

**NANO/MİKRO YAPILI ÇOK BİLEŞENLİ VE SIRALI
İLAÇ SALIM SİSTEMLERİNİN DİYABETİK
YARALARDAKİ ETKİSİNİN İNCELENMESİ**

**INVESTIGATION OF THE EFFECT OF NANO / MICRO
STRUCTURED MULTICOMPONENT AND SEQUENTIAL
DRUG DELIVERY SYSTEMS ON DIABETIC WOUNDS.**

HÜRMET KINALI

PROF. DR İBRAHİM VARGEL

Tez Danışmanı

PROF.DR. NİHAL AYDOĞAN

Eş Danışmanı

Hacettepe Üniversitesi
Lisansüstü Eğitim-Öğretim ve Sınav Yönetmeliğinin
Biyomühendis Anabilim Dalı için Öngördüğü
YÜKSEK LİSANS TEZİ olarak hazırlanmıştır.

2023

İthaf Sayfası

Anne ve Babam'a

ÖZET

NANO/MİKRO YAPILI ÇOK BİLEŞENLİ VE SIRALI İLAÇ SALIM SİSTEMLERİNİN DİYABETİK YARALARDAKİ ETKİSİNİN İNCELENMESİ

Hürmet Kınalı

Yüksek Lisans, Biyomühendislik Bölümü

Tez Danışmanı: Prof. Dr. İbrahim VARGEL

Eş Danışman: Prof.Dr. Nihal AYDOĞAN

Ocak 2023, 185 sayfa

Sağlık alanında birçok araştırmacı tarafından sorgulanan, henüz tam tedavisi yapılamayan, özellikle metabolik sorun/diyabetli hastaların kronik yaraları zorlu klinik sorunlardandır. Diyabetik hastalarda gelişen damar sorunları iskeminin temel nedenidir. Öte yandan diyabetik hastalarda hücresel ve humoral yanıtta yetersizlikler ve bozuluklar gelişmektedir. Bu nedenlerden dolayı yara iyileşmesini sağlayan büyüme faktörlerinin seviyeleri azalmakta veya etkin aktivitelerini kaybetmektedirler. Azalan hücresel ve humoral seviye ve de bunlara eklenen vaskulopatiye bağlı kanlanma sorunları nedeniyle diyabetik hastalarda kronik yara iyileşme sorunları gelişmektedir. Vasküler endotelial büyüme faktörü (VEGF) (MA 45 kDa), yara iyileşmesi sırasında damarlanmayı uyaran ve böylece iyileşmeyi hızlandıran en güçlü anjiyojenik büyüme faktörüdür. Granülosit makrofaj stimüle edici faktör (GM-CSF) (MA 14 kDa)'nın hücre proliferasyonunu uyardığı ve yara iyileşmesini hızlandırdığı bilinmektedir. VEGF ve GM-CSF düzeylerinin yara bölgesinde kontrollü bir şekilde varlığının sağlanması ya da dolaylı olarak verilmesi yara iyileşmesinde olumlu biyolojik etki sağlayacaktır. Bu çalışmanın amacı diyabetik yaralarda biyolojik pansuman malzemesi olarak VEGF ve GM-CSF ile yüklü PCL tabanlı polimerik partiküllerden veya polimer lipid hibrit partiküllerden oluşan malzeme geliştirmektir. İlk aşamada anjiyojenik ve hücresel yanıtı uyaran faktörleri

içeren sıcaklığa duyarlı, enjekte edilebilir, pluronik F127 bazlı bir hidrojel geliştirilmiştir. Bu hidrojel, streptozotosin ile diyabetik hale getirilmiş Spraque Dawley sıçanların sırtında oluşturulan yaraları iyileştirme yeteneklerini değerlendirilmiştir. Tez çalışma kapsamında çift emülsiyon çözücü buharlaştırma yöntemi kullanılarak PCL tabanlı polimerik partiküller ve polimer-lipit hibrit partiküller (200-1000 nm) hazırlandı. Partiküller, LS, AFM ve SEM ile karakterize edilerek boyutu ve boyut dağılımı, morfolojileri değerlendirildi. Polimerik ve hibrit partiküllerin in vitro alım/salım yeteneklerinin değerlendirilmesi amacıyla model protein olarak sığır serum albümin (BSA, MA 60 kDa) ve Lizozim (MA 14 kDa) kullanıldı. Çalışmalar sonucunda polimer-lipit hibrit partiküllerin proteinleri tekli ve/veya ikili olarak yüksek oranda kapsüllenebildikleri ve proteinleri molekül ağırlıklarına göre 21 gün boyunca kontrollü salımlarını gerçekleştirebildikleri görüldü. Daha sonra hibrit partiküller yara bölgesine topikal olarak uygulanabilmesi amacıyla sıcaklığa duyarlı enjekte edilebilir pluronik F127 hidrojele dahil edildi. Sıcaklığa duyarlı hidrojinin jelleşme sıcaklığı ve reolojik özellikleri değerlendirildi. Sonuçlar pluronik F127 jelinin ortam sıcaklığının +4 °C 'de akışkan bir halde iken 37°C'ye (vücut sıcaklığı) çıktığında viskozitenin artmasıyla jel haline geldiği gözlemlendi. Hidrojinin in vitro salım çalışmaları ile de model protein yüklü hibrit partiküllerin istenmeyen patlama salımlarını en aza indirdiği ve kontrollü salımlarını gerçekleştirdiği elde edilen sonuçlar ile gözlemlendi Çalışma kapsamında yara bölgesine özgü olarak tasarlanan VEGF/GM-CSF yüklü polimer-lipit hibrit partikülleri içeren hidrojinin diyabetik sıçanların sırtında oluşturulan 2 cm çaplı yaraların iyileşmesindeki etkisi ön çalışma olarak 10 gün boyunca izlenmiş ve süre bitiminde yaralar histomorfik olarak incelenmiştir.

