara uygulanan östrojen türevlerinin miktarı, hücre canlılığı sonuçlarına göre toksik etki görülmeyen konsantrasyon aralığına göre belirlenmiştir. Aynı zamanda Matrigel üzerinde kültüre edilen insan umbilikal damar endotel hücrelerinin (HUVEC) tutunma, çoğalma, göç etme gibi özelliklerinin 1-2 ng/mL estradiol hormonu varlığında arttığı ve bu konsantrasyonların etkili dozlar olduğu bildirilmiştir [102]. Çalışmada; E1, E2 ve E3’ün uygulama yapıldıktan sonra zamana bağlı etkilerini gözlemek için 3.ve 5. günlerde alınan aortik halka görüntülerinden endotel hücre filizlenmeleri ve ağ yapısı analiz edilmiştir. Endotel hücrelerin filizlenmeleri ile birlikte oluşturduğu ağ yapısı anjiyogenez açısından önemli veriler sunmaktadır.

Aortik halkaların 3. ve 5. gününe ait mikroskobik görüntüleri Şekil 4.3 ve Şekil 4.5’de verilmiştir. Aortik halkalarda, 3 gün sonra maksimum endotel filizlenme uzunlukları incelendiğinde; E1, E2 ve E3 arasında konsantrasyona bağlı istatistiksel olarak anlamlı bir fark gözlenmemiştir (Şekil 4.4). 5. gün analiz sonuçlarına göre, 1 nM E3 uygulandığında E1 ve E2’ye göre belirgin ölçüde endotel filizlenme uzunluğunu artırmıştır ( $p<0.05$ ). Diğer konsantrasyonlarda ise östrojen türevleri arasında istatistiksel

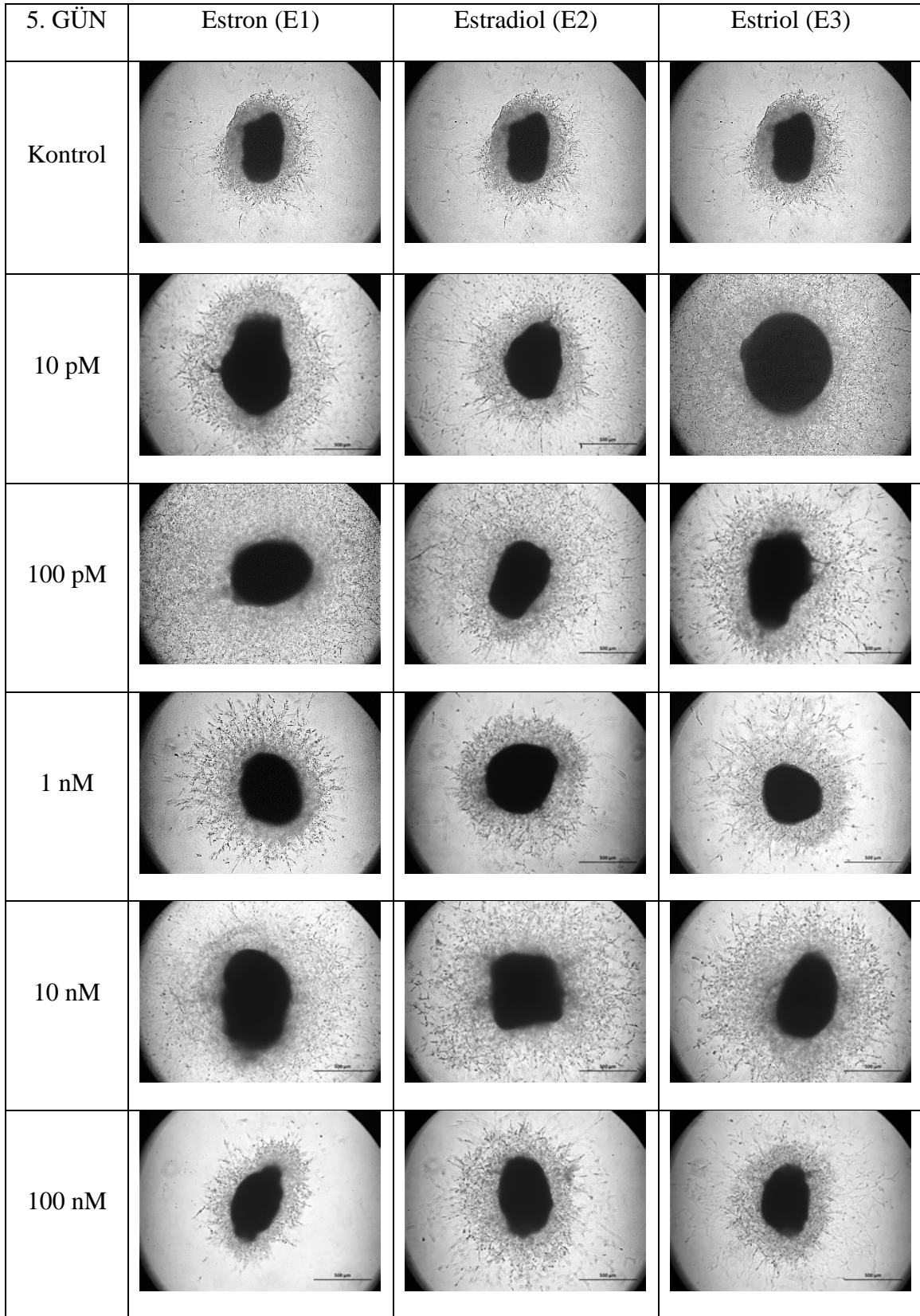
olarak anlamlı bir fark bulunmamaktadır (Şekil 4.6). Endotel hücre filizlenmelerinin oluşturduğu ağ yapılarının ölçümleri analiz edildiğinde ise elde edilen maksimum endotel filizlenme verilerinden farklı sonuçlar elde edilmiştir. 3. gün ölçümlerinin analizine göre E1 ve E2 hormonları 100 pM konsantrasyonunda uygulandığında E3 hormonuna göre ağ yapısı oluşumunu artırmıştır ( $p<0.05$ ). Östrojen türevleri 1 nM uygulandığında E1 hormonunun ağ yapısı oluşumunu artırdığı, 100 nM uygulandığında ise E1 hormonunun diğer östrojen gruplarına göre ağ yapısı oluşumunun daha az gelişmiş olduğu görülmüştür ( $p<0.05$ ). Uygulanan diğer konsantrasyon grupları arasında ise istatistiksel olarak anlamlı bir fark bulunmamıştır (Şekil 4.4). 5. Gün analiz sonuçlarında ise 3. gün sonuçlarına benzer veriler elde edilmiştir. Östrojen türevleri 100 pM uygulandığında E1 ağ oluşumunu belirgin şekilde artırmıştır ( $p<0.05$ ). 1 nM uygulandığında ise E1, E2'ye göre ağ yapısı oluşumunu artırmış ( $p<0.05$ ). 100 nM uygulandığında ise E2, E3'e göre ağ yapısı oluşumunu artırdığı ( $p<0.05$ ) gözlenmiştir. Diğer konsantrasyonlar arasında ise istatistiksel olarak anlamlı bir fark bulunmamıştır (Şekil 4.6). Elde edilen sonuçlara göre E1, E2 ve E3 endotel filizlenmesi ve ağ yapısı oluşumu açısından karşılaştırıldığında anijogenez süreçlerinde farklı etkiler göstermiştir. Aynı zamanda bu sonuçlar; östrojen türevlerinin anjiyogenez etkisinin konsantrasyona bağlı olduğunu ve herbirinin farklı konsantrasyonlarda etkili olduğunu göstermektedir. Östrojen türevlerinin anjiyogenez üzerinde zamana bağlı etkisi değerlendirildiğinde ise 5. günde endotel filizlenmesi ve ağ yapısı oluşumunda zamana bağlı bir artış olduğu gözlenmiştir. Östrojen türevlerinin anjiyogenik etkilerini değerlendiren çalışmalar çoğunlukla estradiol ve endotel hücrelerin *in vitro* kültür şartlarında tutunma, çoğalma ve tüp formu oluşturma yetenekleri üzerinde yoğunlaşmıştır. Li ve ark. dişi ve erkek sıçanların sağ karıncıklarından izole edilen endotel hücrelerinin E2 hormonu yokluğunda çoğalma, migrasyon ve tüp oluşturma yeteneklerinde kayıplar meydana geldiğini raporlamışlardır [107]. Calicati ve ark.; E2 hormonunun anjiyogenez etkisi için hem HUVEC'lerin tüp oluşturma yeteneklerini hem de fare aortik halka deneyinde endotel hücrelerin filizlenmelerini incelemişler ve E2 hormonunun spesifik ligandlar aracılığı ile anjiyogenez yollarını uyarıldığında anjiyogenezin artırılmasında daha etkili olduğunu bildirmişlerdir [108]. Bu tez kapsamında ise elde edilen sonuçlara göre E1, E2 ve E3; endotel filizlenmesi ve ağ yapısı oluşumu açısından karşılaştırıldığında anijogenez üzerine farklı etkiler göstermiş olup bu etkinin doza bağlı olduğu gösterilmiştir.



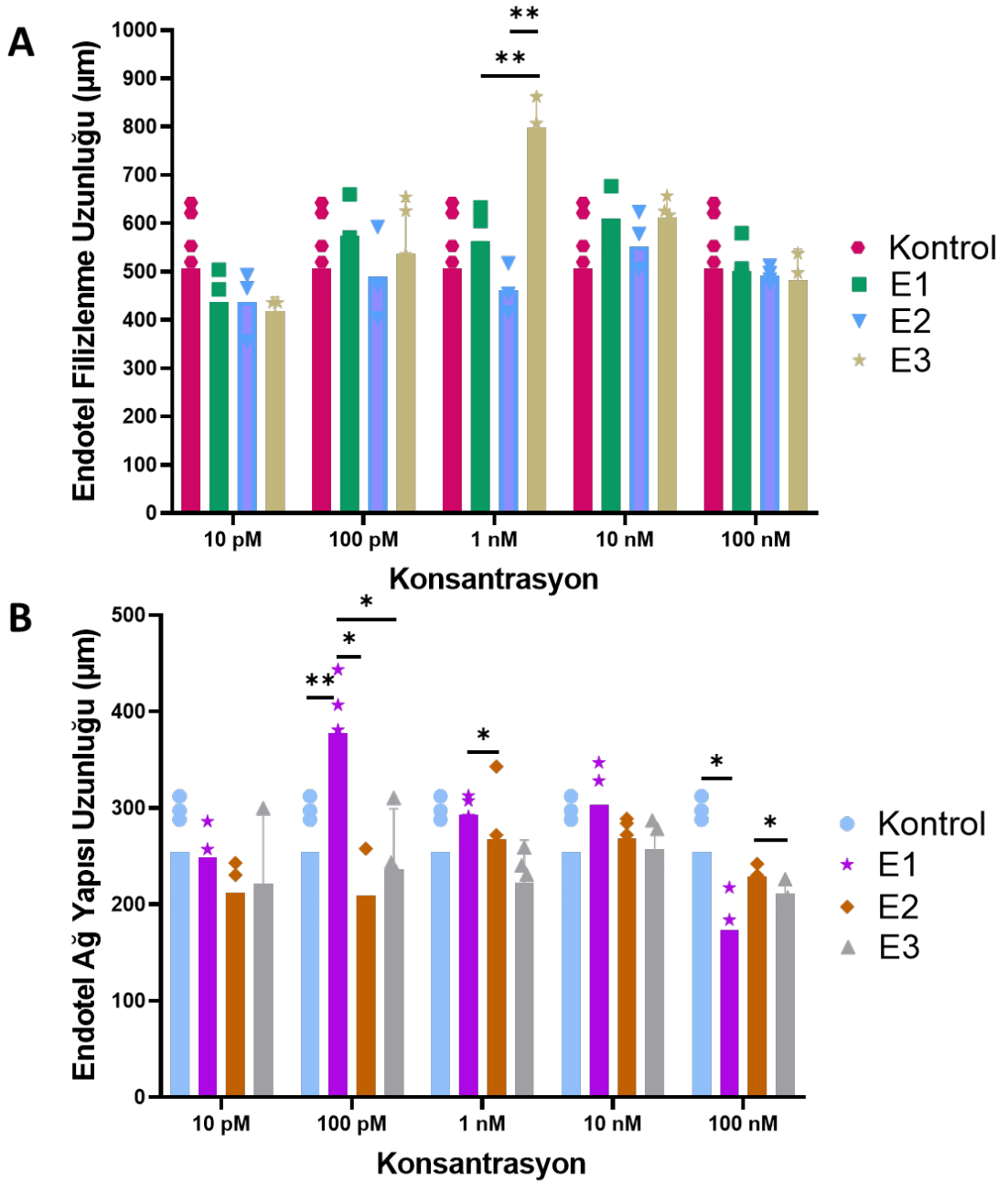
Şekil. 4.3. Östrojen türevleri uygulanmış aortik halkaların 3. gün mikroskopik görüntüleri (10x).



Şekil 4.4. Östrojen türevleri uygulanmış aortik halkaların 3. günde oluşan endotel filizlenme (A) ve ağ yapısı (B) uzunlukları (\*  $p < 0.05$ ).



Şekil 4.5. Östrojen türevleri uygulanmış aortik halkaların 5. gün mikroskopik görüntüleri (10x).

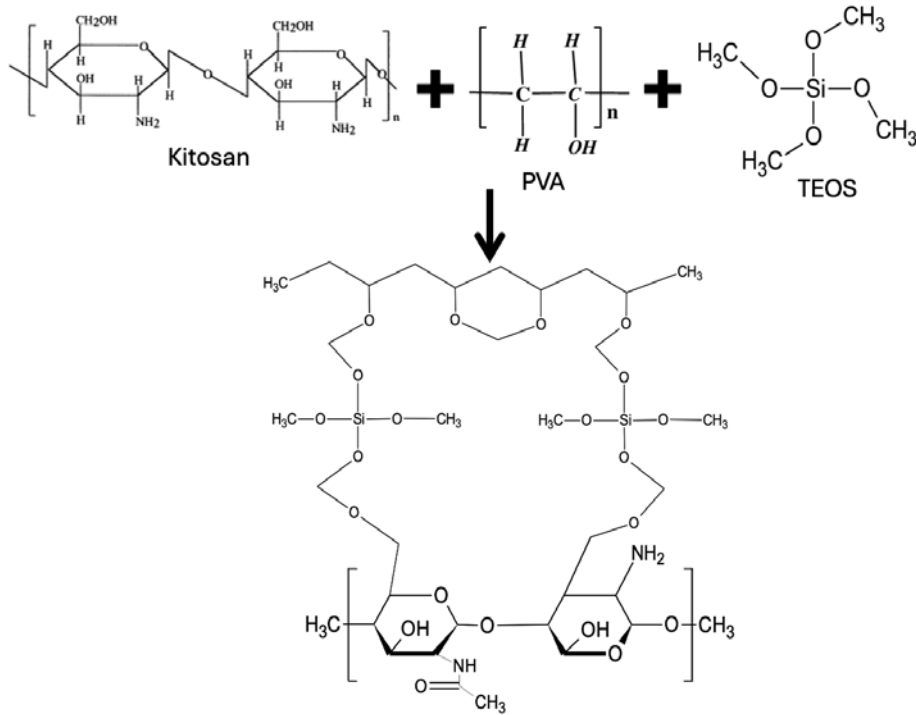


Şekil 4.6. Östrojen türevleri uygulanmış aortik halkaların 5. günde oluşan endotel filizlenme (A) ve ağ yapısı (B) uzunlukları (\*  $p < 0.05$ , \*\*  $p < 0.01$ ).

### 4.3. Mikroïğnelerin Özellikleri

#### 4.3.1. Mikroïğnelerin FTIR Analizleri

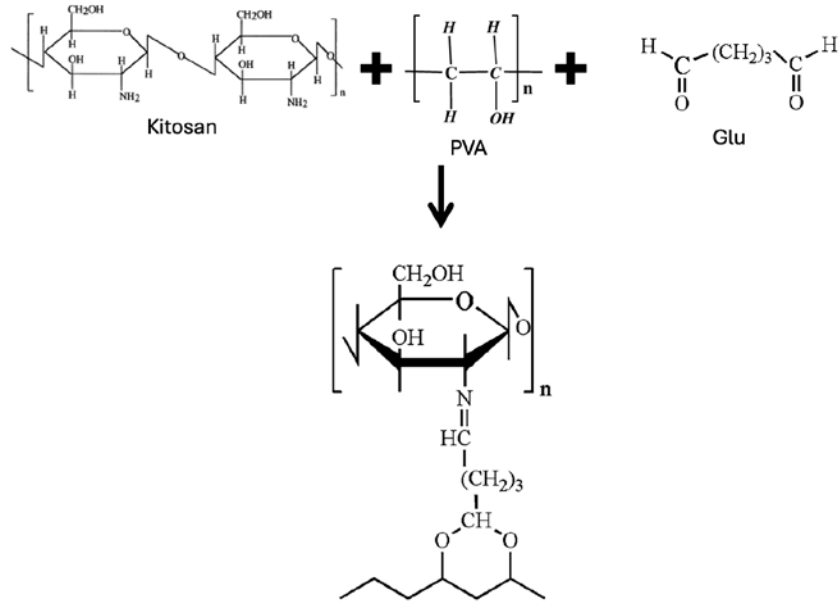
Bu çalışmada kitosan/PVA mikroïğnelerin kararlılıklarının artırılması için TEOS ve Glu çapraz bağlayıcı olarak ayrı ayrı kullanılmıştır. TEOS sol-jel prosesi yoluyla asidik ortamda stabil hidrojeller üretmek için kullanılan bir silikon oksit polimerik öncüsüdür. Bu işlem, esnek ve mekanik dayanıklılığa sahip, toksik olmayan ve çevre dostu hidrojellerin elde edilmesini sağlamaktadır (Şekil 4.7) [109].



Şekil 4.7. Kitosan/PVA'nın TEOS ile çapraz bağlanması.

Glu ise yaygın olarak kullanılan kimyasal çapraz bağlayıcı ajanlarından biridir. Jelatin, kitosan veya polivinil alkol gibi amin ve hidroksil grupları içeren polimerler Glu ile çapraz bağlanarak kararlı hidrojeller elde edilmektedir. Reaksiyon, Glu'nun aldehit grupları ile polimerlerin amin ve hidroksil grupları arasındaki Schiff baz reaksiyonu yoluyla gerçekleşir (Şekil 4.8). Ancak reaksiyona girmeyen Glu sitotoksisiteye neden olabilir, bu sebeple uzaklaştırılmaları gerekir [110].

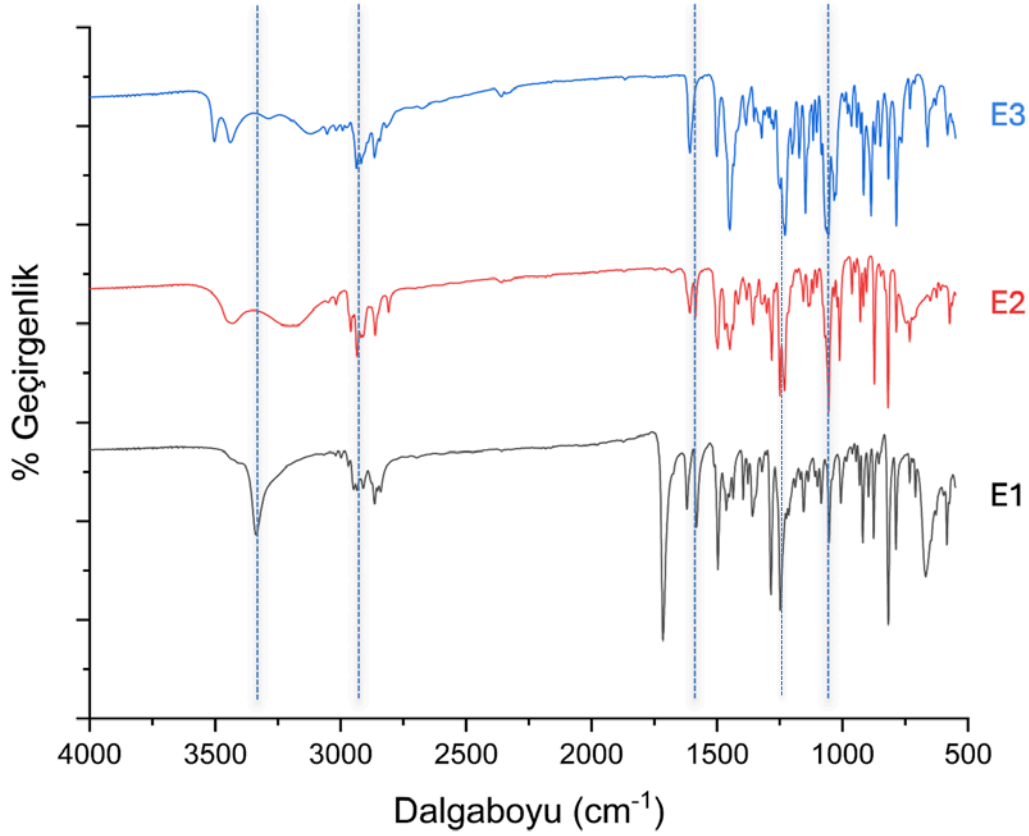




Şekil 4.8. Kitosan/PVA'nın gluteraldehit ile çapraz bağlanması.