Bu tez çalışmasında literatürde ilk defa yer alacak VEGF ve GM-CSF 'kombinasyonu ile birlikte çok bileşenli sıralı salım gerçekleştirebilen ve yara iyileşmesinin farklı fazlarında etkin rol oynayan bir taşıyıcı sistem tasarlanmış ve kullanılmıştır. Bu sistem iki etken maddeyi kapsülleyerek ve jel sayesinde topikal olarak uygulanabilecek özellik kazandırılmış ve kontrollü salımlarıyla diyabetik sıçanlarda inflamasyonunu artırarak peşinden anjiyogenezi teşvik ederek iyileşmesi zor olan yaraların daha hızlı bir şekilde iyileşip/iyileşmediği sorgulanmıştır.

Anahtar Kelimeler: Nanopartiküller, Hidrojel, Protein taşınımı, Sürfaktan, VEGF, GM-CSF, Karakterizasyon, Yara İyileştirme

ABSTRACT

INVESTIGATION OF THE EFFECT OF NANO / MICRO STRUCTURED MULTICOMPONENT AND SEQUENTIAL DRUG DELIVERY SYSTEMS ON DIABETIC WOUNDS.

Hürmet KINALI

Master of Science, Bioengineering

Supervisor: Prof. Dr. İbrahim VARGEL

Co- Supervisor: Prof.Dr.Nihal AYDOĞAN

January 2023, 185 pages

Chronic wounds of patients with metabolic problems/diabetes, which are questioned by many researchers in the field of health and which have not yet been completely cured, are one of the challenging clinical problems. Vascular problems that develop in diabetic patients are the main cause of ischemia. On the other hand, deficiencies and impairments in cellular and humoral response develop in diabetic patients. For these reasons, the levels of growth factors that promote wound healing decrease or they lose their effective activity. Chronic wound healing problems develop in diabetic patients due to decreased cellular and humoral levels and blood supply problems due to vasculopathy added to them. Vascular endothelial growth factor (VEGF) (MA 45 kDa) is the most powerful angiogenic growth factor that stimulates vascularity during wound healing and thus accelerates healing. Granulocyte macrophage stimulating factor (GM-CSF) (MA 14 kDa) is known to stimulate cell proliferation and accelerate wound healing. Ensuring the presence of VEGF and GM-CSF levels in the wound area in a controlled manner or giving them indirectly will provide a positive biological effect on wound healing. The aim of this study is to develop a material consisting of PCL-based polymeric particles or polymer lipid hybrid particles loaded with VEGF and GM-CSF as biological dressing material in diabetic wounds. In the first stage, a temperature-sensitive, injectable, pluronic F127-based hydrogel containing angiogenic and cellular response-stimulating factors has been developed. The ability of these hydrogel, streptozotocin-induced diabetic Spraque

Dawley rats to heal wounds created on the back was evaluated. Within the scope of the thesis, PCL-based polymeric particles and polymer-lipid hybrid particles (200-1000 nm) were prepared using the double emulsion solvent evaporation method. The particles were characterized by LS, AFM and SEM, and their size, size distribution and morphology were evaluated. In order to evaluate the in vitro uptake/release capabilities of polymeric and hybrid particles, bovine serum albumin (BSA, MA 60 kDa) and Lysozyme (MA 14 kDa) were used as model proteins. In the last of the studies, it was seen that polymer-lipid hybrid particles can be highly encapsulated proteins singly and/or bilaterally and that they can perform controlled releases of proteins according to their molecular weight for 21 days. The hybrid particles were then incorporated into the temperature-sensitive injectable Pluronic F127 hydrogel for topical application to the wound area. The rheological properties of the temperature-sensitive hydrogel were evaluated by determining the gelation temperature. Results showed that when the ambient temperature of the pluronic F127 gel was in a fluid state at +4 °C, it became a gel with an increase in viscosity when it increased to 37 °C (body temperature). With the in vitro release studies of the hydrogel, it was observed with the results obtained that the model protein-loaded hybrid particles minimized the undesired burst releases and performed the controlled releases. Within the scope of the study, the effect of the hydrogel containing VEGF/GM-CSF loaded polymer-lipid hybrid particles designed specifically for the wound area on the healing of 2 cm diameter wounds on the back of diabetic rats was monitored for 10 days as a preliminary study, and the wounds were examined histomorphically at the end of the period

In this thesis, a carrier system that can perform multi-component sequential release and plays an active role in different phases of wound healing with the combination of VEGF and GM-CSF, which will take place for the first time in the literature, was designed and used. By encapsulating two active ingredients and by encapsulating the two active ingredients, this system has been made to be applied topically, and it has been questioned whether difficult-to-heal wounds heal faster by increasing inflammation in diabetic rats with controlled releases and then promoting angiogenesis.

Keywords: Nanoparticles, Hydrogel, Protein Delivery, Surfactant, VEGF, GM-CSF, Characterization, Wound Healing

TEŞEKKÜR

Yüksek lisans eğitimi boyunca geçen zaman, hayatımdaki en unutulmaz deneyimdir. Bu süre zarfında bana yardımcı olan herkese minnettarım.

Çalışmalarım süresince bilgi birikiminden yararlandığım, saygıdeğer hocam ve danışmanım Prof.Dr. İbrahim VARGEL'a teşekkür ederim. Desteğini hiçbir zaman esirgemeyen, bilgi birikimden ve tecrübelerinden her aşamada yararlandığım, ilhamını benden esirgemeyen, güler yüzü, hoşgörüsü ve içtenliği ile beni her zaman destekleyen saygıdeğer hocam ve eş danışmanım Prof.Dr Nihal AYDOĞAN' a sonsuz teşekkürlerimi iletiyorum. Beni bilimin güzelliğini keşfettirmesiyle her konuda elimden tutup beni yüreklendirdi. Odasının kapısı her zaman açıktı, bu tez çalışması onun sürekli rehberliği ve sabrı olmadan mümkün olamazdı.

Çalışma boyunca her an başım sıkıştığında, her ihtiyacım olduğunda tecrübeleri ile bana yardımcı olan güler yüzünü ve hoşgörüsü esirgemeyen hocam Dr.Öğr.Üyesi Gökçe Dicle Kalyacıoğlu'na çok minnettarım.

İçerisinde bulunmaktan mutluluk duyduğum, karşılaştığım zorluklarda yanımda olarak beni destekleyen, bana gösterdikleri güler yüz, samimiyetlerini esirgemeyen ve dobarlan bırakma kendini mottosuyla çalışmalara motive olduğumuz Aydoğan Araştırma grubu üyeleri ve çalışma arkadaşlarım Burcu, Büşra, Emin, Emine, Naz ve Güşta'ya çok teşekkür ederim.

Evlatları olmaktan her zaman gurur ve mutluluk duyduğum, kendimi her fırsatta şanslı hissetmeme neden olan yüksek lisans eğitimim boyuna gösterdikleri fedakârlık, anlayış, güler yüz ve sabır ile her an yanımda ve bana destek olduklarını emin olduğum değerli varlıklarım anneme, babama ve kardeşlerime çok çok teşekkür ederim.

Hürmet Kınalı

İÇİNDEKİLER

ÖZET.....	i
ABSTRACT.....	iii
TEŞEKKÜR.....	v
İÇİNDEKİLER.....	vi
ÇİZELGELER DİZİNİ.....	x
ŞEKİLLER DİZİNİ.....	xi
SİMGELER VE KISALTMALAR.....	xvi
1 GİRİŞ.....	1
2 GENEL BİLGİLER.....	4
2.1 Deri.....	4
2.1.1 Epidermis.....	4
2.1.2 Dermis.....	7
2.2 Yara ve Yara iyileşmesi.....	7
2.2.1 Yara.....	7
2.2.2 Yara Tipleri.....	7
2.2.3 Yara iyileşme tipleri.....	8
2.3 Yara İyileşmesinde Görev Alan Yapılar.....	10
2.3.1 Hücreler.....	10
2.4 Yara iyileşme basamakları.....	12
2.4.1 Hemostaz.....	12
2.4.2 İnflamasyon.....	12
2.4.3 Proliferasyon.....	13
2.4.4 Yeniden Şekillenme (Remodelling).....	14
2.5 Yara İyileşmesinde Kullanılan Tedavi Yöntemleri.....	14
2.6 Büyüme Faktörleri ve Sitokinler.....	15

2.6.1	Büyüme Faktörleri ve Sitokinlerin Yara İyileşmesindeki Rolü	15
2.6.2	Vasküler Endotelyal Büyüme Faktörü	17
2.6.3	Granülosit Makrofaj Koloni Uyarıcı Faktör	22
2.7	Büyüme Faktörü Dağıtım Sistemleri	29
2.7.1	Partiküler Sistemler	29
2.7.2	Mikropartiküller	29
2.7.3	Nanopartiküller	31
2.8	Büyüme Faktörü Taşınımı için Sentetik Polimerler.....	40
2.8.1	Poli (laktit-ko-glikolid) (PLGA).....	41
2.8.2	Poli-ε-kaprolakton (PCL)	41
2.9	Hidrojeller	42
2.10	Diyabet	47
2.10.1	Tip 1 Diyabet	47
2.10.2	Tip 2 Diyabet	48
2.10.3	Diyabet ve Yara İyileşmesi.....	49
3	DENEYSEL ÇALIŞMALAR	51
3.1	Kimyasal Malzemeler	51
3.2	Protein Taşıyıcı Sistemlerin Hazırlanması.....	51
3.2.1	Polimerik Partiküllerin Hazırlanması	52
3.2.2	PCL/Lesitin Monolit Partiküllerin Hazırlanması	53
	hLipit-Polimer Hibrit Partiküllerin Hazırlanması	54
3.3	Sıcaklığa Duyarlı Enjektelerde Edilebilir Hidrojellerin Hazırlanması.....	58
3.4	Partikül Karakterizasyonu	59
3.4.1	Dinamik Işık Saçılımı (DLS) Tekniği	59
3.4.2	Zeta Potansiyeli Ölçümü	60
3.4.3	Atomik Kuvvet Mikroskobu (AFM)	61
3.4.4	Taramalı Elektron Mikroskobu (SEM)	62
3.4.5	Diferansiyel Taramalı Kalorimetre (DSC)	62
3.4.6	Fourier Dönüşümü Kızılötesi Spektroskopisi (FTIR)	63
3.5	Nanopartiküllerin Kapsülleme Verimliliği (EE)	63