Bu tez çalışmasında E1, E2 ve E3 içeren kitosan/PVA mikroïğneler TEOS ve Glu ile çapraz bağlanmış olup yapıları FTIR ile izlenmiştir. Etken maddelerin, polimerlerin ve mikroïğnelerin FTIR spektrumları Şekil 4.9-12'de sunulmuştur.

Şekil 4.9'da, E1, E2 ve E3'ün FTIR spektrumları verilmiştir. 3500-2800  $\text{cm}^{-1}$  arasındaki geniş pik östrojen türevlerindeki O-H gerilme titreşimlerini göstermektedir. 3000-2800  $\text{cm}^{-1}$  arasındaki pikler ise C-H gerilme titreşimlerini işaret etmekte olup bunlar alifatik ve aromatik C-H bağlarının varlığını göstermektedir. E1'deki  $\sim 1740 \text{ cm}^{-1}$  civarındaki pik C=O gerilme titreşimlerini göstermekte olup keton grubuna aittir. Tüm örneklerdeki  $\sim 1600 \text{ cm}^{-1}$  civarındaki şiddetli pik aromatik C=C gerilme titreşimlerine işaret etmekte olup bileşik yapılarındaki aromatik halkanın varlığını işaret etmektedir. Metil grubunun simetrik deformasyonları ise 1400–1300  $\text{cm}^{-1}$  aralığında gözlenmiştir.  $\sim 1200 \text{ cm}^{-1}$  civarındaki absorpsiyon piki ise  $\text{CH}_2$  gruplarının titreşimlerine atanmıştır.



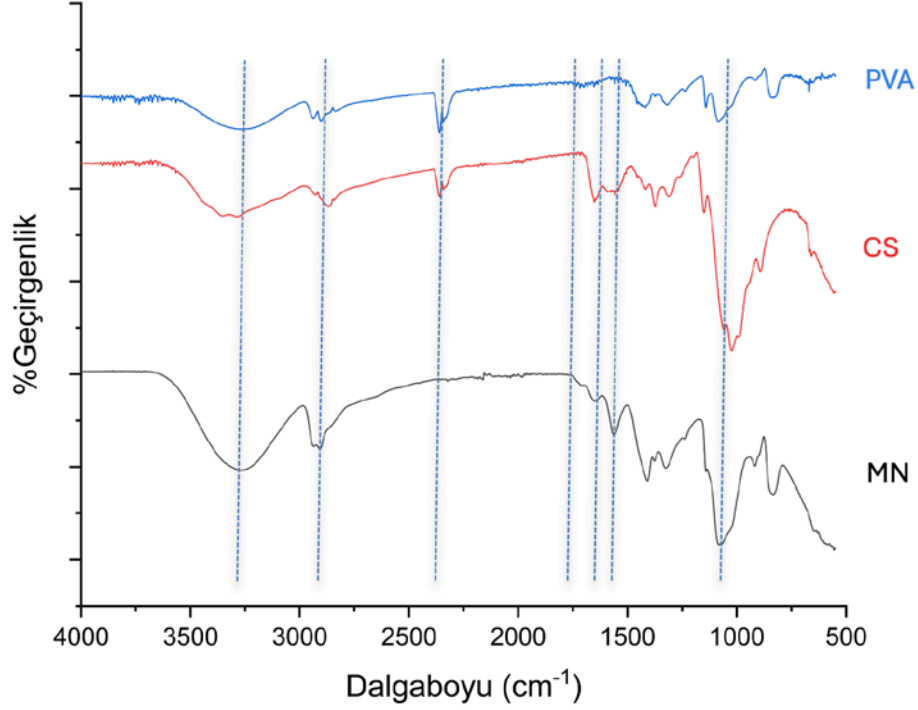
Şekil 4.9. Östrojen türevlerinin FTIR spektrumları.

PVA, CS ve MN'nin FTIR spektrumlarını Şekil 4.10'da verilmiştir. PVA'da; 3000 - 3600  $\text{cm}^{-1}$  civarındaki geniş pik O-H gerilmesini,  $\sim 2900 \text{ cm}^{-1}$  civarındaki pik ise C-H gerilme titreşimlerini göstermektedir. 1400  $\text{cm}^{-1}$  ve 1000-1100  $\text{cm}^{-1}$  aralığındaki karakteristik pikler ise sırasıyla C-H bükülme ve C-O gerilme titreşimlerini temsil etmektedir [111].

CS'nin FTIR spektrumu incelendiğinde;  $\sim 3300 \text{ cm}^{-1}$  civarındaki üst üste binmiş geniş pik O-H ve N-H gerilmelerine aittir. 2900  $\text{cm}^{-1}$  civarındaki pik ise C-H gerilme titreşimlerini göstermektedir. 1650  $\text{cm}^{-1}$  civarındaki pik, amid I (C=O) gerilme titreşimlerinden kaynaklanmaktadır. 1550  $\text{cm}^{-1}$  civarındaki pik, amid II (N-H bükülme ve C-N gerilme) titreşimlerini temsil etmektedir ve 1000-1100  $\text{cm}^{-1}$  aralığındaki pikler, C-O gerilme titreşimlerini göstermektedir [112]. İzlenen tüm bu pikler CS'nin sakkarit yapısını açıklamaktadır.

MN spektrumunda ise PVA ve CS'ye benzer fonksiyonel grupların pikleri gözlenmektedir. Bununla birlikte CS ile ilgili amin bölgesi (1500 - 1650  $\text{cm}^{-1}$ ) pik şiddetlerinde saf kitosana göre bir azalma görülmektedir. Saf PVA'da C=O piki (1730

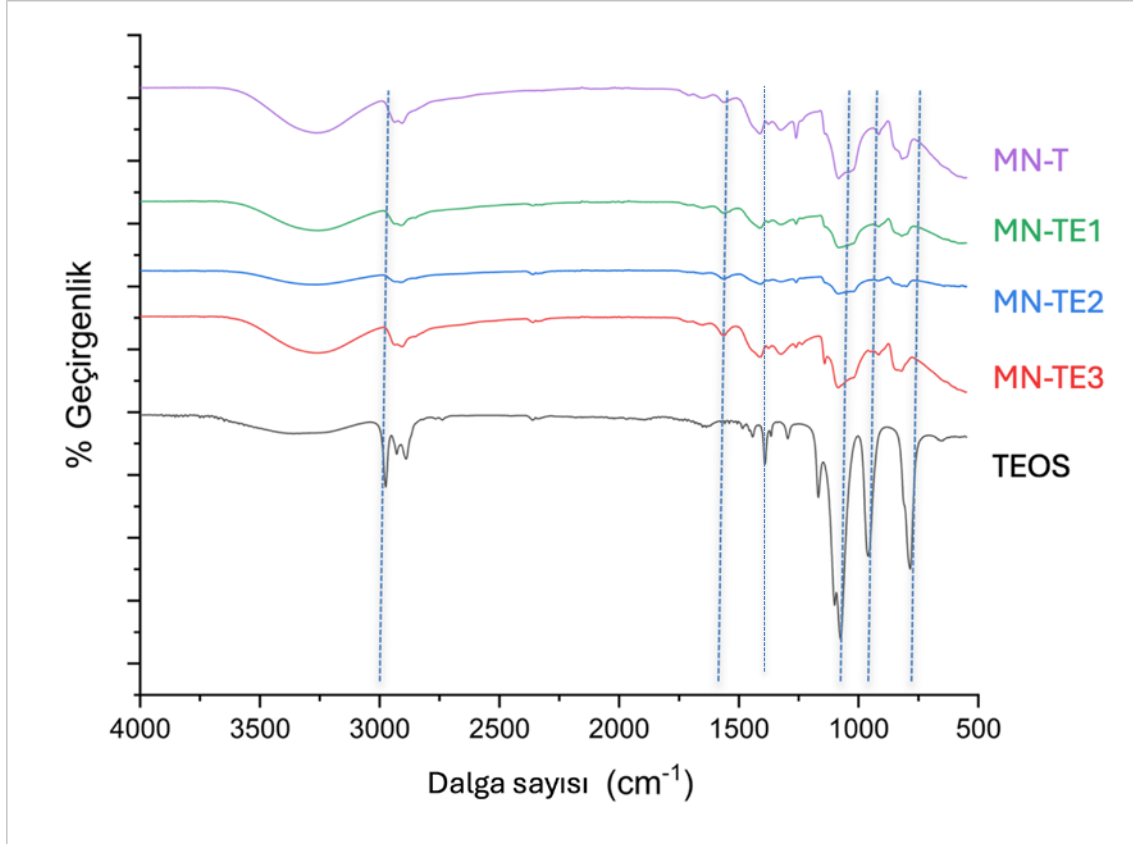
$\text{cm}^{-1}$ ) daha belirgin iken, CS'de ise amid I ( $1650 \text{ cm}^{-1}$ ) ve amid II ( $1550 \text{ cm}^{-1}$ ) pikleri daha belirgindir. MN spektrumu ise her iki malzemenin fonksiyonel gruplarını içermekte olup ancak pik şiddetlerinde ve konumlarında farklılık göstermiştir. Bunun MN'nin kompozisyonundaki oranlardan ve malzemelerin etkileşiminden kaynaklandığı düşünülmektedir [113].



Şekil 4.10. MN, CS ve PVA'nın FTIR spektrumları.

Şekil 4.11'de TEOS ve TEOS çapraz bağlı mikroığnelerin (MN-T, MN-TE1, MN-TE2, MN-TE3) FTIR spektrumları verilmiştir. TEOS spektrumunda; 3500-300  $\text{cm}^{-1}$  bölgesinde -OH gerilmesi (Si-OH),  $\sim 2900 \text{ cm}^{-1}$  bölgesindeki asimetrik CH gerilmesi,  $\sim 1380 \text{ cm}^{-1}$  bölgesinde simetrik C-H bükülmeleri ( $\text{CH}_3$ ) izlenmekte olup  $\sim 1080 \text{ cm}^{-1}$  bölgesindeki pik ise Si-O-Si bağlarına karşılık gelmektedir.  $\sim 960 \text{ cm}^{-1}$  civarındaki pik Si-OH bağı,  $\sim 800 \text{ cm}^{-1}$  civarındaki pik Si-O bağı işaret etmektedir. MN-T spektrumu incelendiğinde; 3000-3600  $\text{cm}^{-1}$  civarındaki geniş pik O-H gerilmesini,  $\sim 2900 \text{ cm}^{-1}$  civarındaki pik ise C-H gerilme titreşimlerini göstermektedir.  $\sim 1650 \text{ cm}^{-1}$  civarındaki pik, amid I bağlarını (C=O gerilmesi),  $\sim 1550 \text{ cm}^{-1}$  civarındaki pik ise amid II bağlarına (N-H bükülme ve C-N gerilme) karşılık gelmektedir.  $\sim 1080 \text{ cm}^{-1}$  bölgesindeki pik ise Si-O-Si bağlarına işaret etmektedir. MN-TE1, MN-TE2 ve MN-TE3 spektrumlarının ise MN-T

spektrumuna benzer olduğu izlenmiştir. MN-T, MN-TE1, MN-TE2 ve MN-TE3 spektrumlarında  $\sim 1080 \text{ cm}^{-1}$  bölgesindeki Si-O-Si piklerinin varlığı, TEOS'un bu kompozit yapıda varlığını ve silika ağının oluştuğunu göstermektedir.

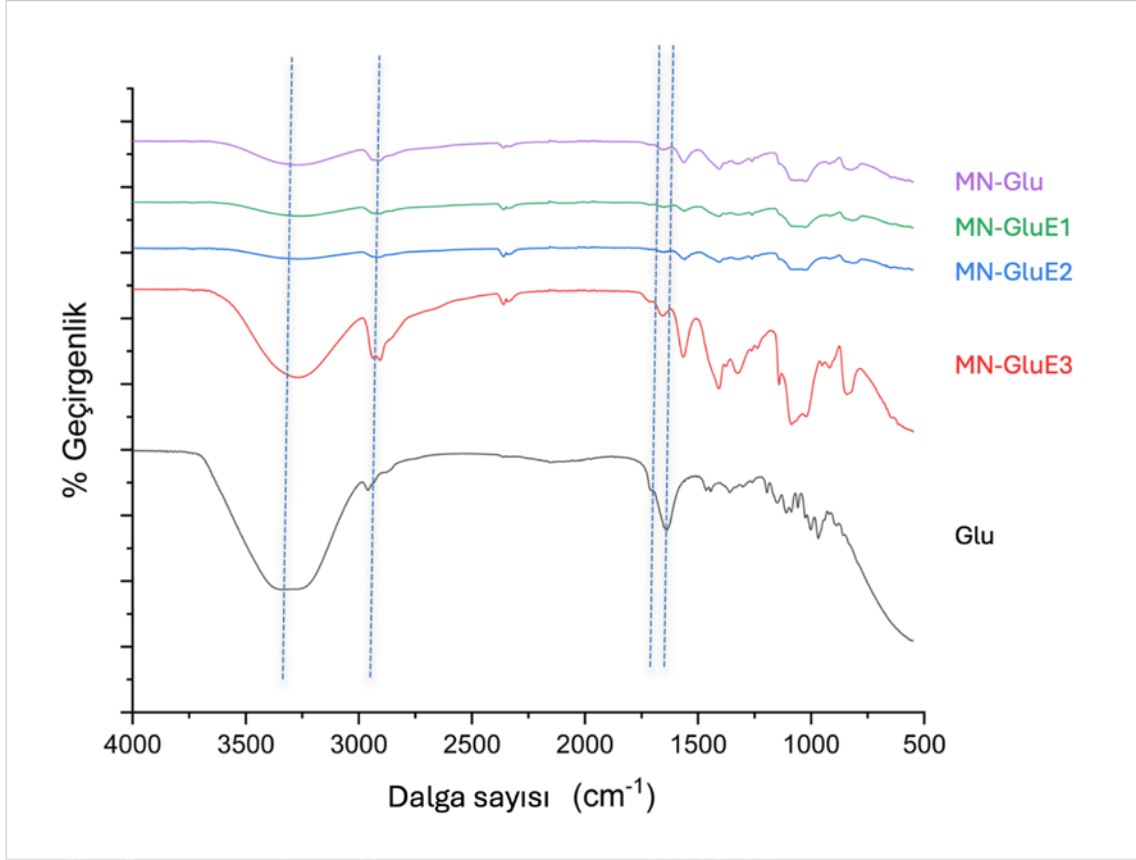


Şekil 4.11. TEOS ve TEOS çapraz bağlı mikroğnelerin FTIR spektrumları.

Glu'nun spekturumu incelendiğinde;  $\sim 3300 \text{ cm}^{-1}$  civarındaki geniş pik O-H gerilmesini,  $\sim 2900 \text{ cm}^{-1}$  civarında pik ise alifatik C-H gerilmesini temsil etmektedir.  $\sim 1650 \text{ cm}^{-1}$  civarındaki pik ise C=O gerilmesini göstermektedir (Şekil 4.12).

CS/PVA karışımlarının Glu ile kimyasal çapraz bağlanması, Schiff baz oluşumuyla açıklanabilir. Bu C=N ve  $\text{NH}_2$  gruplarıyla ilişkilendirilen yaklaşık  $1630$  ve  $1550 \text{ cm}^{-1}$  pikleri ile gözlenebilir. CS/PVA mikroğneler glutaraldehit ile çapraz bağlandıktan sonra imin piklerinde göreceli bir artış ve aynı zamanda amin ( $-\text{NH}_2$ ) piklerinde ise bir düşüş beklenmektedir. Ancak MN-GluE1, MN-GluE2 ve MN-GluE3 spektrumları incelendiğinde yaklaşık  $1600$ - $1500 \text{ cm}^{-1}$  bölgesinde farklı pik yoğunlukları izlenmiş olup bunun CS/PVA mikroğnelerin farklı östrojen türevlerini içermesinden kaynaklandığı düşünülmüştür. Bu nedenle mevcut spektrumlarda imin piklerinin şiddeti izlenememiş

olup daha detaylı FTIR spektrumlarının alınması planlanmıştır. Bununla birlikte ileriki bölümlerde yer alan mekanik ve degradasyon analizleri mikroıǧnelerin Glu ile çapraz bağlandığını doğrulamıştır.



Şekil 4.12. Glu ve Glu apraz bağlı mikroıǧnelerin FTIR spektrumları.

#### 4.3.2. Mikroıǧnelerin Mikroskop Görüntüleri

Üretilen mikroıǧnelerin morfolojileri SEM ile incelenerek Şekil 4.13-17’de sunulmuştur. Silikon kalıplardan çıkarılan mikroıǧnelerin platform üzerinde düzgün bir şekilde dizildiği gerek dijital mikroskop gerekse SEM görüntüleriyle teyit edilmiştir. Mikroıǧnelerin SEM ile farklı aılardan görüntüleri alınarak morfolojileri değerlendirilmiş (Şekil 4.18) ve aynı zamanda iğne boyutları ölçülmüştür.