3.6	BSA ve/veya Lizozim İn Vitro Salım Davranışı	64
3.7	Sodyum Dodesil Sülfat Poliakrilamid Jelde Elektroforezi (SDS-PAGE).....	65
3.8	Sıcaklığa Duyarlı Hidrojel Karakterizasyonu.....	66
3.8.1	Sıcaklığa Duyarlı Hidrojelin Jelleşme Sıcaklığının Belirlenmesi	66
3.8.2	Sıcaklığa Duyarlı Hidrojelin Reolojik Değerlendirmesi.....	66
3.8.3	Sıcaklığa Duyarlı Hidrojelin Tükenme Hızının Belirlenmesi	67
3.8.4	Sıcaklığa Duyarlı Hidrojelin İn vitro Salım Davranışı	67
3.9	İN Vivo Çalışmalar.....	69
3.9.1	Sıçanların Diyabetik Hale Getirilmesi ve Yara Oluşturma.....	69
3.9.2	Diyabetik Hale Getirilen Sıçanlara Yara Modeli Oluşturma.....	70
3.9.3	Yara Bölgesinin Makroskopik Olarak Değerlendirilmesi	71
3.9.4	Histomorfometri.....	73
4	SONUÇLAR ve TARTIŞMA.....	75
4.1	PCL Partiküllerin Hazırlanması.....	76
4.2	PCL Partikülleri Karakterizasyonu.....	77
4.2.1	Polimerik Partiküllerin Karakterizasyonu.....	77
4.2.2	PCL/Lesitin Monolit Partiküllerin Hazırlanması ve Karakterizasyonu.....	81
4.2.3	PCL/Lesitin/Geleol Hibrit Partiküllerin Hazırlanması ve Karakterizasyonu.....	85
4.3	Partiküllerin Alım-Salım Çalışmaları.....	92
4.3.1	PCL partiküllerin Alım-Salım Çalışmaları	93
4.3.2	PCL/Lesitin Partiküllerin Alım-Salım Çalışmaları.....	93
4.3.3	PCL/Lesitin/Geleol Hibrit Partiküllerin Alım-Salım Çalışmaları	99
4.3.4	PCL/Lesitin/Geleol Hibrit Partiküllerin DSC Analizi	103
4.4	Sıcaklığa Duyarlı Hidrojel Sisteminin Hazırlanması ve Karakterizasyonu ...	105
4.5	BSA/Lizozim yüklü PCL/Lesitin/Geleol Hibrit Partiküllerin Hazırlanması ve Karakterizasyonu	119
4.5.1	BSA/Lizozim Yüklü PCL/Lesitin/Geleol Hibrit Partiküllerin Alım Salım Çalışmaları	123
4.6	İN vivo Çalışmalar	129
4.6.1	Sıçanların Diyabetik Hale Getirilmesi ve Yara Oluşturma.....	129

4.6.2	Yara Bölgesinin Makroskopik Olarak Değerlendirilmesi	138
4.6.3	Histomorfometri	150
5	YORUM	154
6	KAYNAKLAR.....	158
7	EKLER	181
7.1	EK-1 Kalibrasyon Doğruları	181
7.1.1	EK-1.a. Sığır Serum Albumin'nin Biüret ile Kalibrasyon Doğrusu	181
7.1.2	EK-1.b. BSA Bradford ile Kalibrasyon Doğrusu.....	181
7.1.3	EK-1.c. BSA 280 nm Dalga Boyunda Kalibrasyon Doğrusu	182
7.1.4	EK-1.d. Lizozim Kalibrasyon Doğrusu.....	182
7.2	EK-2 Tez Çalışması Etik Kurul İzni	183
7.3	EK-3 Tez Çalışmasının Orijinallik Raporu.....	183
8	Özgeçmiş	183

ÇİZELGELER DİZİNİ

Çizelge 2-1 VEGF'in çeşitli hastalıklarda damarlanma etkisinin gösterildiği ilgili çalışmalar	20
Çizelge 2-2 GM-CSF'in kontrollü salımını sağlamak amacıyla tasarlanan sistemler	24
Çizelge 3-1 Partikül Hazırlama Kullanılan Parametreler	58
Çizelge 3-2 Histolojik kesitlerin inflamasyon, neovaskülarizasyon ve fibrozis açısından skor dereceleri ve kriterleri	74
Çizelge 4-1 %25 (w/v) Pluronik F127 hidrojelini, BSA yüklü hibrit partikül yüklü jelin ve Lizozim yüklü hibrit partikül yüklü jelin Jelleşme sıcaklığı (Tg) ve Viskozitesi .	110
Çizelge 4-2 Partiküllerin Boyutlarındaki Değişimler	122
Çizelge 4-3 BSA/Lizozim yüklü polimer-lipit hibrit partiküllerin SDS-PAGE bantlarının yüzdelikleri ve protein derişimleri (0; Süpernatant, 1; 30.dk, 2; 60 dk, 3; 6h, 4; 24h, 5; 48h, 8; 7.gün, 9; 8.gün, S1; 11.gün, S2; 14.gün, S3; 15.gün, S4; 16.gün, S5;21.gün)	127
Çizelge 4-4 PCL/Lesitin/Geleol Polimer Lipit Hibrit Partiküllerin Boyut Dağılımları ve kapsüllenme verimlerindeki değişimler	128
Çizelge 4-5 0.ve 3.günde ratların ağırlıkları ve açlık kan şekerleri	132
Çizelge 4-6 7.gün ve 14.günde ratların ağırlıkları ve açlık kan şekerleri	133
Çizelge 4-7 21.gün ve 28.günde ratların ağırlıkları ve açlık kan şekerleri	133
Çizelge 4-8 30.günde ratların ağırlıkları ve açlık kan şekerleri	134
Çizelge 4-9 Yara iyileşmesinin 4. ve 10.gününde şeker düzeyleri	138
Çizelge 4-10 10 günde sonlandırılan deney gruplarına ait % yara alanı değerleri	139
Çizelge 4-11 Yara gruplarının ilk gün 2. ve 4.gündeki yara iyileşmesi.....	141
Çizelge 4-12 Yara gruplarının 6.gün 8. ve 10.gündeki yara iyileşmesi.....	142

ŞEKİLLER DİZİNİ

Şekil 2-1 Derinin Yapısı [19]	5
Şekil 2-2 Yara İyileşme Tipleri [25].....	9
Şekil 2-3 Yara İyileşme Aşamaları ve Hücreleri [3] [33] [34].....	12
Şekil 2-4 Yara iyileşme fazlarının şematik gösterimi [46].....	14
Şekil 2-5 Mikrokapsül ve Mikroküre Şematik Gösterimi	30
Şekil 2-6 Nanoküre ve Nanokapsül Şematik Gösterimi [101] [114].....	32
Şekil 2-7 Lipit-Polimer hibrit partiküllerin sentezlerinin şematik gösterimi a) İki aşamalı Sentez Yöntemi b) Tek aşamalı Sentez Yöntemi	40
Şekil 2-8 Hidrojel Oluşumunun Şematik Gösterimi [160].....	44
Şekil 3-1 Polimerik Partiküllerin Hazırlanma Prosedürünün Şematik Gösterimi	53
Şekil 3-2 PCL/Lesitin Partiküllerin Hazırlanma Prosedürünün Şematik Gösterimi	54
Şekil 3-3 Polimer/Lesitin/Geleol polimer-lipit hibrit partiküllerin hazırlanma prosedürünün şematik gösterimi.....	55
Şekil 3-4 Pluronik Jelin Hazırlanma Prosedürün şematik Gösterimi	59
Şekil 3-5 Dinamik ışık saçılımı ölçümlerinin blok şeması [185]	60
Şekil 3-6 AFM'nin Çalışma Prensipleri Şematik Gösterimi	61
Şekil 3-7 Bsa ve/veya Lizozim İn Vitro Salım Çalışmasının Şematik Gösterimi.....	65
Şekil 3-8 SDS-PAGE yönteminin şematik gösterimi.....	66
Şekil 3-9 Lizozim'in jel içerisinde ve %25 (w/v) pluronik F127 jel içinde polimer-lipit hibrit partiküllerden salımın Franz difüzyon hücre yönteminin şematik gösterimi..	68
Şekil 3-10 BSA'nın jel içerisinde ve %25 (w/v) pluronik F127 jel içinde polimer-lipit hibrit partiküllerden salımın membransız yöntemin şematik gösterimi	69
Şekil 3-11 Anestezi altındaki sıçan	70
Şekil 3-12 Anestezi altındaki ratın sırt kısmının traş edilmesi	71
Şekil 3-13 Yara bölgesine Taşıyıcı Sistemin Verilmesinin Şematik Gösterimi.....	72
Şekil 4-1 PCL partiküllerin AFM görüntüsü	78
Şekil 4-2 PCL partiküllerin dinamik ışık saçılımı görüntüsü	78
Şekil 4-3 BSA yüklü PCL partiküllerin SEM görüntüsü	79
Şekil 4-4 BSA yüklü PCL partiküllerin dinamik ışık saçılımı görüntüsü	79
Şekil 4-5 Lizozim yüklü PCL partiküllerin AFM görüntüsü	80