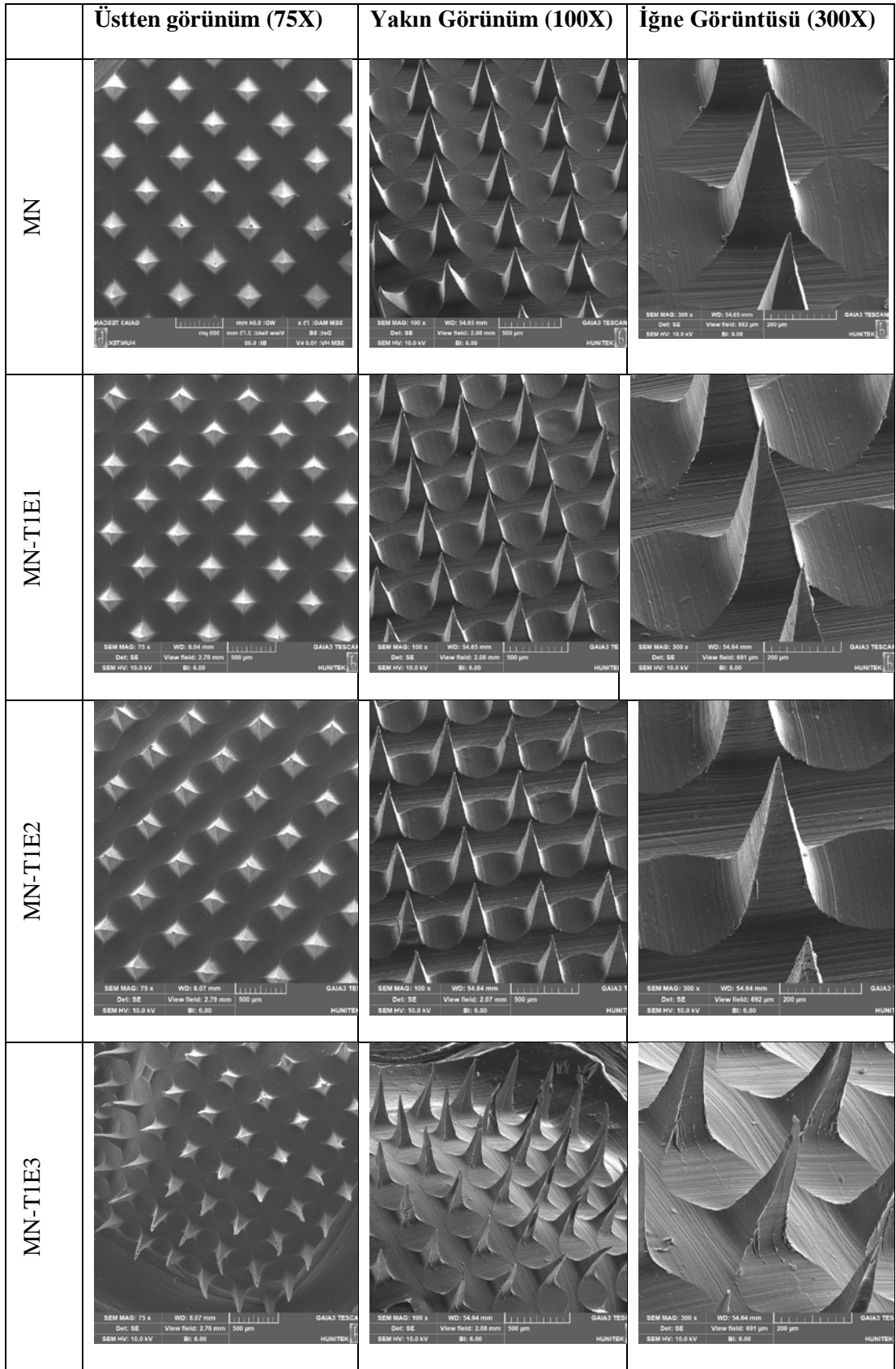
Sadece CS/PVA’dan hazırlanan mikroıǧnelerin (MN) oldukça pürüzsüz ve düzenli bir şekilde sıralandığı gözlenmiştir. Benzer şekilde E1 ve E2 yüklü mikroıǧnelerin de pürüzsüz olduğu, etken maddelerin iğne şekillerinde ve morfolojilerinde bir değişiklik yaratmadığı tespit edilmiştir. Ancak E3 içeren iğnelerin morfolojisinin bozulduğu,

düzgün iğne sayısının azaldığı ve iğne platformunun büzüldüğü görülmüştür (Şekil 4.13). Bunun; E3'ün diğerlerine göre daha fazla -OH fonksiyonel gruba sahip olması ve yapısında bulunan 3 adet -OH grubunun, TEOS ile ve kitosanda bulunan -NH<sub>2</sub> grupları ile etkileşime girmesinden kaynaklandığı değerlendirilmiştir.

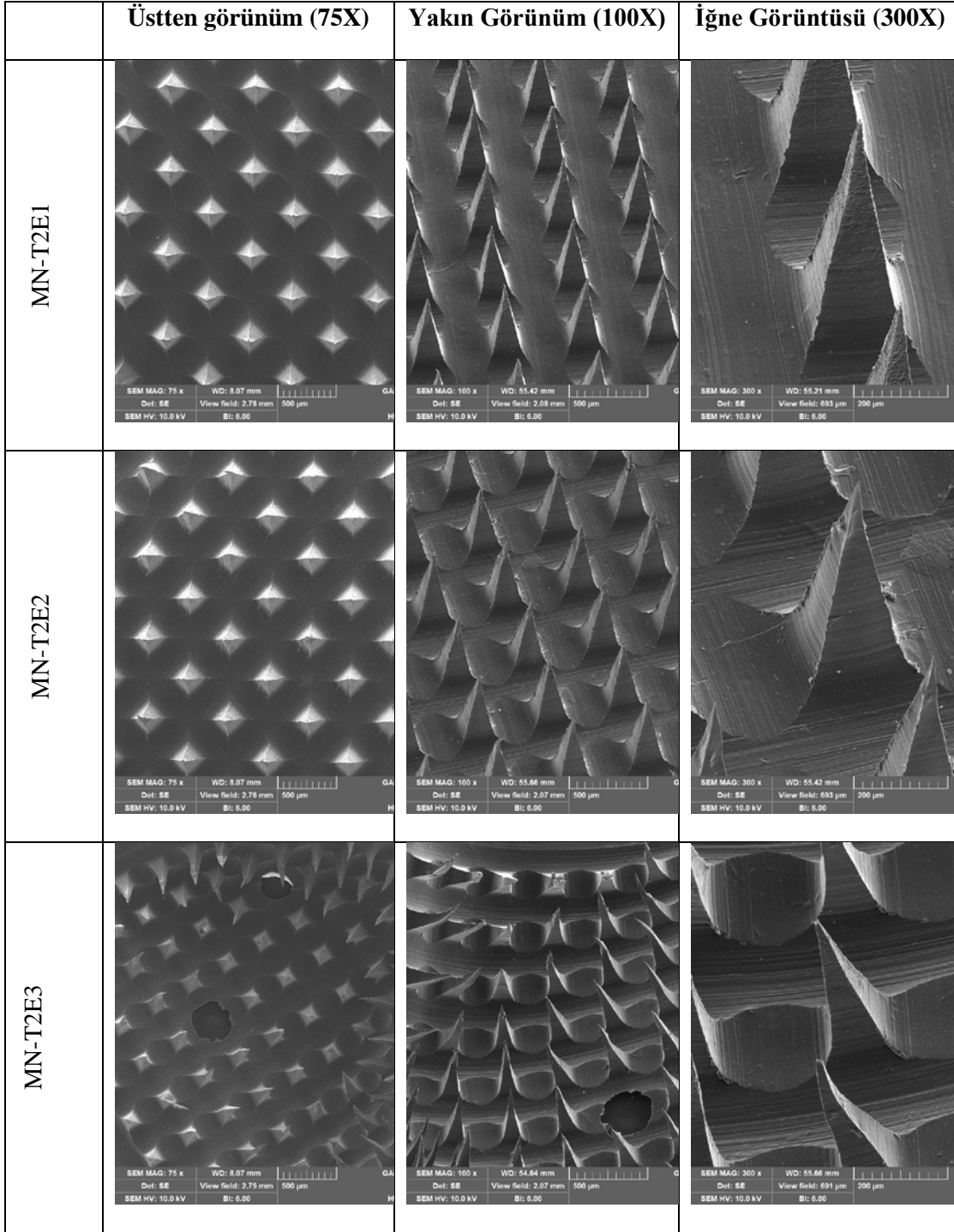
Diğer taraftan TEOS ve Glu ile çapraz bağlanmış E1 ve E2 yüklü MN'lerin morfolojik görünümünün benzer olduğu ve oluşan iğnelerin pürüzsüz ve sıralı olduğu gözlenmiştir. TEOS'un %1'den 2'ye çıkarılması mikro iğne morfolojisinde bir değişiklik yaratmamıştır (Şekil 4.13 ve Şekil 4.14). Benzer şekilde Glu buharına maruz bırakılarak çapraz bağlanan mikro iğneler incelendiğinde; uygulama sürenin iğne morfolojisi üzerine bir etkisinin olmadığı görülmüştür (Şekil 4.15-17). Tüm bu sonuçlar penetre olabilen ve düzgün yapıda MN'lerin elde edilmesinde etken maddenin kimyasal yapısının kritik olduğunu göstermiştir.

Üretim sonrası iğne yüksekliklerinin ölçülmesi, mikro iğnelerin performansının doğru bir şekilde değerlendirilmesi açısından oldukça önemlidir. Elde edilen sonuçlara göre, üretilen mikro iğnelerin ortalama yüksekliği 600 µm olarak ölçülmüştür (Şekil 4.18). Üretim için kullanılan silikon kalıplardaki iğne boyutu ise 800 µm'dir. Bu fark, üretim sürecinde kullanılan hidrojellerden suyun buharlaşması nedeniyle oluşan boyut küçülmesinden kaynaklanmaktadır. Hidrojellerin kendine özgü yapıları gereği, üretim sonrası bir miktar boyut değişimi beklenebilir. Ancak, elde edilen 600 µm ortalama iğne yüksekliği, trans dermal ilaç dağıtımı açısından yeterli bir boyutu temsil etmektedir.

Gelecekteki çalışmalarda, hidrojellerden kaynaklanan boyut değişimlerinin minimize edilmesi veya üretim parametrelerinin optimize edilmesi, daha hassas iğne boyutlarının elde edilmesine yardımcı olabilir. Ayrıca, iğne boyutlarının yanı sıra iğne sayısı, dizilimi ve yoğunluğu gibi faktörlerin de değerlendirilmesi, mikro iğnelerin performansını daha kapsamlı bir şekilde ortaya koyacaktır.

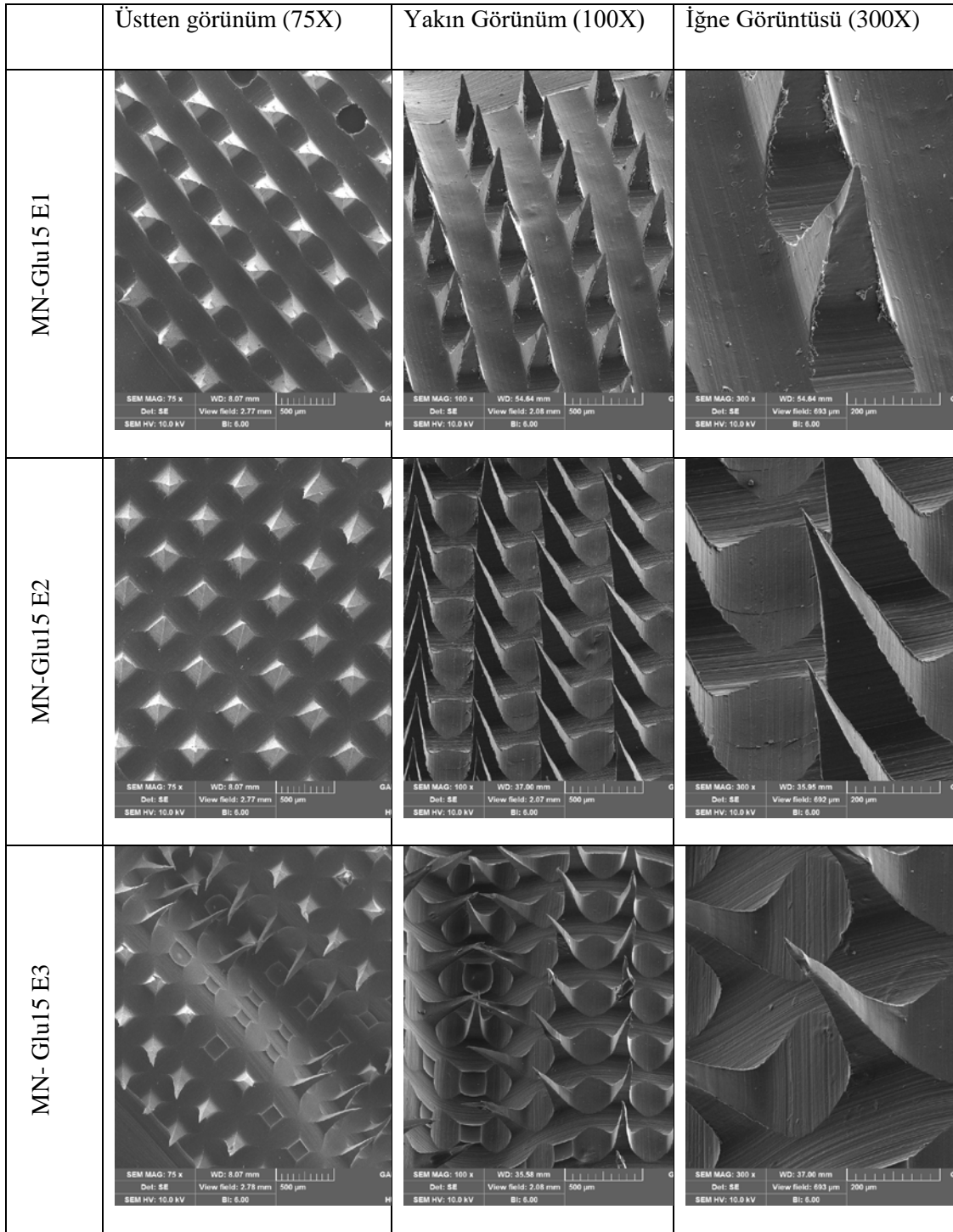


Şekil 4.13. Mikroïğne (MN) ve TEOS (%1) ile çapraz bağlı farklı östrojen türevleri içeren mikroïğnelerin SEM görüntüleri.

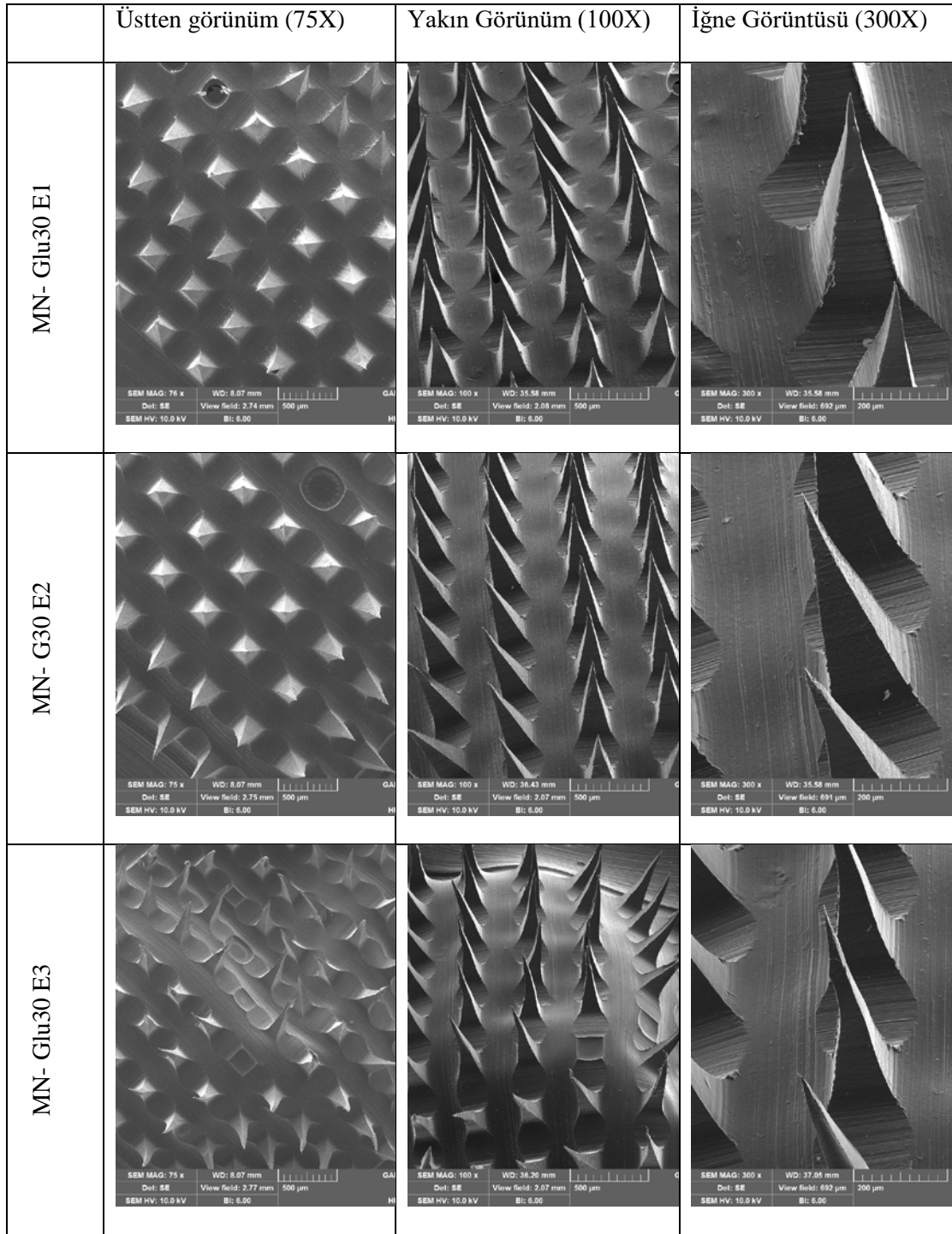


Şekil 4.14. TEOS (%2) ile çapraz bağlı östrojen türevleri içeren mikroİğnelerin SEM görüntüleri.

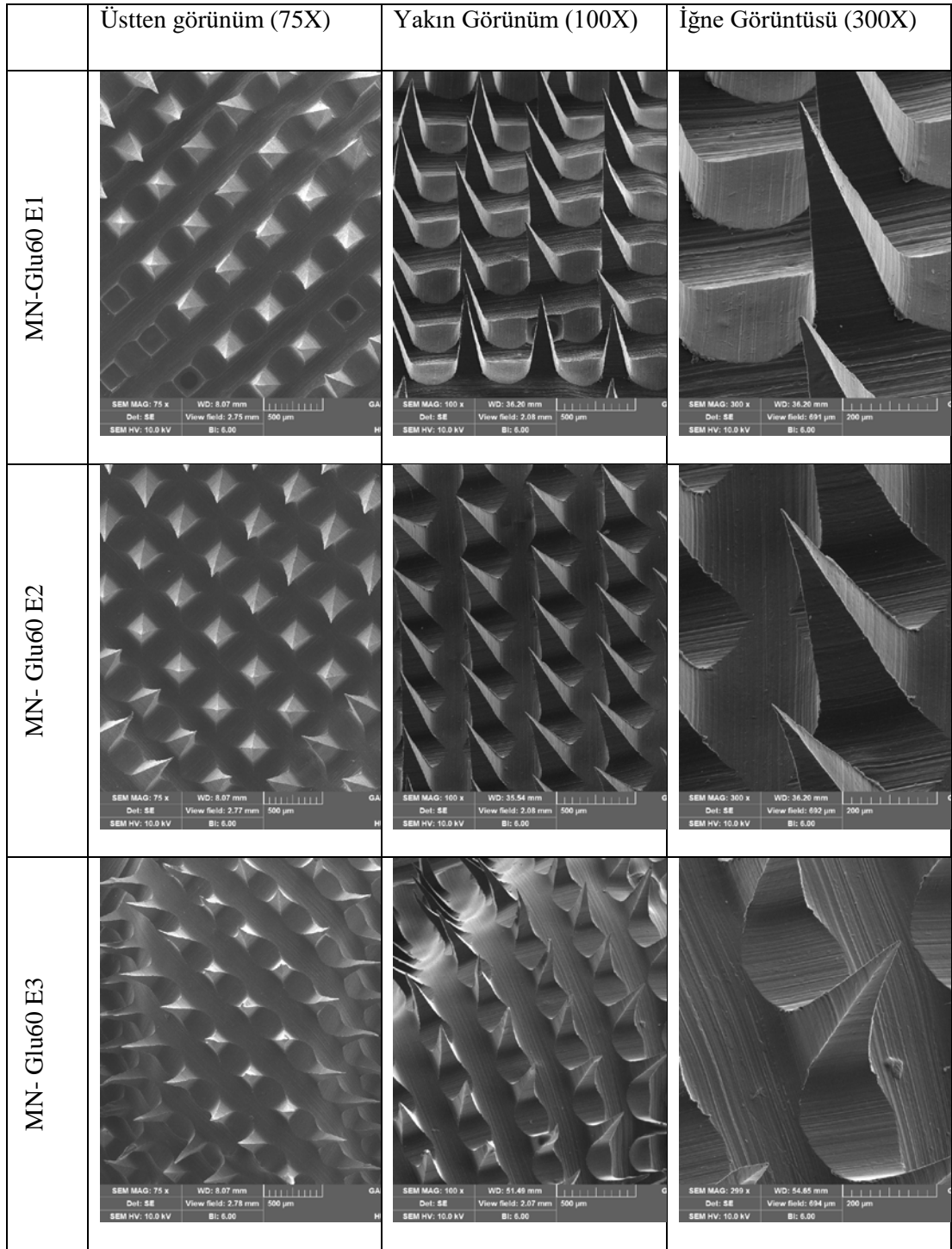




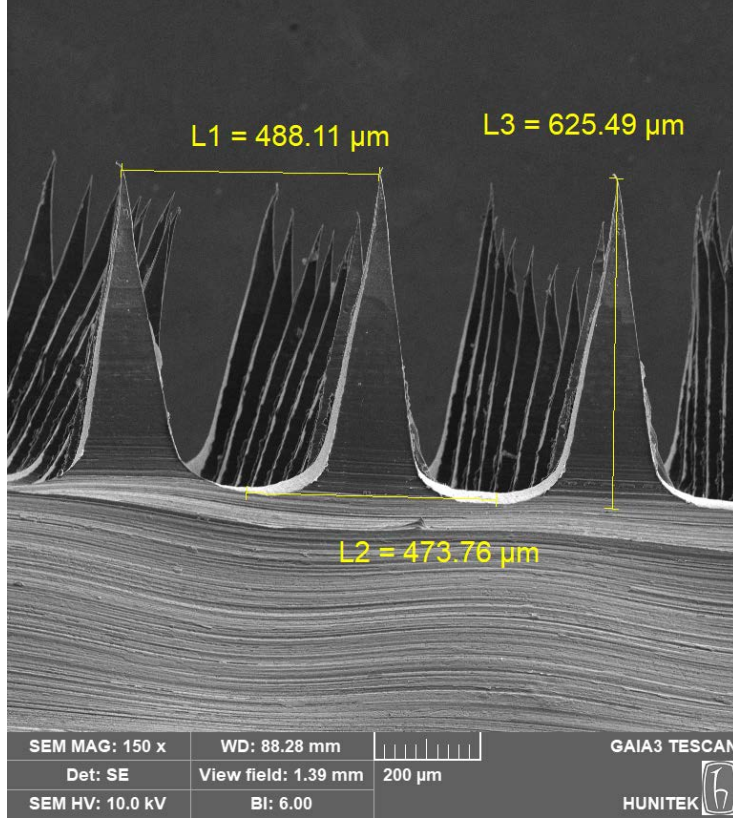
Şekil 4.15. Gluteraldehit buharına (15 dakika) maruz kalmış östrojen türevleri içeren mikroığnelerin SEM görüntüleri.