Şekil 4-6 Lizozim yüklü PCL partiküllerin dinamik ışık saçılımı görüntüsü	80
Şekil 4-7 100 mg Lesitin içeren PCL partiküllerin AFM görüntüsü	82
Şekil 4-8 100 mg Lesitin içeren PCL partiküllerin DLS ile elde edilen boyut dağılımları	82
Şekil 4-9 200 mg Lesitin içeren PCL partiküllerin AFM görüntüsü	83
Şekil 4-10 200 mg Lesitin içeren PCL partiküllerin DLS ile elde edilen boyut dağılımları	83
Şekil 4-11 500 mg Lesitin içeren PCL partiküllerin AFM görüntüsü	84
Şekil 4-12 500 mg Lesitin içeren PCL partiküllerin DLS ile elde edilen boyut dağılımları	84
Şekil 4-13 PCL/Lesitin/Geleol Hibrit partiküllerin SEM görüntüsü	86
Şekil 4-14 PCL/Lesitin/ Geleol Hibrit partiküllerin AFM görüntüsü	87
Şekil 4-15 PCL/Lesitin/Geleol Hibrit Partiküllerin DLS ile elde edilen boyut dağılımları	87
Şekil 4-16 BSA yüklü PCL/Lesitin/ Geleol Hibrit partiküllerin SEM görüntüsü	88
Şekil 4-17 BSA yüklü PCL/Lesitin/ Geleol Hibrit partiküllerin AFM görüntüsü	89
Şekil 4-18 BSA yüklü PCL/Lesitin/Geleol Hibrit Partiküllerin DLS ile elde edilen boyut dağılımları	89
Şekil 4-19 Lizozim yüklü PCL/Lesitin/ Geleol Hibrit partiküllerin SEM görüntüsü	90
Şekil 4-20 Lizozim yüklü PCL/Lesitin/ Geleol Hibrit partiküllerin AFM görüntüsü	91
Şekil 4-21 Lizozim yüklü PCL/Lesitin/ Geleol Hibrit partiküllerin DLS ile elde edilen boyut dağılımları	91
Şekil 4-22 Pluronik F127 280 nm dalga boyundaki absorbans piki	94
Şekil 4-23 Saf BSA FTIR spektrumu	96
Şekil 4-24 BSA ve Lesitin içermeyen PCL partiküllerin FTIR spektrumu	96
Şekil 4-25 BSA yüklü 100 mg lesitin içeren PCL partiküllerin FTIR spektrumu	97
Şekil 4-26 BSA yüklü 200 mg lesitin içeren PCL partiküllerin FTIR spektrumu	98
Şekil 4-27 BSA yüklü 500 mg lesitin içeren PCL partiküllerin FTIR spektrumu	99
Şekil 4-28 PCL/Lesitin/Geleol lipit-polimer hibrit partikülden Sığır Serum Albumin salımının zamana bağlı değişimi	101
Şekil 4-29 PCL/Lesitin/Geleol lipit-polimer hibrit partikülden Lizozim salımının zamana bağlı değişimi	102

Şekil 4-30 PCL/Lesitin/Geleol lipit-polimer hibrit partikülden BSA 'nın ve Lizozim salımının zamana bağlı değişimi.....	102
Şekil 4-31 Lipit,PCL ve partiküllerin ile elde edilen Termogramları.	104
Şekil 4-32 %25 (w/v) Pluronik F127 Çözeltisi	106
Şekil 4-33 %25 (w/v) pluronik F127 çözeltisinin Jelleşme Durumu	107
Şekil 4-34 Boş Pluronik F127 Jelin sıcaklığa karşı viskozite değişimi.....	107
Şekil 4-35 Pluronik F127 jelin farklı kesme hızındaki viskozite değişimi (5°C – 37 °C)	108
Şekil 4-36 %25 (w/v) Pluronik F127 hidrojel, BSA yüklü hibrit partikül yüklü jelin ve Lizozim yüklü hibrit partikül yüklü jelin sıcaklığa karşı viskozite değerleri	110
Şekil 4-37 %25 (w/v) Pluronik F127 hidrojel, BSA yüklü hibrit partikül yüklü jelin ve Lizozim yüklü hibrit partikül yüklü jelin kesme hızına karşı viskozite değerleri (5°C – 37 °C).....	111
Şekil 4-38 1 ml %25 (w/v) F127 Jelin Zamana Bağlı Ağırlığındaki Değişim.....	112
Şekil 4-39 Lizozim'in jel içerisinde ve %25 (w/v) pluronik F127 Jel içinde polimer-lipit hibrit partiküllerden salımının zamana bağlı değişimi	113
Şekil 4-40 Lizozim'in Hidrojelde (yeşil), Hibrit partiküllerde (kırmızı) ve Hibrit Partikül yüklü Hidrojelden (mavi) zamana bağlı olarak %ilaç salım değişimi.....	114
Şekil 4-41 BSA'nın jel içerisinde (yeşil renkte) ve %25 (w/v) pluronik F127 jel içinde polimer-lipit hibrit partiküllerden (kırmızı renkte) salımının zamana bağlı değişimi	116
Şekil 4-42 BSA'nın Hidrojelde (yeşil), Hibrit partiküllerde (mavi) ve Hibrit Partikül yüklü Hidrojelden (kırmızı) zamana bağlı olarak %ilaç salım değişimi	117
Şekil 4-43 BSA/Lizozim yüklü PCL/Lesitin/ Geleol Hibrit partiküllerin SEM görüntüsü	120
Şekil 4-44 BSA/Lizozim yüklü PCL/Lesitin/ Geleol Hibrit partiküllerin DLS görüntüsü	120
Şekil 4-45 BSA/Lizozim yüklü PCL/Lesitin/ Geleol Hibrit partiküllerin AFM görüntüsü	121
Şekil 4-46 BSA/Lizozim yüklü PCL/Lesitin/ Geleol Hibrit partiküllerin AFM görüntüsü	122
Şekil 4-47 BSA/Lizozim yüklü hibrit partiküllerin süpernatant ve 21.güne kadar salımların SDS-PAGE bantları (L; Moleküler ağırlık belirteci BSA kontrol, 2 µg	

BSA proteini 0; Süpernatant, 1; 30.dk, 2; 60 dk, 3; 6h, 4; 24h, 5; 48h 8; 7.gün, 9; 8.gün, S1; 11.gün, S2; 14.gün, S3;15.gün, S4; 16.gün S5; 21.gün	125
Şekil 4-48 BSA ve Lizozim'in Hibrit partiküllerde (mavi) ve Hibrit Partikül yüklü Hidrojelden (kırmızı) zamana bağlı olarak %ilaç salım değişimi.....	128
Şekil 4-49 Barınma odasında ayrı ayrı kafeslerine alınan sıçanlar	131
Şekil 4-50 Barınma odasında ayrı ayrı kafeslerine alınan sıçanlarda beslenme	131
Şekil 4-51 2 cm ² lik 4 adet dairesel eksizyonel yaranın görüntüsü	135
Şekil 4-52 Gruplandırılan yaralara taşıyıcı sistemlerin enjekte edilmesi A) protein yüklü olmayan boş PCL/Lesitin/Geleol polimer lipit hibrit partiküllerin yüklü jel, B) VEGF ve GM-CSF'nin tek başına bulunduğu jel	136
Şekil 4-53 %25 (w/v) F127 Jelinin vücut içerisinde jelleşmesi C) protein yüklü olmayan boş PCL/Lesitin/Geleol polimer lipit hibrit partiküllerin yüklü jel ve VEGF ve GM-CSF'nin tek başına bulunduğu jelin uygulanması D) VEGF/GM-CSF yüklü PCL/Lesitin/Geleol polimer	137
Şekil 4-54 Yaraların deri parçaları ile kapatılması	137
Şekil 4-55 10 günde sonlandırılan in vivo deney gruplarında farklı jel grublarının yara alanı üzerine etkileri	139
Şekil 4-56 1 numaralı sıçanın A) 0.gün B) 2.gün C) 4.gün D) 6.gün yara iyileşmesi ..	143
Şekil 4-57 1 numaralı sıçanın E) 7.gün F) 8.gün G) 9.gün H) 10.gün yara iyileşmesi.	143
Şekil 4-58 1 numaralı sıçanın 6.günde kanamanın olduğu yara	144
Şekil 4-59 2 numaralı sıçanın A) 0.gün B) 2.gün C) 4.gün D) 6.gün yara iyileşmesi ..	144
Şekil 4-60 2 numaralı sıçanın E) 7.gün F) 8.gün G) 9.gün H) 10.gün yara iyileşmesi.	145
Şekil 4-61 2 numaralı sıçanın 10.günde kanamanın olduğu yara	145
Şekil 4-62 3 numaralı sıçanın A) 0.gün B) 2.gün C) 4.gün D) 6.gün yara iyileşmesi ..	146
Şekil 4-63 3 numaralı sıçan E) 7.gün F) 8.gün G) 9.gün H) 10.gün yara iyileşmesi....	147
Şekil 4-64 6 numaralı sıçan A) 0.gün B) 1.gün yara iyileşmesi	147
Şekil 4-65 7 numaralı sıçan A) 0.gün B) 2.gün C) 4.gün D) 6.gün yara iyileşmesi	148
Şekil 4-66 7 numaralı hayvanın E) 7.gün F) 8.gün G) 9.gün H) 10.gün yara iyileşmesi	149
Şekil 4-67 Dokuların Boyanması, A) Hematoksilen ve eozin (H&E) B) Masson's Trichrome	150
Şekil 4-68 Birinci kolonda (A, D, G, J) yara alanının (parantez) tile scan görüntüleri, ikinci kolonda (B, E, H, K) yara kenarındaki pembe renkli granülasyon dokusu (Gd),	

damarlar (ok işareti) ve üçüncü kolonda (C, F, I, L) komşu retiküler dermisteki (Rd) mavi renkli kollajen fibriller (Kf) izlenmektedir. C ve F’de damarlanmış (ok) granülasyon dokusunun I ve L’de yerini yağ infiltrasyonu (Ad) ve kollajen fibrillerin baskınlığındaki fibrotik dokuya bıraktığına dikkat ediniz. HE: Hematoksilen-Eozin, MT: Masson Trikrom. x100..... 151

Şekil 4-69 Kontrol grubu ile GM-CSF/VEGF yüklü hibrit mikropartikül içeren jel, tek başına GM-CSF/VEGF içeren jel ve boş hibrit partikül içeren jel uygulanan gruplarda inflamasyon (A), neovaskülarizasyon (B) ve fibrozis (C) skorlarına ait ortalama-standart sapma grafikleridir. (*): kontrole göre $p<0.05$, (#): Boş hibrit partikül içeren jel grubuna göre $p<0.05$ 152

Şekil 7-1 Biüret Çözeltisi ile 540 nm dalga boyunda sığır serum albuminin kalibrasyon doğrusu..... 181

Şekil 7-2 Bradford Reaktifi ile 595 nm dalga boyunda sığır serum albuminin kalibrasyon doğrusu..... 181

SİMGELER VE KISALTMALAR

Simgeler

A0	0. günde ölçülen yara alanı (cm ²)
At	t. günde ölçülen yara alanı (cm ²)
EE	Kapsülleme Verimi
KB	Boltzmann Sabiti
M	Molarite
mg	Miligram
nm	Nanometre
T	Sıcaklık
Tg	Jelleşme Sıcaklığı
W/O/W	Su/Yağ/Su Emülsiyonu
w/v	Kütle-Hacim Oranı
η	Ortamın Viskozitesi
μL	Mikrolitre