Şekil 4.16. Gluteraldehit buharına (30 dakika) maruz kalmış östrojen türevleri içeren mikroığnelerin SEM görüntüleri.



Şekil 4.17. Gluteraldehit buharına (60 dakika) maruz kalmış östrojen türevleri içeren mikroığnelerin SEM görüntüleri.

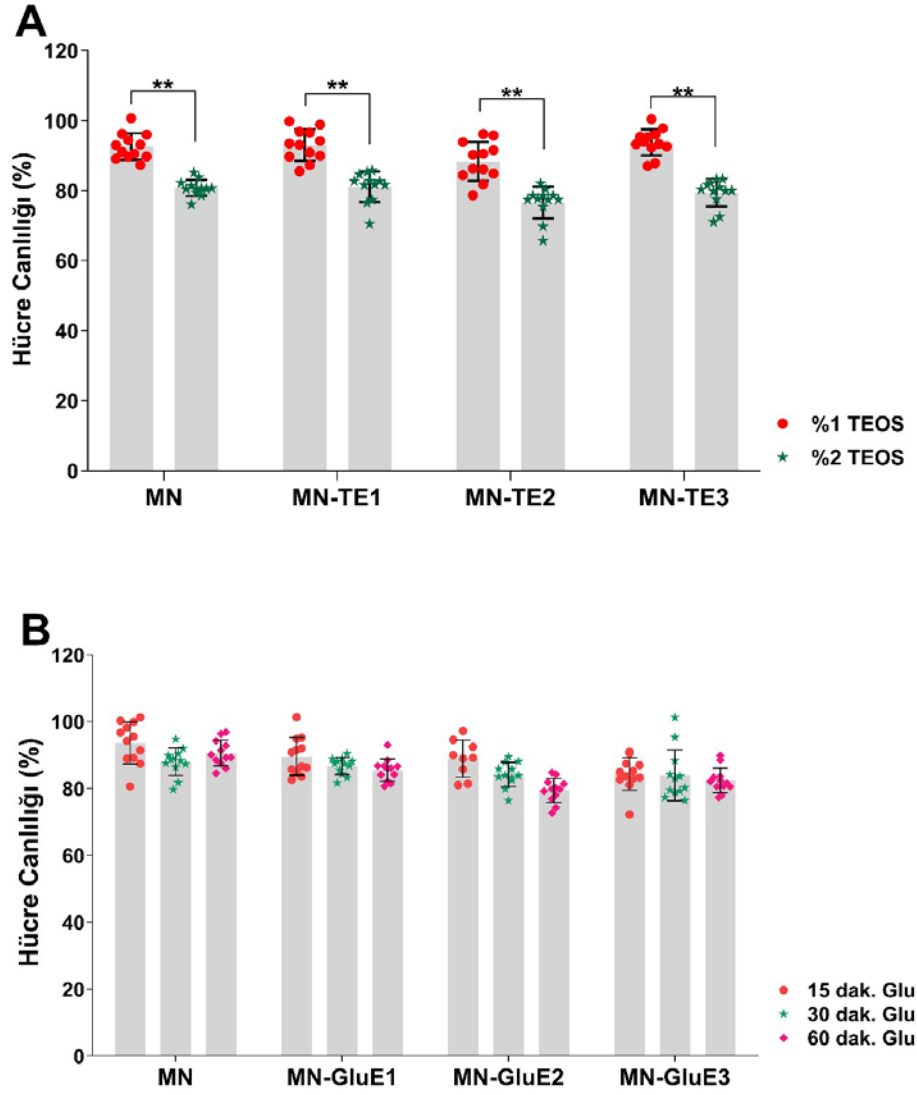


Şekil 4.18. Üretilen mikroıǒnelerin boyutları. L1: merkez-merkez uzaklığı, L2: mikroıǒne tabanı, L3: MN uzunluğu (Ölçek uzunluğu: 200 µm).

### 4.3.3. Östrojen Türevlerini İçeren Mikroıǒnelerin Toksisiteleri

Farklı apraz bağlayıcılar kullanılarak hazırlanan E1, E2 ve E3 içeren MN'lerin toksisiteleri indirekt toksisite yöntemi kullanılarak tespit edilmiştir. Elde edilen sonuçlar Şekil 4.19'da verilmiştir. MTT sonuçları, TEOS (%1 ve %2) ve gluteraldehit buharı (15, 30 ve 60 dak.) kullanılarak çapraz bağlanan mikroıǒnelerin hücre toksisiteye sahip olmadıkları ve test edilen tüm gruplarda hücre canlılığının %70'in üzerinde olduğunu göstermiştir. %2 TEOS kullanılarak hazırlanan E1, E2 ve E3 içeren mikroıǒnelerde hücre canlılığı sırasıyla %81, %77 ve %79 olarak hesaplanmış olup, %1 TEOS kullanılarak hazırlanan mikroıǒneler ile kıyaslandığında hücre canlılığında anlamlı düşüş olduğu tespit edilmiştir ( $p < 0.05$ ). Bununla birlikte kullanılan TEOS miktarından bağımsız olarak E1, E2 ve E3 içeren mikroıǒnelerde hücre canlılığı MN grubu ile benzer bulunmuştur (Şekil 4.19A). Bu durum mikroıǒnelere yüklenen E1, E2 ve E3 miktarının hücre canlılığı üzerinde negatif bir etkisinin olmadığını açık bir biçimde göstermiştir. Bununla birlikte mikroıǒnelerin geliştirilmesinde kullanılan CS ve PVA polimerlerinin de biyoyumlu

oldukları bilinmektedir [114, 115]. Dolayısıyla %2 TEOS uygulanan grupta hücre canlılığında meydana gelen düşüşün TEOS kaynaklı olduğu değerlendirilmiştir [116]. Ancak bu düşüş toksik olmayan bir aralıktadır. Öte yandan, gluteraldehit buharı kullanılarak çapraz bağlanan mikroıǧnelerin MTT sonuçları, test edilen tüm gruplarda benzer hücre canlılığı elde edildiğini, gluteraldehit buharı kaynaklı hücre toksisitenin oluşmadığını göstermiştir [117] (Şekil 4.19B). Bununla birlikte 60 dak. gluteraldehit buharına maruz bırakılan mikroıǧnelerde hücre canlılığı, 15 ve 30 dak. Glu gruplarda elde edilen canlılık ile kıyaslandığında daha düşük olduğu ancak bu farkın anlamlı olmadığı tespit edilmiştir ( $p>0.05$ ). Benzer şekilde gluteraldehit buharının 60 dak. uygulandığı durumda, E1, E2 ve E3 içeren mikroıǧnelerin hücre canlılığı MN grubu ile kıyaslandığında anlamlı olarak düştüğü ( $p<0.05$ ), ancak 15 ve 30 dak. Glu gruplarında ise MN grubu ile benzer olduğu bulunmuştur ( $p>0.05$ ). Bu durumun ortaya çıkmasındaki muhtemel sebebin uzun süreli gluteraldehit buharının kullanılması nedeniyle çapraz bağ oluşumuna katılmayan gluteraldehit moleküllerin hücre canlılığını düşürmesi olarak düşünülmüştür. Sonuç olarak TEOS ve gluteraldehitin toksik etki oluşturmadıkları ve devam eden çalışmalarda çapraz bağlayıcı ajan olarak kullanılabileceği tespit edilmiştir.



Şekil 4.19. Farklı çapraz bağlayıcı ajanlar kullanılarak hazırlanan östrojen veya östrojen türevleri yüklü mikroığnelerin toksisiteleleri. A) %1 ve %2 TEOS kullanılarak hazırlanan E1, E2 veya E3 içeren mikroığnelerin % hücre canlılığı. B) 15, 30 veya 60 dak. glutaraldehit buharına maruz bırakılan mikroığnelerin % hücre canlılığı. Semboller ölçüm verilerini temsil etmektedir (\*\*  $p < 0.01$ ).

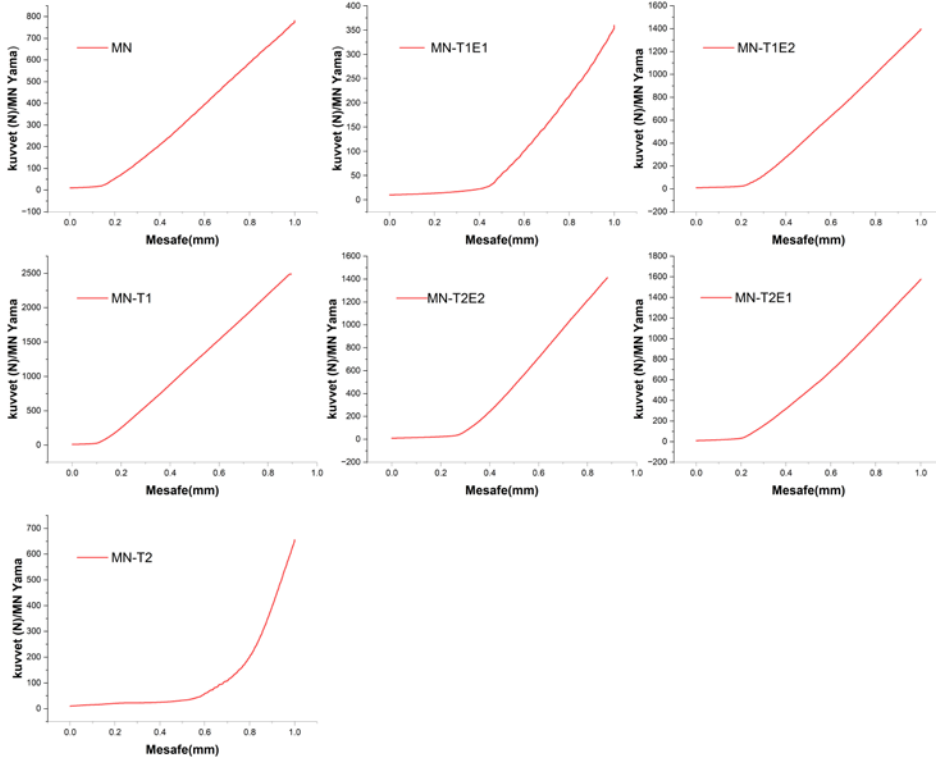
#### 4.3.4. Mikroığnelerin Mekanik ve Penetrasyon Özellikleri

TEOS ve Glu kullanılarak çapraz bağlanan E1 veya E2 içeren MN'lerin mekanik karakterizasyonları tekstür analizi ile yapılmış ve elde edilen sonuçlar Şekil 4.20-22'de verilmiştir. Elde edilen sonuçlar TEOS konsantrasyonu ve glutaraldehit buharına maruz kalma süresinin, MN'lerin mekanik özelliklerini önemli ölçüde etkilediğini göstermiştir.

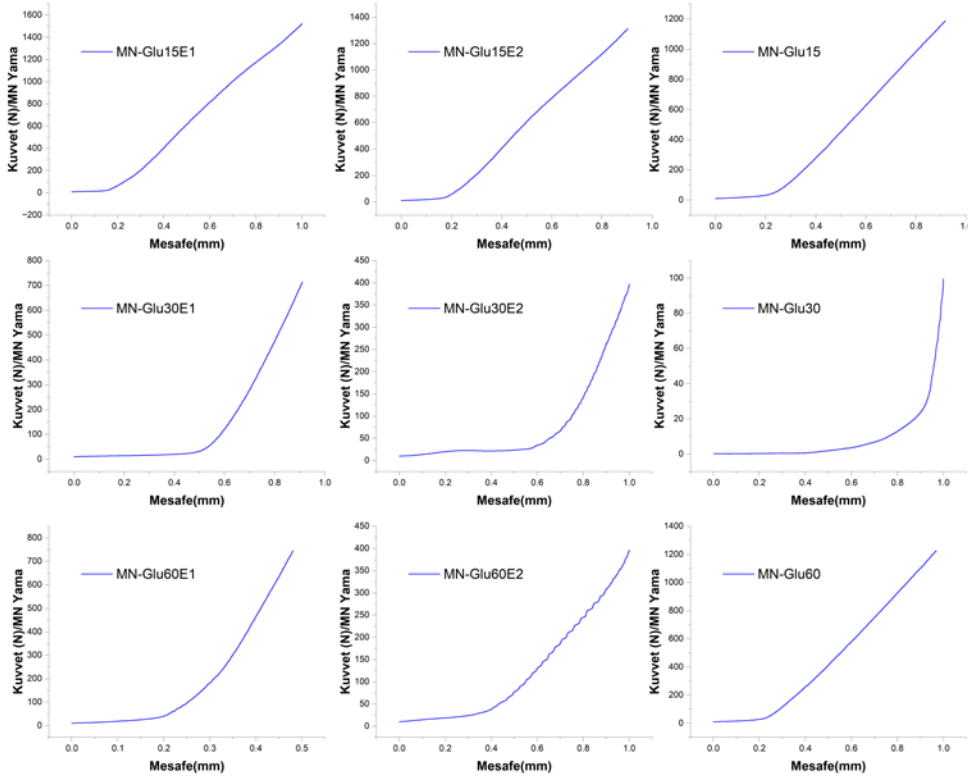
%1 TEOS içeren MN-T grubu, TEOS içermeyen MN grubuna kıyasla daha esnek ve daha yüksek bir kuvvette kırılma göstermiştir. Ayrıca, MN-T1 grubu ile östrojen türevi içeren gruplar karşılaştırıldığında, maksimum kırılma kuvvetleri arasındaki fark anlamlı olmasa da ( $p>0.05$ ) östrojen içeren grupların daha sert bir yapıya sahip olduğu ve daha kırılğan olduğu görülmüştür. %2 TEOS konsantrasyonunda ise MN-T grubu MN grubuna göre daha esnek davranmıştır. Ancak MN-T ve östrojen içeren gruplar arasında anlamlı bir fark tespit edilmemiştir ( $p>0.05$ ) (Şekil 4.21 ve 4.22A). TEOS konsantrasyonun %1'den %2'ye çıkarıldığında MN'lerin maksimum kırılma kuvvetlerinin azaldığı, dolayısıyla mikroiğnelerin daha kırılğan yapı kazandığı tespit edilmiştir. MN'lere E1 veya E2'nin yüklenmesinin anlamlı bir değişim meydana getirmediği görülmüştür (Şekil 4.22A).

Diğer taraftan, Glu buharına maruz bırakılan ve E1 veya E2 içeren MN'lerin, uygulama süresinin artmasıyla daha kırılğan bir yapıya sahip olduğu görülmüştür (Şekil 4.21-4.22B). MN-Glu gruplarının, MN grubuna kıyasla daha esnek bir yapı göstermiştir ( $p<0.05$ ). 15 dak. Glu grubunda, MN-Glu ile östrojenli gruplar (MN-GluE1 ve MN-GluE2) karşılaştırıldığında, E1 daha esnek, E2 ise daha kırılğan hale gelmiştir. Bu durum etken madde çeşidinin MN'lerin mekanik özelliklerini anlamlı olarak etkilediğini göstermiştir. 30 dak. ve 60 dak. glutraldehit buharına maruz kalan MN'lerin (MN-Glu) benzer mekanik özelliklere sahip olduğu tespit edilmiştir. Bu durumun ortaya çıkmasındaki muhtemel sebebin 30 dak. glutraldehit uygulaması ile yüzeydeki fonksiyonel grupların tamamının çapraz bağlanmaya girdiği, dolayısıyla glutraldehit uygulama süresinin 30 dakikadan 60 dakikaya çıkarılmasının anlamlı bir değişiklik meydana getirmediği düşünülmüştür. Ayrıca 30 dak. ve 60 Glu maruz bırakılan MN'ler östrojenli gruplar ile kıyaslandığında ise östrojen türevi yüklü MN'lerin daha kırılğan davrandığı tespit edilmiştir. Bu sonuç uzun süreli glutraldehit uygulandığı durumda etken madde çeşidinin MN'lerin mekanik özelliklerini değiştirmediğini kanıtlar niteliktedir (Şekil 4.22B)

Sonuç olarak, bu çalışmada TEOS konsantrasyonu ve glutraldehit çapraz bağlama süresinin MN'lerin mekanik özelliklerini etkilediği gösterilmiştir. Ayrıca etken madde ve çapraz bağlayıcı ajanın mekanik özellikler üzerindeki sinerjik etkisinin olduğu ve bu etkinin östrojen türevi çeşidine ve glutraldehit buharının uygulama süresine bağlı olduğu anlaşılmıştır.

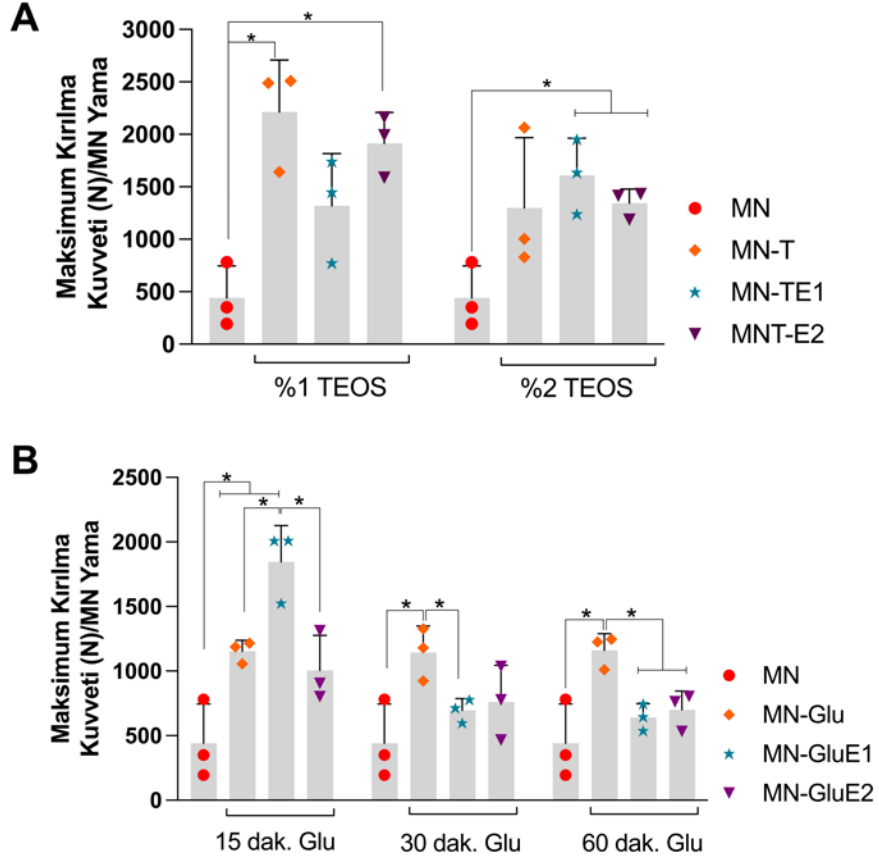


Şekil 4.20. TEOS ile çapraz bağlı östrojen türevleri içeren mikroğne yamaların kuvvet-mesafe grafikleri.



Şekil 4.21. Gluteraldehit buharına maruz bırakılmış östrojen türevleri içeren mikroğnelerin kuvvet-mesafe grafikleri.

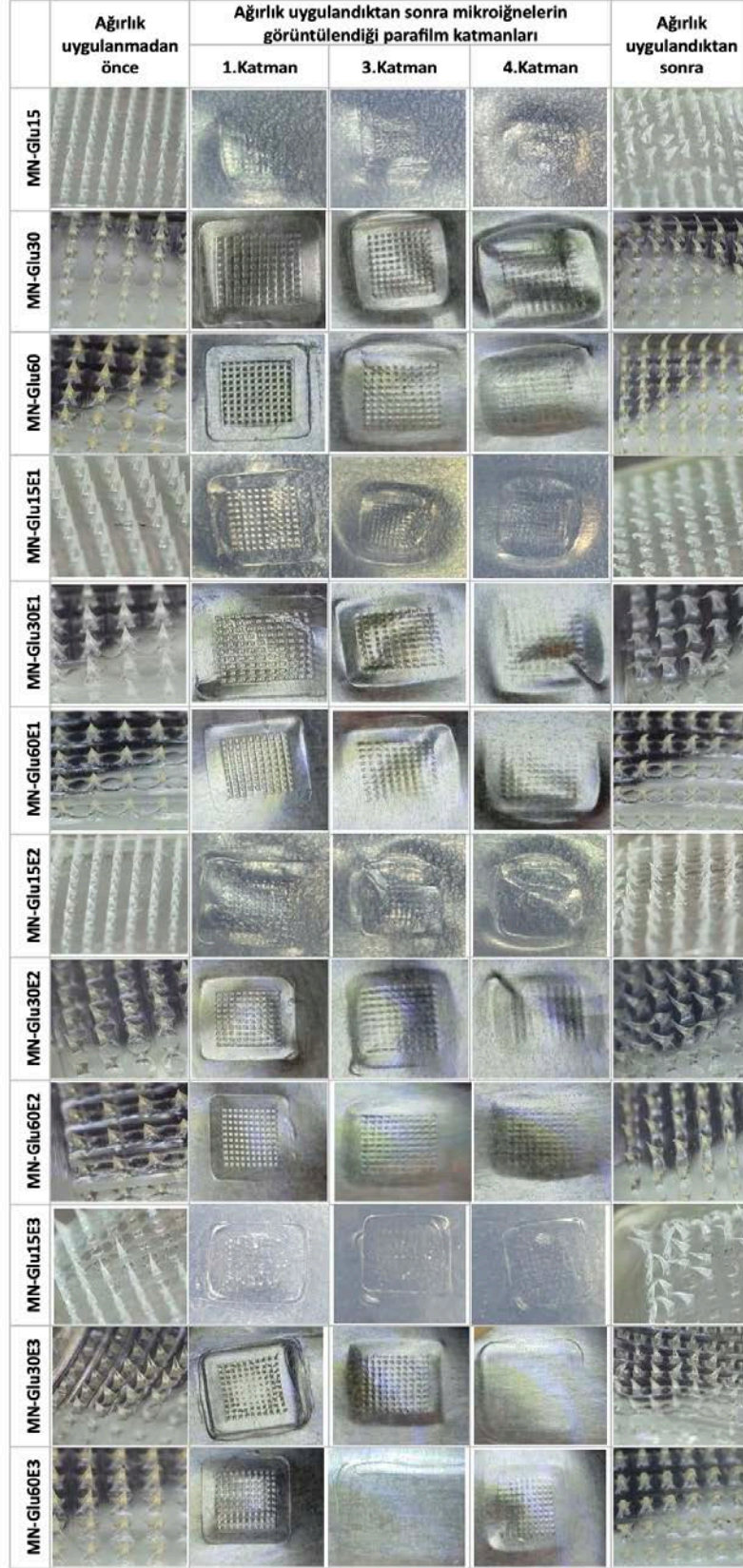




Şekil 4.22. Mikroïğne yamaların maksimum kırılma grafikleri: A) TEOS ile çapraz bağlı östrojen türevleri içeren mikroïğne yamalar, B) Gluteraldehit buharına maruz bırakılmış östrojen türevleri içeren mikroïğne yamalar.

Mikroïğnelerin penetrasyon derinliğinin ve mekanik özelliklerinin değerlendirilmesi, performanslarının anlaşılması açısından kritik önem taşımaktadır. Bu çalışmada, literatürde bildirildiği şekilde mikroïğne dizilerinin penetrasyon kabiliyetini değerlendirmek için Parafilm M<sup>®</sup> bir zar modeli olarak kullanılmıştır [118]. Parafilm M<sup>®</sup>'nin çok katmanlı yapısı, mikroïğnelerin penetrasyon derinliğinin görselleştirilmesine olanak sağlamıştır. Penetrasyon testleri sırasında, tüm grupların 1., 3. ve 4. katman parafilmli görünülmüştür. Ayrıca, mikroïğnelere ağırlık uygulanmadan önce ve sonra dijital mikroskop ile görüntüleri alınarak morfolojileri incelenmiştir (Şekil 4.23). Bu sayede mikroïğnelerin penetrasyon derinliği ve mekanik özellikleri hakkında detaylı bir değerlendirme yapılmıştır.

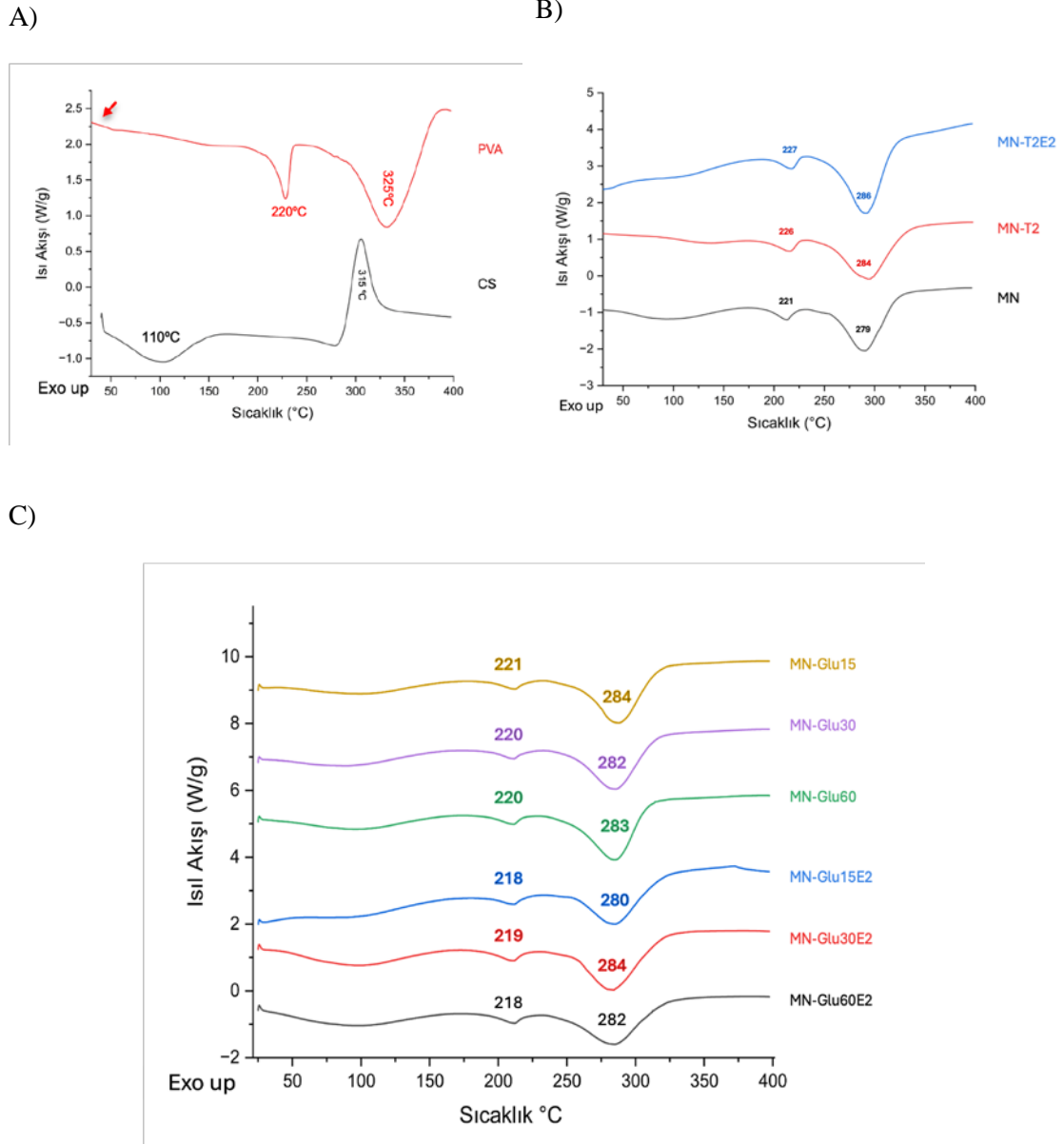
E1, E2 ve E3 içeren MN'ler 15 dakika boyunca glüteraldehit buharına maruz bırakıldığında 3. ile 4. katmanda az sayıda iğne izi olduğu görülmüştür. Uygulama süresi 30 ve 60 dakikaya çıkarıldığında ise MN'lerde 3. ve 4. katmanlarda iğne izleri daha fazla olup belirgin bir penetrasyon olduğu gözlemlenmiştir. Etkin maddenin MN'lerin penetrasyonuna etkisi değerlendirildiğinde ise E1 ve E2 yüklü MN'lerin penetrasyon kabiliyetlerinin E3 yüklü MN'lere göre daha fazla olduğu, E3 grubunda 3. ve 4. katmanlarda daha az sayıda iğne izinin olduğu tespit edilmiştir. Bununla birlikte test edilen tüm gruplarda 5 Kg (49 N) ağırlık uygulandıktan sonra iğnelerde ezilme, eğrilme ve kırılma gibi hasarlar olduğu gözlemlenmiştir. Sonuç olarak çapraz bağlayıcı ajanın uygulama süresi ve kullanılan etkin maddenin türüne bağlı olarak elde edilen MN'lerin penetrasyon özelliklerinin değiştiği görülmüştür. Tekstür analizi sonuçları 15 dak. Glu uygulanan MN'lerin daha esnek olduğunu göstermiştir. Dolayısıyla 15 dak. Glu maruz bırakılan MN'lerin daha az penetre olması beklenen sonuçtur.



Şekil 4.23. Glu buharına maruz bırakılmış östrojen türevleri içeren mikroıǧnelerin parafilm penetrasyon test sonrası görüntüleri.

#### 4.3.5. Mikroïĝnelerin DSC Analizleri

Mikroïĝne üretiminde kullanılan polimerlerin ve MN'lerin DSC analizleri 30°C – 400 °C aralığında incelenmiş ve Şekil 4.24'te sunulmuştur. Şekil 4.24.A'da saf CS ve PVA'nın DSC termogramları gösterilmektedir. Bu termogramlar incelendiğinde PVA eğrisinde ~220°C'de keskin bir endotermik pik gözlemlenmektedir. Bu pik, PVA'nın erime noktasını ( $T_m$ ) temsil etmektedir. Erime noktasından sonra görülen pik ise PVA'nın bozunmaya başladığını göstermektedir [119]. Şekil 4.24.C'de DCS eğrilerinde 28°C'de PVA'nın camsı geniş sıcaklığı gözlenmiştir. Bu analizde CS için DSC termogramı incelendiğinde 110 °C'de geniş bir endotermik pik görülmektedir. Bu pikin CS'nin hapsettiği nemden kaynaklandığı düşünülmektedir. Buna ek olarak 315 °C'de ise CS'nin bozulmasından kaynaklanan büyük bir pik bulunmaktadır. Kitin yapısının kompaktlığı nedeniyle CS'nin termal ayrışması için yüksek termal enerji gerekmektedir [120]. Bu bilgiler, MN formülasyonlarında PVA ve CS termal davranışlarını anlamak açısından önemlidir. Şekil 4.24B ve C'de ise MN, TEOS ve Glu ile çapraz bağlanmış ve E2 yüklenmiş MN'lerin DSC termogramları görülmektedir. CS ve PVA kullanılarak hazırlanmış MN'lerde polimerlere özgü pikler görülmektedir. Kompozit yapı nedeniyle PVA'nın bozulma sıcaklığı 300°C'nin altına inmiştir. MN çapraz bağlamasında kullanılan TEOS ve Glu varlığının MN'lerin termal özelliklerinde DCS analizine göre herhangi bir farklılığa neden olmadığı görülmektedir. Literatür verilerine göre E2'nin erime sıcaklığının ~180°C'de görüldüğü belirtilmiştir [121]. Çapraz bağlayıcı ajanlarda görülen etkiye benzer şekilde yapıya E2'nin dahil olması DCS analizine göre MN'lerin termal karakterinde belirgin bir değişikliğe sebep olmamıştır. Sonuç olarak MN'lerin farklı ajanlarla çapraz bağlanmasının veya etken madde olarak E2 yüklenmesinin MN'lerin termal özellikleri üzerine bir etkisi gözlenmemiştir (Şekil 4.24B-C). Tüm mikroïĝnelerin DSC termogramları benzer özellik göstermekte olup elde edilen bulgular ise literatür ile örtüşmektedir [119-121].



Şekil 4.24. Üretimde kullanılan polimerin ve mikroïğnelerin DSC termogramları.

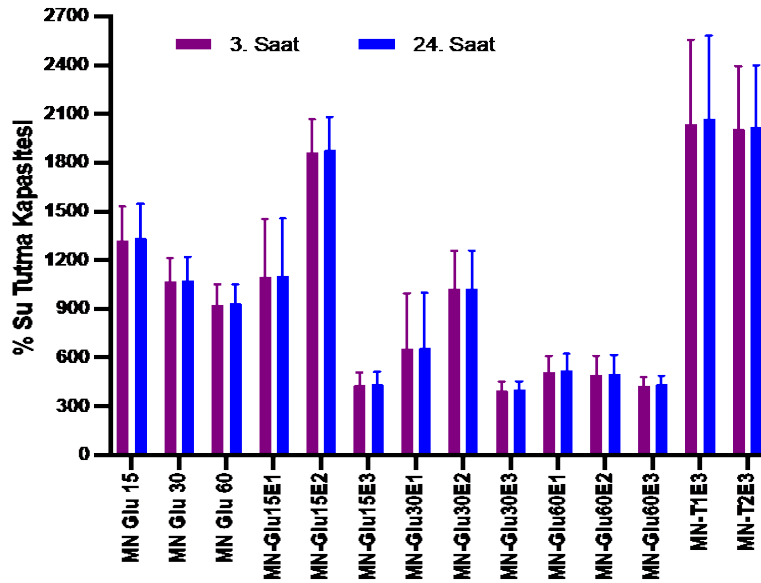
#### 4.3.6. Mikroïğnelerin Su Tutma Kapasitesi

Bu çalışmada TEOS veya Glu kullanılarak çapraz bağlanan E1, E2 veya E3 içeren, MN'lerin su tutma kapasitesi gravimetrik olarak incelenmiş ve elde edilen veriler Şekil 4.25'de sunulmuştur. Ancak yapılan çalışmada TEOS'lu gruplardan sadece E3 içeren mikroïğneler tartılabilmiş olup diğerleri ise oldukça fazla şişerek kısmi olarak çözünmüş

olup tartılamamıştır. Bu durum E1 ve E2 içeren grupların yeterli çapraz bağa girmeyerek çözündüğünü ve kararlı bir yapı sergilemediklerini göstermiştir.

Glu buharı ile çapraz bağlanan mikroğnelerin uygulama süresinin artışıyla birlikte su tutma kapasitesinin azaldığı tespit edilmiştir. Östrojen gruplarına bağlı olarak, % su tutma kapasitesinin en yüksek E2'de, en düşük ise E3'te olduğu hesaplanmıştır. 15, 30 ve 60 dak. Glu buharına maruz kalan MN'lerin % su tutma kapasiteleri sırasıyla %71,51 ve 50 olarak hesaplanmıştır. E2 içeren ve 15, 30 ve 60 dak. glu maruz bırakılan MN'lerin % su tutma kapasitesi %88, 49 ve 31 olarak ölçülmüştür.

MN'lerin 3 saat ve 24 saat sonra ölçülen ağırlıkları karşılaştırıldığında, 3 saat sonra maksimum su tutma kapasitelerine ulaştıkları tespit edilmiştir. 24 saate kadar bekletilmelerine rağmen, su tutma kapasitelerinde önemli bir değişiklik gözlenmemiştir. Bu sonuçlar, MN'lerin 3 saatte maksimum doygunluğa ulaştıklarını göstermektedir. (Şekil 4.25).



Şekil 4.25. Mikroğnelerin % su tutma kapasitesi.

Bu çalışmada ayrıca farklı çapraz bağlayıcılarla bağlanan MN'lerin su içindeki degradasyon davranışları incelenmiştir. Bu amaçla üretilen MN'ler, 37 °C'de saf suda 24, 48, 96 ve 192 saat bekletilmiş, ardından saf su uzaklaştırılarak -80 °C'de dondurulmuş ve liyofilizatörde gece boyu kurutulmuştur. MN'lerin başlangıç ve son ağırlıkları ölçülerek yüzde kütle kaybı hesaplanmıştır.

Beklenildiği üzere çapraz bağlayıcı kullanılmayan MN grubunda, numuneler saf suya konulduktan hemen sonra çözünmüştür. Benzer şekilde, TEOS (%1 veya %2) ile çapraz bağlanan MN'ler de hızlı bir şekilde çözünmüştür göstermiştir. Ancak, E3 yüklü TEOS-MN'ler, 8 güne kadar kararlı kalmıştır.

Öte yandan, Glu ile 15, 30 ve 60 dakika süreyle çapraz bağlanan MN'lerin tümü, 8 günlük süre sonunda %0.1-1 aralığında olmak üzere çok düşük bir kütle kaybı göstermiştir. 15, 30 veya 60 dak. Glu buharına maruz bırakılan ve E2 içeren MN'lerin % kütle kaybı sonuçları irdelendiğinde, E1 veya E3 içeren MN'lere göre daha hızlı kütle kaybının meydana geldiği tespit edilmiş olup bu sonuç şişme analizinde elde edilen sonucu destekler niteliktedir. Ayrıca yine E2 grubunda Glu buharına maruz bırakma süresi arttıkça meydana gelen % kütle kaybının azaldığı hesaplanmıştır. Elde edilen tüm bu veriler, Glu çapraz bağlayıcısının MN'lere yüksek kararlılık kazandırdığını kanıtlar niteliktedir.

Sonuç olarak, bu çalışma, çapraz bağlayıcı türü ve modifikasyon yöntemlerinin, MN'lerin hidrolitik degradasyon profillerini önemli ölçüde etkilediğini göstermiştir. Glu ile çapraz bağlama, MN'lerin kararlılığını büyük ölçüde artırırken, TEOS ve MN grubu hızlı olarak çözünme sergilemiştir. Glu buharı ile çapraz bağlanan MN'lerin oldukça yavaş kütle kaybına uğramalarının çapraz bağlanmanın yanında analizlerin sulu ortamda gerçekleşmesinden kaynaklandığı düşünülmüştür. *İn vivo* koşullar dikkate alındığında, hem hidrolitik hem de enzimatik degradasyonların meydana geleceği düşünülmektedir [122]. Bunun da % kütle kaybının artmasına ve MN'lere yüklü biyoaktif ajanların daha hızlı salınması ile sonuçlanacağı düşünülmektedir. Nitekim, ileriki bölümde sunulacak olan CAM ve *in vivo* sonuçları da implante edilen MN'lerin kısmi olarak degrede olduğunu ve damarlanmanın arttığını göstermiştir.

#### **4.4. Mikroignelerin Anjiyogenik Etkileri**




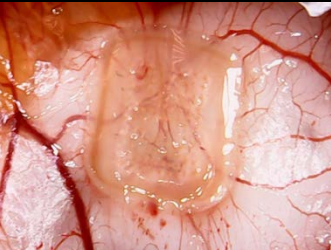


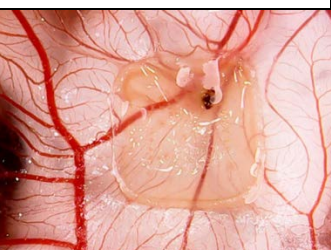

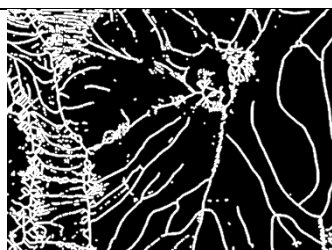
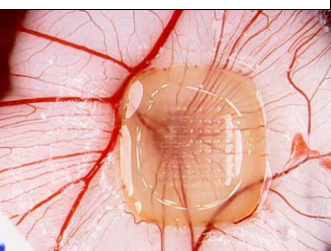


Anjiyogenez araştırmalarında birçok yöntem kullanılmakla birlikte bu yöntemlerin bazı kısıtlamaları bulunmaktadır. *İn vitro* çalışmalarda endotel hücrelerinin kültüre

edilmesinin oldukça zorlayıcı olmasının yanı sıra bu yöntem anjiyogenik yanıtın uygun şekilde değerlendirilmesi açısından da yetersiz kalmaktadır. *In vivo* çalışmalarda ise ilgili ajanın anjiyogenik etkisi ile sürece birçok değişken dahil olmaktadır. Aynı zamanda *in vivo* çalışmalar yüksek maliyetli olup uygulama açısından zordur ve değerlendirme için gelişmiş yöntemler kullanılması gerekmektedir [123]. CAM deneyi *in vitro* ve *in vivo* deneylerinin dezavantajlarının ortadan kaldırıldığı 12-14 gün içerisinde sonuç alınabilen bir anjiyogenez deneyidir. CAM embriyonik dönemde tavuk embriyolarının besin ve gaz taşınmasının gerçekleştiği dış zardır. Bu zar üzerinde bulunan damarlar direkt olarak embriyo ile etkileşime girmektedir. CAM deneyi *ex ovo* (yumurta kabuğundan çıkarılmış) veya *in ovo* (yumurta kabuğu içerisinde) olarak gerçekleştirilebilir. Bu yöntemler ile zardaki damarlara uygulanan anjiyogenik/anti-anjiyogenik ajanların anjiyogenez üzerine etkileri değerlendirilmektedir [124]. Tez kapsamında östrojen yüklü MN'lerin anjiyogenez üzerindeki etkileri ve biyouyumlulukları *in ovo* CAM deneyi ile incelenmiştir. MN'lerin mekanik, degradasyon, morfolojik özellikleri göz önünde bulundurularak Glu ile çapraz bağlanmış mikroığneler CAM'e uygulanmıştır.

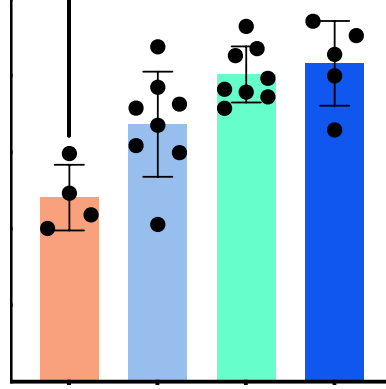
MN'ler, tavuk embriyolarına embriyonik gelişimin 7. gününde uygulanmış ve embriyonik gelişiminin 12. günü görüntüler analiz edilerek uygulanan MN'lerin anjiyogenik etkileri değerlendirilmiştir. Image J programı ile CAM fotoğraflarının iki aşamalı işlenmiş görüntüleri orijinal fotoğraflar ile Şekil 4.26'da verilmiştir. İkinci adımdaki işlenmiş görüntüler kullanılarak, her deney grubu için % damarlanma değerleri hesaplanarak damar oluşumu analiz edilmiştir. Şekil 4.27'de CAM fotoğraflarından elde edilen sayısal veriler % damar yoğunlukları ile istatistiksel analizi verilmiştir. Boş MN uygulanan grupta % damar yoğunluğu 1.2, E1 yüklü MN'lerde 1.7, E2 yüklü MN'lerde 2 ve E3 yüklü MN'lerde 2.1 hesaplanmıştır. Boş MN grubu ile karşılaştırıldığında, östrojen yüklü MN gruplarının tümü istatistiksel olarak anlamlı derecede daha yüksek damarlanmaya neden olmuştur ( $p < 0.05$ ). Östrojen yüklü MN grupları kendi aralarında karşılaştırıldığında ise en yüksek damarlanma E3 yüklü MN grubunda gözlemlenmiş ve bu artışı sırasıyla E2 ve E1 grupları takip etmiştir. Bununla birlikte E3, E2 ve E1 grupları arasında damarlanma seviyelerine göre istatistiksel olarak anlamlı bir fark görülmemiştir ( $p > 0.05$ ). Bu sonuç, farklı östrojen türevlerinin anjiyogenez üzerinde benzer etkilere sahip olduğunu işaret etmektedir. Aynı zamanda östrojen yüklü MN'lerin boş MN ile karşılaştırıldığında anjiyogenezi teşvik edici bir etkiye sahip olduğunu göstermektedir.



MN'ler CAM deneyinde, HET-CAM olarak adlandırılmış ve biyobozunur MN'lerin irritasyonunun değerlendirilebilmesi amacı ile çözünmüş MN'lerin uygulanması yaklaşımı ile kullanılmaktadır [125]. Ancak literatürde MN'lerin direkt olarak CAM üzerine uygulandığı ve anjiyogenik etkilerinin araştırıldığı çalışmalar bulunmamaktadır. Bu bilgiler göz önüne alındığında tez kapsamında yapılan östrojen yüklü MN'lerin CAM deneyi kullanılarak anjiyogenik özelliklerinin değerlendirilmesi özgünlük taşımaktadır. Literatürde, Mangır ve ark. tarafından estradiol yüklü PLA meşler CAM üzerine uygulanarak anjiyogenik etkileri değerlendirilmiştir. Elde edilen verilere göre kontrol grubu olarak kullandıkları PLA meşe göre estradiol yüklü PLA meşlerin damarlanmayı anlamlı şekilde artırdığı bildirilmiştir [126].

	CAM Fotoğrafi	1.Adım Görüntü İşleme	2.Adım Görüntü İşleme
MN-Glu60			
MN-Glu60E1			
MN-Glu60E2			
MN-Glu60E3			

Şekil 4.26. Mikroıǧnelerin *in ovo* CAM deneyi fotoğrafları: 1. (binary) ve 2. (skeletonize) adım işlenmiş görüntüleri.



Şekil 4.27. CAM alanında damar yoğunlukları.

#### 4.5. Mikroıǧnelerin *İn vivo* Yanıtı

Yukarıda detayları verilen çalışmalar sonucunda TEOS kullanılarak hazırlanan MN'lerin hızlı bir şekilde bozulduğu tespit edilmiştir. Dolayısıyla östrojen türevi yüklü MN'lerin *in vivo* yanıtın araştırılmasında gluteraldit ile çapraz bağlanan MN'ler kullanılmıştır. Glu 15'in mekanik testlerde daha esnek olması ve düşük penetrasyon göstermesi nedeniyle *in vivo* çalışmalarda tercih edilmemiştir. Buna karşılık, Glu 30 ve Glu 60'ın benzer mekanik özellikler sergilediği gözlenmiştir. Bununla birlikte, SEM ve penetrasyon çalışmaları E3 kullanıldığında düzgün morfolojiye ve mekanik özelliklere sahip MN'lerin elde edilemediğini ve CAM analizleri sonuçları da E1 yüklü MN'lerin yüksek anjiyogenik etkiye sahip olmadığını göstermiştir. Bu sebeplerden dolayı MN'lerin *in vivo* biyolojik yanıtlarının araştırılmasında E2 yüklü ve 60 dak. gluteraldehit buharına maruz kalan MN'ler kullanılmıştır.

MN yamalarının *in vivo* implantasyonundan 14 gün sonra histolojik incelemeler için yamaları içeren abdomen bölgesinden alınan örneklerin makroskopik incelemelerinde MN yamaların bağ dokusu içinde dokuyla bütünleşerek dokuya entegre olduğu gözlenmiştir.

Alınan örneklerin mikroskopik incelemelerinde bağ dokusu içinde eozinofilik olarak boyanmış MN yamanın granulatöz yabancı cisim reaksiyonuna neden olduğu ve çevre dokudan izole edici bir kapsül ile çevrelendiği ve tam bozunma olmadığını gözlenmiştir (Şekil 4.28).

Kontrol grubu olarak kullanılan MN-Glu60 ve östrojen içeren MN-Glu60E2 grubu karşılaştırıldığında kontrol grubunda materyal çevresinde çok sayıda çok çekirdekli dev hücre izlenmiştir. MN-Glu60E2 grubuna ait örneklerde inflamatuvar hücre ve damarlanmanın kontrol grubuna göre arttığı ve bu artışın istatistiksel olarak anlamlı olduğu saptanmıştır (Şekil 4.29). MN yamayı çevreleyen doku reaksiyonunda kolajen fibrillerin arttığı izlenmiştir (Şekil 4.30)

Gruplar yabancı cisim granulatöz reaksiyon oluşum süreci açısından değerlendirildiğinde kontrol grubunda çok sayıda dev hücre ve dışta kapsül ile granülom izlenirken MN-Glu60E2 uygulanan grupta materyale tutunan epiteloid histiositler, çevresinde inflamatuvar hücreler, lenfositler gözlenmiştir. MN-Glu60E2 uygulanan grupta fibroblastların ve fibroblastik aktivitenin arttığı, MN yamanın çevresinde hücre, fibriller ve damarlardan oluşan dokunun izole edici kapsüller bir doku ile sarılı olarak abdomenin bağ dokusundan sınırlandırıldığı izlenmiştir.

Hazırlanan MN yamalardan kitosan ve PVA'nın glüteraldehit ile çapraz bağlanması ile degrade olmayan MN'lerin elde edildiği degradasyon, CAM analizi ve histolojik incelemelerde ile gösterilmiştir.

Hem kontrol hem de östrojen yüklü MN'lerde, materyalin implantasyonu sonrasında yabancı cisim granulatöz reaksiyon gözlenmiştir. Bu, implante edilen materyalin vücuda yabancı olarak algılanmasından kaynaklanmakta olup beklenen bir tepkidir [127].

Östrojen yüklü MN-Glu60E2 grubunda, kontrol grubuna kıyasla artan inflamatuvar hücre varlığı ve damarlanma gözlemlenmiştir. Bu bulgu, östrojenin anjiyogenik ve inflamatuvar yanıtları tetikleyebileceğini göstermektedir. MN-Glu60E2 grubunda, artan fibroblast aktivitesi ve kolajen fibril birikimi gözlenmiştir. Bu, östrojenin doku yeniden şekillenmesi ve yara iyileşmesi süreçlerini etkilediğini düşündürmektedir. Son ve ark. yaptıkları çalışmada menapoz sonrası hastalarda E2'nin topikal uygulamasını gerçekleştirmiş ve elde edilen veriler hastalarda tip I pro-kolajen, tropoelastin ve fibrilin-1'in hem mRNA hem de protein düzeyinde arttığını göstermiştir [128]. Bu sonuçlar E2'nin kolajen sentezini artırdığını ve bu çalışmada da gözlemlenen artan fibroblast

aktivitesi ve kolajen fibril birikimini açıklamaktadır. Her iki grupta da, materyalin çevresinde izole edici bir kapsül oluşumu gözlemlenmiştir. Bu, vücudun uygulanan MN yamayı izole etme ve sınırlandırma girişimidir [129].

Östrojen, birçok fizyolojik süreçte rolü olan önemli bir steroid hormondur. Mikroıgne (MN) sistemleri ise özellikle transdermal ilaç salınımı için umut verici bir platform olarak kabul edilmektedir. Östrojen salan MN'lerin geliştirilmesi, östrojen replasman tedavisi veya diğer terapötik uygulamalar için alternatif bir yol sunabilir [130]. Ancak, bu tür sistemlerin *in vivo* uygulamaları, doku reaksiyonları ve güvenlik profilleri hakkında literatürde sınırlı sayıda çalışma bulunmaktadır. Genel olarak, literatür bulguları, östrojen yüklü MN'lerin *in vivo* uygulamalarında inflamatuvar yanıt, anjiyogenez [131], doku yeniden şekillenmesi ve yabancı cisim reaksiyonu gibi etkilerin gözlemlenebileceğini göstermektedir [132]. Ancak, bu etkilerin mekanizmaları, oluşum süreçleri ve uzun vadeli sonuçları hakkında daha fazla araştırmaya ihtiyaç duyulmaktadır. Ayrıca, östrojenin farklı türevlerinin, dozlarının ve taşıyıcı materyallerin etkilerinin de incelenmesi gerekmektedir. Bu sayede, östrojen salan MN sistemlerinin optimize edilmesi ve güvenli bir şekilde klinik uygulamalara aktarılması mümkün olabilecektir [133].

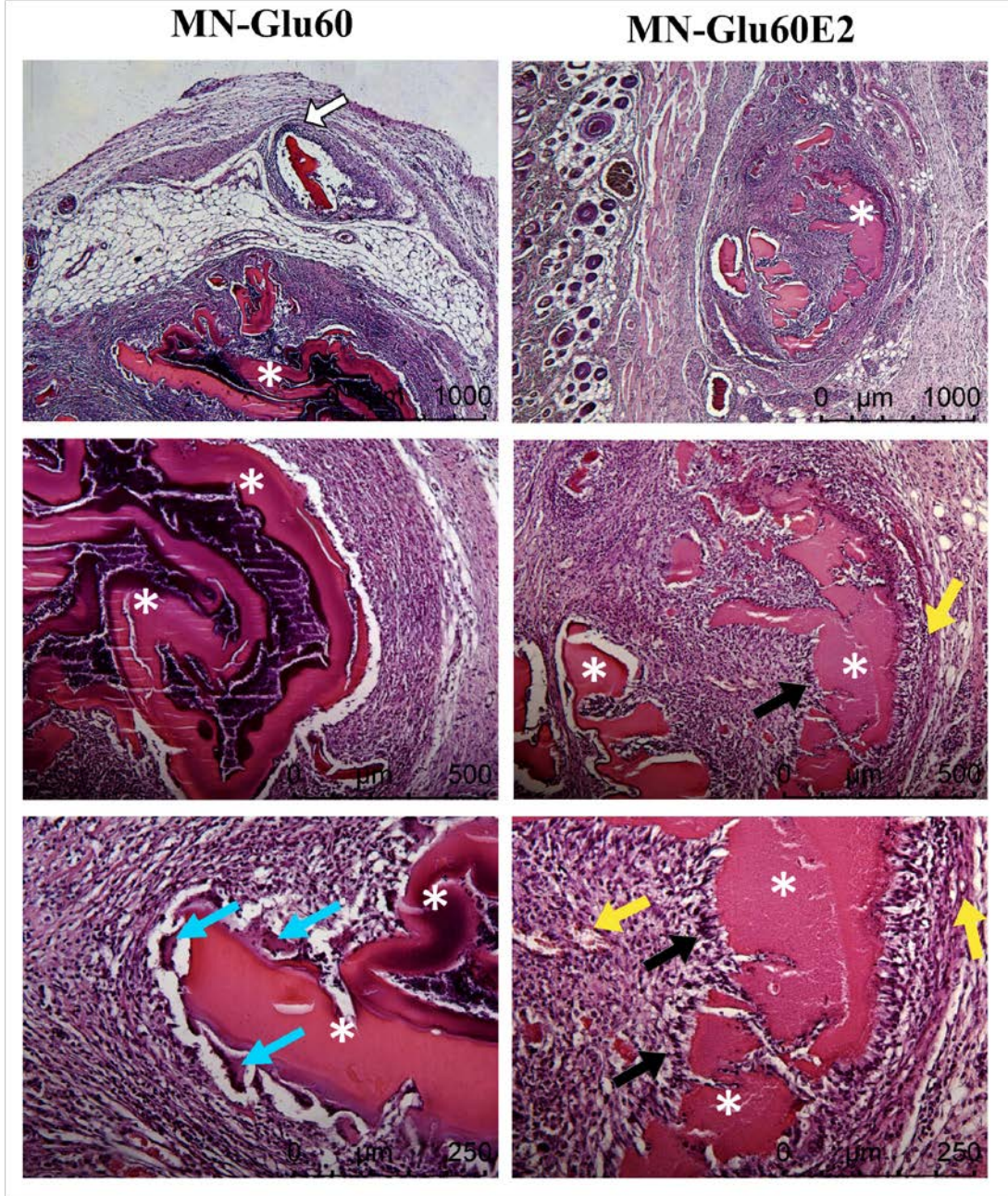
Östrojenin çeşitli dokulardaki fibroblast hücreleri üzerindeki proliferatif etkisi göz önüne alındığında, implant materyallerinin östrojen reseptörlerine bağlanma ve sinyal yollarını aktive etme yeteneği, yabancı cisim reaksiyonunu etkileyebilir. Makrofajlar tarafından salınan faktörlerin, özellikle reaktif oksijen türleri ve parçalayıcı enzimlerin, implant yüzeyini bozma ve proteinleri sökme potansiyeli vardır. Bu nedenle, implant materyallerinin yapısı ve yüzey özellikleri, makrofaj saldırısına karşı direnç gösterebilmeli ve enflamasyonu minimize edecek şekilde tasarlanmalıdır [134].

Biyobozunur implantlar için, kontrollü bir inflamatuvar yanıt ve makrofaj aktivitesi, materyalin zamanla parçalanmasını ve vücuttan atılmasını sağlayabilir. Ancak kalıcı implantlar için, yabancı cisim reaksiyonunun kronikleşmesi ve devam eden makrofaj saldırısı, implant stabilitesini ve işlevini tehlikeye atabilir. Bu nedenle, bu tür implantlar için makrofaj yanıtının baskılanması veya uygun şekilde yönlendirilmesi gerekebilir [135].

Ayrıca, implantasyonun erken safhalarında nötrofil ve monosit göçünü ve aktivasyonunu düzenleyen faktörler de dikkate alınmalıdır. Bu hücrelerin aşırı veya yetersiz aktivasyonu, enflamatuar sürecin dengesini ve nihayetinde yabancı cisim reaksiyonunun şiddetini etkileyebilir [136].

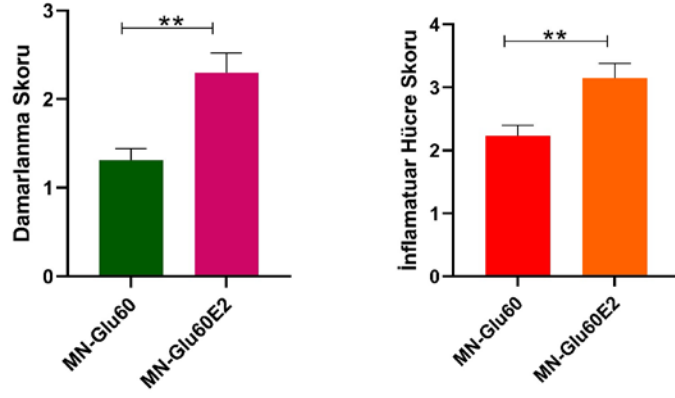
Sonuç olarak, implant tasarımında ve optimizasyonunda, implant-konak etkileşiminin tüm aşamalarının ve bu süreçte yer alan tüm hücre tiplerinin ve sinyallerin dikkate alınması önemlidir. Biyomalzeme yüzeyi, yapısı ve bileşimi, enflamatuar yanıtı ve makrofaj aktivitesini uygun şekilde düzenleyecek ve terapötik performansı maksimize edecek şekilde ayarlanmalıdır.



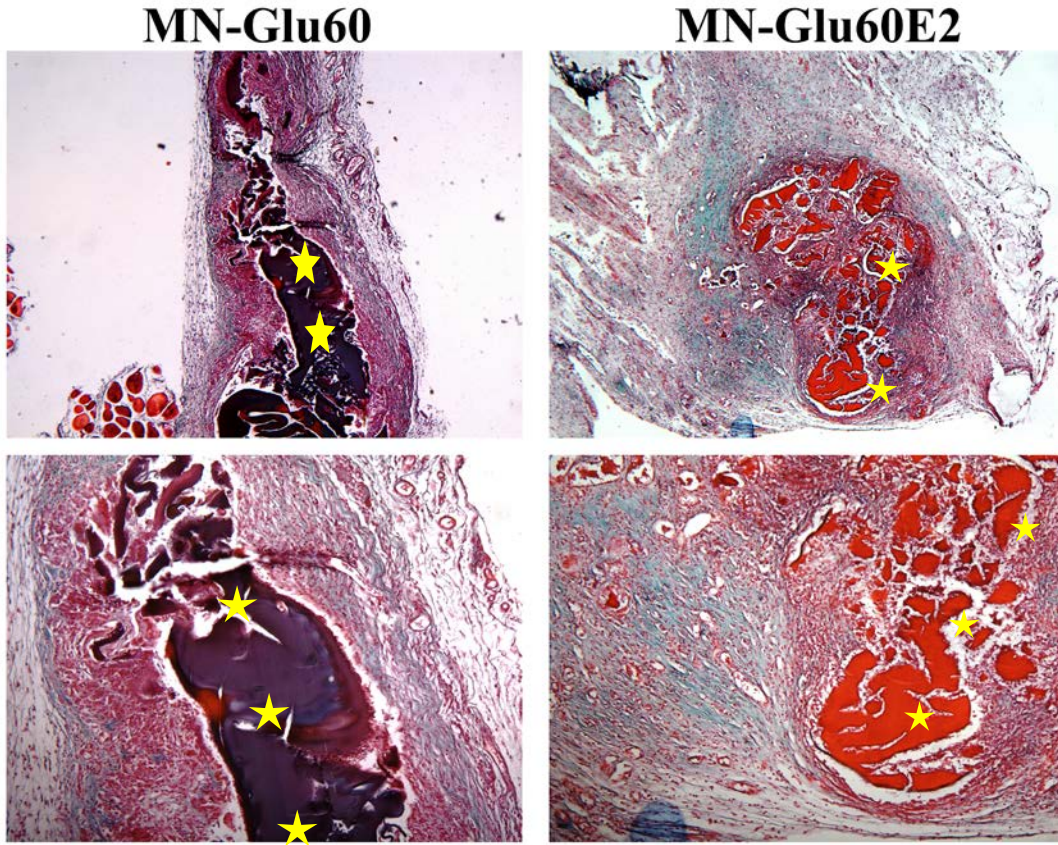


Şekil 4.28. MN-Glu60 ve östrojen içeren MN-Glu60E2 gruplarının ışık mikrofrafı. MN-Glu60E2 grubuna ait örneklerde inflamatuvar hücreler ve damarlanmanın arttığı izlenmektedir. Sarı, mavi, siyah ve beyaz oklar sırasıyla damar, dev hücre, histosit ve kapsülü göstermektedir. Yıldız mikroigne yamayı göstermektedir.





Şekil 4.29 MN-Glu60 ve MN-Glu60E2 gruplarının damarlanma ve inflammatuar hücre skorları (\*\* p<0.01).



Şekil 4.30 MN-Glu60 ve MN-Glu60E2 gruplarının Masson Trikrom boyamalarına ait ışık mikrografları. MN-Glu60E grubunda mikroigne çevresindeki doku reaksiyonunda kolajen fibrillerin arttığı izlenmektedir. Kolajen yeşil renk ile boyanmıştır. Yıldız mikroigne yamayı göstermektedir.



## 5. YORUMLAR

Östrojen, anjiyogenez düzenlemesinde çeşitli mekanizmalar üzerinde rol oynayarak anjiyogenez etkileyen önemli bir hormondur. Diğer taraftan mikroıǧneler, uzatılmış/kontrollü ilaç salımı sağlayabilen transdermal sistemler olarak öne çıkmaktadır. Bu nedenle östrojen yüklü mikroıǧneler anjiyogenezin gelişmesi için çeşitli terapötik uygulamalarda büyük potansiyel sunmaktadır. Bu tez kapsamında farklı östrojen türevleri (E1, E2 ve E3) içeren kitosan/PVA mikroıǧneler TEOS ve Glu ile çapraz bağlanarak karakterizasyonlarının yanında anjiyogenez üzerine etkileri ve *in vivo* yanıtları değerlendirilmiştir. Tez kapsamında yapılan analizlerle mikroıǧnelerin stabilitesi, etkinliği ve güvenliği detaylı bir şekilde araştırılmıştır.

Fizyolojik doz aralığında E1 ve E2 içeren mikroıǧneler düzgün, pürüzsüz ve sıralı iğne yapısına sahip olurken E3 içeren mikroıǧnelerin bozuk morfolojiye sahip olduğu görülmüş olup bunun nedeninin E3'ün kitosan/PVA ile etkileşime girdiği sonucuna varılmıştır.

TEOS ve Glu ile çapraz bağlanan E1 veya E2 içeren MN'lerin mekanik özellikleri incelendiğinde TEOS konsantrasyonunun ve glutaraldehit buharına maruz kalma süresinin, MN'lerin mekanik özellikleri üzerinde etkili olduğunu göstermiştir. TEOS ile çapraz bağlanan mikroıǧnelerin daha esnek olduğu ve daha yüksek bir kuvvette kırılma gösterdiği görülmüştür. Glu buharına maruz bırakılan E1 veya E2 içeren mikroıǧnelerin ise uygulama süresinin artmasıyla daha kırılğan bir yapıya sahip olduğu ve aynı zamanda çapraz bağlanmanın etkisiyle daha yüksek bir kuvvette kırılma göstermiştir.

Mikroıǧnelerin su tutma ve degradasyon sonuçları incelendiğinde ise TEOS ile çapraz bağlı mikroıǧnelerin yeterli çapraz bağa sahip olmadığı, su içinde çözündüğü ve kararlı bir yapı sergilemedikleri gözlenmiştir. Glu buharı ile çapraz bağlanan mikroıǧnelerin ise kararlı oldukları ve 8. günde maksimum %1 kütle kaybına uğradıkları izlenmiştir. Bu nedenle çalışmalara Glu buharı ile çapraz bağlı mikroıǧneler ile devam edilmiştir.

*In ovo* CAM deneyi sonuçlarına göre östrojen yüklü mikroıǧnelerin tümünün, içermeyen gruplara göre istatistiksel olarak anlamlı derecede daha yüksek damarlanma sağladığı gözlenmiş olup anjiyogenez teşvik edici bir etkiye sahip olduğu tespit edilmiştir. Anjiyogenik etki değerlendirmeleri, mikroıǧnelerin hedeflenen terapötik etkilerini doğrulamıştır.

Mikroiğnelerin *in vivo* yanıtları değerlendirildiğinde ise implantasyonundan 14 gün sonra MN yamaların bağ dokusu içinde dokuyla bütünleşerek dokuya entegre olduğu ve aynı zamanda yabancı cisim granülatöz reaksiyonu gösterdiği tespit edilmiştir. Diğer taraftan östrojen yüklü mikroiğnelerin kontrol grubuna göre damarlanmayı artırdığı, fibroblast aktiviteyi tetiklediği ve kolajen fibril birikimini artırdığı tespit edilmiştir.

Sonuç olarak bu tez çalışması, anjiyogenezin düzenlenmesi için östrojen yüklü mikroiğnelerin geliştirilmesi ve karakterizasyonu konusunda önemli katkılar sunmuştur. Elde edilen sonuçlar, bu alanda bilgi birikimini genişletmiş ve anjiyogenezi artırmak için yeni bir yaklaşım ortaya koymuştur.

## 6. KAYNAKLAR

1. Velnar, T., T. Bailey, and V. Smrkolj, *The wound healing process: an overview of the cellular and molecular mechanisms*. J Int Med Res, 2009. **37**(5): p. 1528-42.
2. Wilkinson, H.N. and M.J. Hardman, *Wound healing: cellular mechanisms and pathological outcomes*. Open Biol, 2020. **10**(9): p. 200223.
3. Bowers, S. and E. Franco, *Chronic Wounds: Evaluation and Management*. Am Fam Physician, 2020. **101**(3): p. 159-166.
4. Olsson, M., et al., *The humanistic and economic burden of chronic wounds: A systematic review*. Wound Repair Regen, 2019. **27**(1): p. 114-125.
5. Veith, A.P., et al., *Therapeutic strategies for enhancing angiogenesis in wound healing*. Adv Drug Deliv Rev, 2019. **146**: p. 97-125.
6. Konukoğlu D, T.S.M., *Molecular basis of angiogenesis mechanisms and tumor angiogenesis*. Cerrahpaşa J Med, 2005. **36**: p. 42-48.
7. Ganz, T., et al., *Defensins. Natural peptide antibiotics of human neutrophils*. J Clin Invest, 1985. **76**(4): p. 1427-35.
8. Vandamme, D., et al., *A comprehensive summary of LL-37, the factotum human cathelicidin peptide*. Cell Immunol, 2012. **280**(1): p. 22-35.
9. Kakudo, N., et al., *Platelet-rich plasma releasate promotes angiogenesis in vitro and in vivo*. Med Mol Morphol, 2014. **47**(2): p. 83-9.
10. Kawaguchi, A.T., et al., *Effects of liposome-encapsulated hemoglobin on gastric wound healing in the rat*. Artif Organs, 2014. **38**(8): p. 641-9.
11. Chiang, B., et al., *Enhancing skin wound healing by direct delivery of intracellular adenosine triphosphate*. Am J Surg, 2007. **193**(2): p. 213-8.
12. Han, G., et al., *Nitric oxide-releasing nanoparticles accelerate wound healing by promoting fibroblast migration and collagen deposition*. Am J Pathol, 2012. **180**(4): p. 1465-73.
13. Yasasvini, S., et al., *Topical hydrogel matrix loaded with Simvastatin microparticles for enhanced wound healing activity*. Mater Sci Eng C Mater Biol Appl, 2017. **72**: p. 160-167.
14. Ram, M., et al., *Deferoxamine modulates cytokines and growth factors to accelerate cutaneous wound healing in diabetic rats*. Eur J Pharmacol, 2015. **764**: p. 9-21.
15. Pardue, E.L., S. Ibrahim, and A. Ramamurthi, *Role of hyaluronan in angiogenesis and its utility to angiogenic tissue engineering*. Organogenesis, 2008. **4**(4): p. 203-14.
16. Chen, X., et al., *The healing and anti-scar effects of astragaloside IV on the wound repair in vitro and in vivo*. J Ethnopharmacol, 2012. **139**(3): p. 721-7.
17. Merrell, J.G., et al., *Curcumin-loaded poly(epsilon-caprolactone) nanofibres: diabetic wound dressing with anti-oxidant and anti-inflammatory properties*. Clin Exp Pharmacol Physiol, 2009. **36**(12): p. 1149-56.
18. Shan, Y.H., et al., *Silk fibroin/gelatin electrospun nanofibrous dressing functionalized with astragaloside IV induces healing and anti-scar effects on burn wound*. Int J Pharm, 2015. **479**(2): p. 291-301.

19. Nevzati, E., et al., *Estrogen induces nitric oxide production via nitric oxide synthase activation in endothelial cells*. *Acta Neurochir Suppl*, 2015. **120**: p. 141-5.
20. Trenti, A., et al., *Estrogen, Angiogenesis, Immunity and Cell Metabolism: Solving the Puzzle*. *Int J Mol Sci*, 2018. **19**(3).
21. Rauschemberger, M.B., M.J. Sandoval, and V.L. Massheimer, *Cellular and molecular actions displayed by estrone on vascular endothelium*. *Mol Cell Endocrinol*, 2011. **339**(1-2): p. 136-43.
22. Ivory, A. and A.S. Greene, *Distinct roles of estrone and estradiol in endothelial colony-forming cells*. *Physiol Rep*, 2023. **11**(19): p. e15818.
23. G.S. Ashcroft, T.G.-W., M.A. Horan, S.M. Wahl, M.W.J. Ferguson, *Topical Estrogen Accelerates Cutaneous Wound Healing in Aged Humans Associated with an Altered Inflammatory Response*. *Am J Pathol* 1999. **155**: p. 1137-1146.
24. Schultz, G., *Estrogen Accelerates Cutaneous Wound Healing Associated with an Increase in TGF- $\beta$ 1 Levels*. *Nature Medicine* 1997. **3**(11).
25. G.M. Rubanyi, A.J., K. Kauser, *Effect of Estrogen on Endothelial Function and Angiogenesis*. *Vascular Pharmacology*, 2002. **38**: p. 89-98.
26. N. Mangir, C.J.H., C.R. Chapple, S. MacNeil, *Oestradiol-releasing Biodegradable Mesh Stimulates Collagen Production and Angiogenesis: An Approach to Improving Biomaterial Integration in Pelvic Floor Repair*. *European Urology Focus* 2019. **5**: p. 280-289.
27. Kolte, D., J.A. McClung, and W.S. Aronow, *Chapter 6 - Vasculogenesis and Angiogenesis, in Translational Research in Coronary Artery Disease*, W.S. Aronow and J.A. McClung, Editors. 2016, Academic Press: Boston. p. 49-65.
28. Shi, Z., et al., *Research progress on the mechanism of angiogenesis in wound repair and regeneration*. *Front Physiol*, 2023. **14**: p. 1284981.
29. Veith, A.P., et al., *Therapeutic strategies for enhancing angiogenesis in wound healing*. *Advanced Drug Delivery Reviews*, 2019. **146**: p. 97-125.
30. Kuryłowicz, A., *Estrogens in Adipose Tissue Physiology and Obesity-Related Dysfunction*. *Biomedicines*, 2023. **11**(3): p. 690.
31. Cui, J., Y. Shen, and R. Li, *Estrogen synthesis and signaling pathways during aging: from periphery to brain*. *Trends in molecular medicine*, 2013. **19**(3): p. 197-209.
32. Watson, C.S., Y.J. Jeng, and M.Y. Kochukov, *Nongenomic actions of estradiol compared with estrone and estriol in pituitary tumor cell signaling and proliferation*. *The FASEB Journal*, 2008. **22**(9): p. 3328-3336.
33. Carreau, S., C. deVienne, and I. Galeraud-Denis, *Aromatase and estrogens in man reproduction: a review and latest advances*. *Advances in medical sciences*, 2008. **53**(2): p. 139.
34. Losordo, D.W. and J.M. Isner, *Estrogen and angiogenesis: a review*. *Arteriosclerosis, thrombosis, and vascular biology*, 2001. **21**(1): p. 6-12.
35. Verdier-Sévrain, S., F. Bonté, and B. Gilchrist, *Biology of estrogens in skin: implications for skin aging*. *Experimental Dermatology*, 2006. **15**(2): p. 83-94.
36. Kumar, R., et al., *The Dynamic Structure of the Estrogen Receptor*. *Journal of Amino Acids*, 2011. **2011**: p. 1-7.

37. Marcantoni, E., et al., *Effects of estrogen on endothelial prostanoid production and cyclooxygenase-2 and heme oxygenase-1 expression*. Prostaglandins & Other Lipid Mediators, 2012. **98**(3-4): p. 122-128.
38. Nevzati, E., et al., *Estrogen induces nitric oxide production via nitric oxide synthase activation in endothelial cells*. Neurovascular Events After Subarachnoid Hemorrhage: Towards Experimental and Clinical Standardisation, 2015: p. 141-145.
39. Trenti, A., et al., *Estrogen, Angiogenesis, Immunity and Cell Metabolism: Solving the Puzzle*. International Journal of Molecular Sciences, 2018. **19**(3): p. 859.
40. Dama, A., et al., *Estrogen Receptor Functions and Pathways at the Vascular Immune Interface*. International Journal of Molecular Sciences, 2021. **22**(8): p. 4254.
41. Massheimer, V., et al., *Signal transduction pathways involved in non-genomic action of estrone on vascular tissue*. Steroids, 2006. **71**(10): p. 857-864.
42. Kuiper, G.G.J.M., et al., *Comparison of the Ligand Binding Specificity and Transcript Tissue Distribution of Estrogen Receptors  $\alpha$  and  $\beta$* . Endocrinology, 1997. **138**(3): p. 863-870.
43. Rauschemberger, M.B., M.J. Sandoval, and V.L. Massheimer, *Cellular and molecular actions displayed by estrone on vascular endothelium*. Molecular and cellular endocrinology, 2011. **339**(1-2): p. 136-143.
44. Ivory, W.A. and A.S. Greene, *The Role of Estrone in Endothelial Progenitor Cell Number and Function*. The FASEB Journal, 2019. **33**(S1): p. 682.3-682.3.
45. Rauschemberger, M.B., J. Sellés, and V. Massheimer, *The direct action of estrone on vascular tissue involves genomic and non-genomic actions*. Life Sciences, 2008. **82**(1-2): p. 115-123.
46. Prausnitz, M.R., *Microneedles for transdermal drug delivery*. Advanced Drug Delivery Reviews, 2004. **56**(5): p. 581-587.
47. CHAMBERS, R., *MICRODISSECTION STUDIES, III. SOME PROBLEMS IN THE MATURATION AND FERTILIZATION OF THE ECHINODERM EGG*. The Biological Bulletin, 1921. **41**(6): p. 318-350.
48. Chambers, R., *Some Physical Properties of the Cell Nucleus*. Science, 1914. **40**(1040): p. 824-827.
49. Cleary, G.W., *Microneedles for Drug Delivery*. Pharmaceutical Research, 2011. **28**(1): p. 1-6.
50. Henry, S., et al., *Microfabricated microneedles: a novel approach to transdermal drug delivery*. Journal of pharmaceutical sciences, 1998. **87**(8): p. 922-925.
51. Senna, A.M. and V.R. Botaro, *Biodegradable hydrogel derived from cellulose acetate and EDTA as a reduction substrate of leaching NPK compound fertilizer and water retention in soil*. Journal of controlled release, 2017. **260**: p. 194-201.
52. Mikszta, J.A., et al., *Improved genetic immunization via micromechanical disruption of skin-barrier function and targeted epidermal delivery*. Nature Medicine, 2002. **8**(4): p. 415-419.
53. McAllister, D.V., et al., *Microfabricated needles for transdermal delivery of macromolecules and nanoparticles: Fabrication methods and transport*

- studies*. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 2003. **100**(SUPPL. 2): p. 13755-13760.
54. Indermun, S., et al., *Current advances in the fabrication of microneedles for transdermal delivery*. Journal of Controlled Release, 2014. **185**: p. 130-138.
  55. Waghule, T., et al., *Microneedles: A smart approach and increasing potential for transdermal drug delivery system*. Biomedicine & Pharmacotherapy, 2019. **109**: p. 1249-1258.
  56. Li, R., et al., *3D-printed microneedle arrays for drug delivery*. Journal of Controlled Release, 2022. **350**: p. 933-948.
  57. Thakur Singh, R.R., et al., *Minimally invasive microneedles for ocular drug delivery*. Expert opinion on drug delivery, 2017. **14**(4): p. 525-537.
  58. Ziad Sartawi, C.B., Waleed Faisal, *Dissolving microneedles: Applications and growing therapeutic potential*. Journal of Controlled Release, 2022. **348**: p. 186-205.
  59. Prausnitz, M.R., *Engineering Microneedle Patches for Vaccination and Drug Delivery to Skin*. Annual Review of Chemical and Biomolecular Engineering, 2017. **8**(1): p. 177-200.
  60. Dharadhar, S., et al., *Microneedles for transdermal drug delivery: a systematic review*. Drug Development and Industrial Pharmacy, 2019. **45**(2): p. 188-201.
  61. Bhatnagar, S., et al., *Zein Microneedles for Localized Delivery of Chemotherapeutic Agents to Treat Breast Cancer: Drug Loading, Release Behavior, and Skin Permeation Studies*. AAPS PharmSciTech, 2018. **19**(4): p. 1818-1826.
  62. Hashmi, S., et al., *Genetic transformation of nematodes using arrays of micromechanical piercing structures*. BioTechniques, 1995. **19**(5): p. 766-770.
  63. Ma, G. and C. Wu, *Microneedle, bio-microneedle and bio-inspired microneedle: A review*. Journal of Controlled Release, 2017. **251**: p. 11-23.
  64. Sartawi, Z., C. Blackshields, and W. Faisal, *Dissolving microneedles: Applications and growing therapeutic potential*. J Control Release, 2022. **348**: p. 186-205.
  65. Sartawi, Z., C. Blackshields, and W. Faisal, *Dissolving microneedles: Applications and growing therapeutic potential*. Journal of Controlled Release, 2022. **348**: p. 186-205.
  66. Donnelly, R.F., et al., *Hydrogel-forming microneedle arrays can be effectively inserted in skin by self-application: a pilot study centred on pharmacist intervention and a patient information leaflet*. Pharm Res, 2014. **31**(8): p. 1989-99.
  67. Ita, K., *Dissolving microneedles for transdermal drug delivery: Advances and challenges*. Biomedicine & Pharmacotherapy, 2017. **93**: p. 1116-1127.
  68. Horbett, T.A., *Adsorption of proteins from plasma to a series of hydrophilic-hydrophobic copolymers. II. Compositional analysis with the pre-labeled protein technique*. J Biomed Mater Res, 1981. **15**(5): p. 673-95.

69. Akhtar, N., et al., *Fabrication of Ethosomes Containing Tocopherol Acetate to Enhance Transdermal Permeation: In Vitro and Ex Vivo Characterizations*. Gels, 2022. **8**(6): p. 335.
70. Tuan-Mahmood, T.-M., et al., *Microneedles for intradermal and transdermal drug delivery*. European Journal of Pharmaceutical Sciences, 2013. **50**(5): p. 623-637.
71. Gupta, J., et al., *Infusion pressure and pain during microneedle injection into skin of human subjects*. Biomaterials, 2011. **32**(28): p. 6823-31.
72. Cárcamo-Martínez, Á., et al., *Hollow microneedles: A perspective in biomedical applications*. International Journal of Pharmaceutics, 2021. **599**: p. 120455.
73. Garland, M.J., et al., *Dissolving polymeric microneedle arrays for electrically assisted transdermal drug delivery*. Journal of controlled release, 2012. **159**(1): p. 52-59.
74. Wang, P., et al., *Intelligent microneedle patch with prolonged local release of hydrogen and magnesium ions for diabetic wound healing*. Bioactive Materials, 2023. **24**: p. 463-476.
75. Donnelly, R.F., et al., *Hydrogel-forming microneedle arrays exhibit antimicrobial properties: Potential for enhanced patient safety*. International Journal of Pharmaceutics, 2013. **451**(1): p. 76-91.
76. Sirbubalo, M., et al., *3D Printing—A “Touch-Button” Approach to Manufacture Microneedles for Transdermal Drug Delivery*. Pharmaceutics, 2021. **13**(7): p. 924.
77. Tucak, A., et al., *Microneedles: Characteristics, Materials, Production Methods and Commercial Development*. Micromachines, 2020. **11**(11): p. 961.
78. Roxhed, N., et al., *Painless drug delivery through microneedle-based transdermal patches featuring active infusion*. IEEE Transactions on Biomedical Engineering, 2008. **55**(3): p. 1063-1071.
79. Prausnitz, M.R., H.S. Gill, and J.-H. Park, *Microneedles for drug delivery*, in *Modified-Release Drug Delivery Technology*. 2008, CRC Press. p. 323-338.
80. Donnelly, R.F., T.R.R. Singh, and A.D. Woolfson, *Microneedle-based drug delivery systems: microfabrication, drug delivery, and safety*. Drug delivery, 2010. **17**(4): p. 187-207.
81. Bauer, J., et al., *Ritonavir: an extraordinary example of conformational polymorphism*. Pharmaceutical research, 2001. **18**: p. 859-866.
82. Kalluri, H., C.S. Kolli, and A.K. Banga, *Characterization of microchannels created by metal microneedles: formation and closure*. The AAPS journal, 2011. **13**: p. 473-481.
83. Boehm, R.D., et al., *Piezoelectric inkjet printing of medical adhesives and sealants*. Jom, 2010. **62**: p. 56-60.
84. Koushik, S.V., et al., *Targeted inactivation of the sodium-calcium exchanger (Ncx1) results in the lack of a heartbeat and abnormal myofibrillar organization*. The FASEB Journal, 2001. **15**(7): p. 1209-1211.
85. Bae, W.G., et al., *Enhanced skin adhesive patch with modulus-tunable composite micropillars*. Adv. Healthc. Mater, 2013. **2**(1): p. 109-113.
86. Faraji Rad, Z., P.D. Prewett, and G.J. Davies, *An overview of microneedle applications, materials, and fabrication methods*. Beilstein Journal of Nanotechnology, 2021. **12**: p. 1034-1046.

87. Yu, H., et al., *Fabrication of taper hollow metallic microneedle array for portable drug delivery system*. 2010. 676-679.
88. Faraji Rad, Z., et al., *High-fidelity replication of thermoplastic microneedles with open microfluidic channels*. *Microsyst Nanoeng*, 2017. **3**: p. 17034.
89. Chen, Z., et al., *Rapid fabrication of microneedles using magnetorheological drawing lithography*. *Acta Biomaterialia*, 2018. **65**: p. 283-291.
90. Coffey, J.L. and L.T. Canham, *Nanoporous silicon as a green, high-tech educational tool*. *Nanomaterials*, 2021. **11**(2): p. 553.
91. Indermun, S., et al., *Current advances in the fabrication of microneedles for transdermal delivery*. *J Control Release*, 2014. **185**: p. 130-8.
92. Wilke, N., et al., *Process optimization and characterization of silicon microneedles fabricated by wet etch technology*. *Microelectronics Journal*, 2005. **36**(7): p. 650-656.
93. Zheng, X., et al., *Integration of metal-organic framework with a photoactive porous-organic polymer for interface enhanced phototherapy*. *Biomaterials*, 2020. **235**: p. 119792.
94. Pere, C.P.P., et al., *3D printed microneedles for insulin skin delivery*. *International journal of pharmaceutics*, 2018. **544**(2): p. 425-432.
95. Prausnitz, M.R., *Engineering microneedle patches for vaccination and drug delivery to skin*. *Annual review of chemical and biomolecular engineering*, 2017. **8**: p. 177-200.
96. Lee, J.W., J.-H. Park, and M.R. Prausnitz, *Dissolving microneedles for transdermal drug delivery*. *Biomaterials*, 2008. **29**(13): p. 2113-2124.
97. Niedzwiecki, M.M., et al., *Human suction blister fluid composition determined using high-resolution metabolomics*. *Analytical chemistry*, 2018. **90**(6): p. 3786-3792.
98. Primorac, D., et al., *Knee osteoarthritis: a review of pathogenesis and state-of-the-art non-operative therapeutic considerations*. *Genes*, 2020. **11**(8): p. 854.
99. Jiang, Y., et al., *Organic radical-linked covalent triazine framework with paramagnetic behavior*. *ACS nano*, 2019. **13**(5): p. 5251-5258.
100. Badylak, S., et al., *Morphologic Study of Small Intestinal Submucosa as a Body Wall Repair Device*. *Journal of Surgical Research*, 2002. **103**(2): p. 190-202.
101. Hympanová, L., et al., *Assessment of Electrospun and Ultra-lightweight Polypropylene Meshes in the Sheep Model for Vaginal Surgery*. *European Urology Focus*, 2020. **6**(1): p. 190-198.
102. Morales, D.E., et al., *Estrogen Promotes Angiogenic Activity in Human Umbilical Vein Endothelial Cells In Vitro and in a Murine Model*. *Circulation*, 1995. **91**(3): p. 755-763.
103. Concina, P., et al., *The Mitogenic Effect of 17 $\beta$ -Estradiol on in vitro Endothelial Cell Proliferation and on in vivo Reendothelialization Are Both Dependent on Vascular Endothelial Growth Factor*. *Journal of Vascular Research*, 2000. **37**(3): p. 202-208.
104. Rubanyi, G.M., A. Johns, and K. Kauser, *Effect of estrogen on endothelial function and angiogenesis*. *Vascular Pharmacology*, 2002. **38**(2): p. 89-98.



105. Nicosia, R.F. and A. Ottinetti, *Growth of microvessels in serum-free matrix culture of rat aorta. A quantitative assay of angiogenesis in vitro.* Lab Invest, 1990. **63**(1): p. 115-22.
106. Losordo, D.W. and J.M. Isner, *Estrogen and Angiogenesis.* Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology, 2001. **21**(1): p. 6-12.
107. Li, J., et al., *Abstract 15406: Loss of Estrogen Receptor  $\alpha$  Inhibits Angiogenic Function in Right Ventricular Endothelial Cells (RVECs).* Circulation, 2023. **148**(Suppl\_1): p. A15406-A15406.
108. Caliceti, C., et al., *17 $\beta$ -estradiol enhances signalling mediated by VEGF-A-delta-like ligand 4-notch1 axis in human endothelial cells.* PLoS One, 2013. **8**(8): p. e71440.
109. Copello, G.J., et al., *TEOS as an improved alternative for chitosan beads cross-linking: A comparative adsorption study.* Journal of Applied Polymer Science, 2014. **131**(21).
110. Rodríguez-Rodríguez, R., et al., *Composite hydrogels based on gelatin, chitosan and polyvinyl alcohol to biomedical applications: a review.* International Journal of Polymeric Materials and Polymeric Biomaterials, 2020. **69**(1): p. 1-20.
111. Cerqueira, G.R.C., et al., *Development of PVA/chitosan Nanofibers by a Green Route Using Solution Blow Spinning.* Journal of Polymers and the Environment, 2024. **32**(3): p. 1489-1499.
112. Dziejczak, I. and A. Kertmen, *Methods of chitosan identification: history and trends.* Lett. Appl. NanoBioSci, 2023. **12**: p. 94.
113. Koosha, M. and S. Hamed, *Intelligent Chitosan/PVA nanocomposite films containing black carrot anthocyanin and bentonite nanoclays with improved mechanical, thermal and antibacterial properties.* Progress in Organic Coatings, 2019. **127**: p. 338-347.
114. Keong, L.C. and A.S. Halim, *In Vitro Models in Biocompatibility Assessment for Biomedical-Grade Chitosan Derivatives in Wound Management.* International Journal of Molecular Sciences, 2009. **10**(3): p. 1300-1313.
115. de Souza Costa-Júnior, E., M.M. Pereira, and H.S. Mansur, *Properties and biocompatibility of chitosan films modified by blending with PVA and chemically crosslinked.* Journal of Materials Science: Materials in Medicine, 2009. **20**(2): p. 553-561.
116. de Faria, C.M., et al., *Cytotoxicity of PEG-Coated Gold and Gold-Iron Alloy Nanoparticles: ROS or Ferroptosis?* Nanomaterials, 2023. **13**(23): p. 3044.
117. Ramires, P.A. and E. Milella, *Journal of Materials Science: Materials in Medicine*, 2002. **13**(1): p. 119-123.
118. Larrañeta, E., et al., *A proposed model membrane and test method for microneedle insertion studies.* Int J Pharm, 2014. **472**(1-2): p. 65-73.
119. Gupta, S., et al., *Composition dependent structural modulations in transparent poly(vinyl alcohol) hydrogels.* Colloids and surfaces. B, Biointerfaces, 2009. **74**: p. 186-90.
120. Wan, Y., et al., *Thermophysical properties of polycaprolactone/chitosan blend membranes.* Thermochimica Acta, 2009. **487**(1): p. 33-38.
121. Abdella, S., et al., *Mucoadhesive Buccal Film of Estradiol for Hormonal Replacement Therapy: Development and In-Vivo Performance Prediction.* Pharmaceutics, 2022. **14**(3).

122. Yu, Q., et al., *Preparation and properties of chitosan derivative/poly(vinyl alcohol) blend film crosslinked with glutaraldehyde*. Carbohydrate Polymers, 2011. **84**(1): p. 465-470.
123. Auerbach, R., et al., *Angiogenesis Assays: Problems and Pitfalls*. Cancer and Metastasis Reviews, 2000. **19**(1): p. 167-172.
124. Ribatti, D., *Chapter 5 Chick Embryo Chorioallantoic Membrane as a Useful Tool to Study Angiogenesis*, in *International Review of Cell and Molecular Biology*. 2008, Academic Press. p. 181-224.
125. Wu, Y., et al., *Rapidly dissolving bilayer microneedles enabling minimally invasive and efficient protein delivery to the posterior segment of the eye*. Drug Deliv Transl Res, 2023. **13**(8): p. 2142-2158.
126. Mangir, N., et al., *Oestradiol-releasing Biodegradable Mesh Stimulates Collagen Production and Angiogenesis: An Approach to Improving Biomaterial Integration in Pelvic Floor Repair*. European Urology Focus, 2019. **5**(2): p. 280-289.
127. Lee, J.M. and Y.J. Kim, *Foreign body granulomas after the use of dermal fillers: pathophysiology, clinical appearance, histologic features, and treatment*. Arch Plast Surg, 2015. **42**(2): p. 232-9.
128. Son, E.D., et al., *Topical Application of 17 $\beta$ -Estradiol Increases Extracellular Matrix Protein Synthesis by Stimulating TGF- $\beta$  Signaling in Aged Human Skin In Vivo*. Journal of Investigative Dermatology, 2005. **124**(6): p. 1149-1161.
129. Barnabas, O., H. Wang, and X.M. Gao, *Role of estrogen in angiogenesis in cardiovascular diseases*. J Geriatr Cardiol, 2013. **10**(4): p. 377-82.
130. Darby, I.A., et al., *Fibroblasts and myofibroblasts in wound healing*. Clin Cosmet Investig Dermatol, 2014. **7**: p. 301-11.
131. Farkas, S., et al., *Estradiol and Estrogen-like Alternative Therapies in Use: The Importance of the Selective and Non-Classical Actions*. Biomedicines, 2022. **10**(4).
132. Halime, S., *VEZİKOVAJİNAL FİSTÜL ONARIMI İÇİN PRO ANJİOGENİK/ANTİBAKTERİYEL DOKU İNTERPOZİSYON FLEP EŞLENİĞİNİN TASARIMI VE GELİŞTİRİLMESİ*, in *Biyomühendislik*. 2023, Hacettepe Üniversitesi
133. Chang, W.Y., et al., *Neonatal estrogen stimulates proliferation of periductal fibroblasts and alters the extracellular matrix composition in the rat prostate*. Endocrinology, 1999. **140**(1): p. 405-15.
134. Mariotti, A.J., *Estrogen and extracellular matrix influence human gingival fibroblast proliferation and protein production*. J Periodontol, 2005. **76**(8): p. 1391-7.
135. Faltas, C.L., K.A. LeBron, and M.K. Holz, *Unconventional Estrogen Signaling in Health and Disease*. Endocrinology, 2020. **161**(4).
136. Carnicer-Lombarte, A., et al., *Foreign Body Reaction to Implanted Biomaterials and Its Impact in Nerve Neuroprosthetics*. Frontiers in Bioengineering and Biotechnology, 2021. **9**.

## EKLER

### EK 1 – Etik Kurul İzin Belgesi



KOBAY DHL A.Ş. YEREL ETİK KURULU BAŞVURU ONAYI		
<b>BAŞVURU BİLGİLERİ</b>	Protokol Numarası	593
	Protokol Adı	Akıllı Tasarım V-Patch ile Vezikovajinal Fistül Onarımı: Laboratuvar'dan Klinik Uygulamaya Geçiş
	Başvuru Tarihi	10.11.2021
	Sorumlu Araştırmacı Adı-Unvanı	Doç. Dr. Naşide Mangır Bolat
	Sorumlu Araştırmacı Çalıştığı Kurum	Hacettepe Üniversitesi
	Yardımcı Araştırmacılar	Prof. Dr. Kezban ULUBAYRAM Doç. Dr. Naciye Dilara ZEYBEK Dr. Öğr. Ü. Merve Güllüoğlu BAYRAM Öğr. Gör. Dr. Şükrü ÖZTÜRK
<b>KARAR BİLGİLERİ</b>	Onay Numarası	593
	Onay Tarihi	30.11.2021
	Onaylanan Hayvan Türü ve Sayısı	54 Adet Dişi, CD1 fare
	Onay Bilgileri	Proje amaç, gereke, yaklaşım ve yöntem yönünden incelenmiş, çalışmanın gerçekleştirilmesinde etik sakınca bulunmadığına karar verilmiştir.
<b>KOBAY DHL A.Ş. YEREL ETİK KURUL ÜYELERİ</b>	Etik Kurul Başkanı A.Begüm BUĞDAYCI AÇIKKOL	-
	Etik Kurul Başkan Yardımcısı Prof. Dr. Güneş ESENDAĞLI	e- imzalı
	Etik Kurul Üyesi Prof. Dr. Belma GÜMÜŞEL	e- imzalı
	Etik Kurul Üyesi Doç. Dr. M. Kürşat DERİCİ	e- imzalı
	Sorumlu Veteriner Hekim Orkun TARKUN	e- imzalı
	Etik Kurul Üyesi Veteriner Hekim Enes Arda ARSLAN	e- imzalı
	Etik Kurul Üyesi Biyolog Fatma Nur İNÇEH	e- imzalı
	Etik Kurul Üyesi Veteriner Hekim Murat Okan HATİPOĞLU	e- imzalı
	Etik Kurul Üyesi Biyolog Canan ÇAKIR ÇOBAN	e- imzalı
	Etik Kurul Üyesi Zeynep AYDIN TARAĞCI	e- imzalı
	Etik Kurul Üyesi Adil KIŞ	e- imzalı
	Etik Kurul Üyesi Uzman Dığdem YÖYEN ERMİŞ	e- imzalı
	Etik Kurul Üyesi Ali VAROL	e- imzalı

Etikimza Süreç No : 722751unmuc348b50b50 Bu belge, güvenli elektronik imza ile imzalanmıştır

Kobay Deney Hayvanları Laboratuvarı Sanayi ve Ticaret A.Ş.  
Merkez Ofis : Uzun Çay Gaddesi, 1308. Sokak No:6 (Ödül Teknokent) Yenimahalle - Ankara  
Şube Ofis : İ.O.S.B 21.Gadde 520.Sokak No:2/2 Yenimahalle - Ankara  
Telefon : 0 (312) 394 70 94 | Faks : 0(312) 995 06 94  
www.kobay.com.tr - [bilgi@kobay.com.tr](mailto:bilgi@kobay.com.tr)