Kısaltmalar

AFM	Atomik Kuvvet Mikroskopi
DCM	Diklorometan
DLS	Dinamik Işık Saçılımı
DSC	Diferansiyel Taramalı Kalorimetre
ECM	Ekstrasellüler Matriks
FTIR	Fourier Dönüşümü Kızılötesi Spektroskopisi
GF	Büyüme Faktörü
GM-CSF	Granülosit Makrofaj Stimüle Edici Faktör
GMS	Glyceryl Monostearate
LPN	Boş PCL/Lesitin/Geleol polimer lipit partiküller
LPN	Lipit -Polimer Hibrit Partikül
LPNB	BSA yüklü PCL/Lesitin/Geleol polimer lipit hibrit partiküller
LPNBH	BSA yüklü PCL/Lesitin/Geleol polimer lipit hibrit partikül içeren
jel	
LPNBL	BSA/Lizozim yüklü PCL/Lesitin/Geleol polimer lipit hibrit partiküller

LPNL	Lizozim yüklü PCL/Lesitin/Geleol polimer lipit hibrit partiküller
LPNLH	Lizozim yüklü PCL/Lesitin/Geleol polimer lipit hibrit partikül
içeren jel	
NLC	Nanoyapılı Lipit Taşıyıcı
NP	Nanopartikül
PB	BSA yüklü polimerik partikül
PBS	Fosfat Tampon
PCL	Polikaprolakton
PL	Lizozim yüklü polimerik partikül
PLB	BSA yüklü PCL/Lesitin Partikül
PLGA	Poli(laktik-ko-glikolik asit)
PLL	Lizozim yüklü PCL/Lesitin Partikül
PVA	Polivinil alkol
RPM	Dakikadaki Devir Sayısı
SDS-PAGE	Poliakrilamid Jel Elektroforezi
SEM	Taramalı Elektron Mikroskobu
SLN	Katı Lipit Nanopartiküller
STZ	Streptozotosin
UP	Ultra Saf su
UV-VIS	Mor Ötesi Görünür BölgeNLC
VEGF	Vasküler Endotelial Büyüme Faktörü

1 GİRİŞ

Cilt vücudun en büyük organı ve dış ortama karşı ilk koruyucu bariyeridir. Sayısız yaralanmaya ve yanıklara maruz kalmaktadır. Yara cildin çeşitli sebepler ile doku bütünlüğünün bozulması olarak tanımlanmaktadır [1]. İnsanların hayatı boyunca sıkça yaşadığı yaygın bir durumdur. Yara, yalnızca deri tabakasının epidermisi veya dermisin (ikinci tabaka) yüzeysel kısmı ile sınırlıysa, cildin kendi kendine iyileşme yeteneği ile 4 hafta gibi bir sürede iyileşebilmektedir [2]. Bu tip yaralar opsiyonel pansuman ile iyileşme göstermektedir. Tam kat deri kaybını içeren yaralar ise ek girişimleri gerektirmektedir. Yaralar akut ve kronik yaralar olarak sınıflandırılırlar. Eğer yaranın derinliği hipodermise (üçüncü tabaka) ulaşırsa yara iyileşmesi büyük ölçüde uygulamalara ihtiyaç duyulabilir. İki haftayı geçtiği halde iyileşmeyen yaralar kronik yaralar olarak sınıflandırılmaktadır. Kronik yaralarda çoğu defa dokunun kanlanması yetersiz olmaktadır. Yaşlılık, beslenme bozukluğu, diyabet ve immün yetersizlik durumlarında yara iyileşmesi zorlaşmaktadır. Bu iki farklı tip yaranın iyileşme süreçleri farklı olmaktadır. Yara iyileşmesi, birçok aşamadan oluşan karmaşık bir hiyerarşik süreçtir [3]. Dört temel fazdan oluşan yara iyileşmesinde çeşitli hücreler, büyüme faktörleri, sitokinler vb hücreler birlikte hareket ederek görev almaktadır [4]. Yaranın meydana gelmesi ile bölgede kanamanın durdurulduğu ilk basamak hemostazdır [5]. Bu fazı hızlı bir şekilde takiben inflamatuvar fazı gelmektedir. Burada pro-enflamatuvar hücreler (nötrofiller), büyüme faktörleri, sitokinler ve patojenleri temizleyen makrofajlar görev almaktadır. İnflamatuvar fazın ardından yaralı bölgeyi doldurmak için yeni dokunun, yeni kan damarlarının (anjyogenez) ve matriks yapısının oluşturulmaya başlatıldığı proliferatif faz gelmektedir. Son olarak yeniden modellenme fazı ise hücre dışı matriksin gerilme mukavemeti arttırmakta ve onarılan bölgede yeni kan damarları oluşturularak kan akışı artırılmaktadır [6, 7]. Yeniden modellenme basamağı yara iyileşme sürecinin en uzun ve en son basamağıdır.

Yetişkinlerde normal yara iyileşmesi, çoklu hücre tiplerini, büyüme faktörlerini, sitokinleri ve kalsiyum, çinko ve magnezyum gibi metal iyonlarının etkileşimini içermektedir [8]. Yara iyileşmesinde rol oynayan büyüme faktörleri hedef hücrelerdeki spesifik reseptörlere bağlanan ve çok çeşitli hücresel davranışları düzenleme yeteneğine sahip hücreler tarafından salgılanan suda çözünebilir proteinlerdir [9]. Molekül ağırlıkları 4000-60000 Da aralığında değişmektedir.

Yara iyileşmesi sürecinde rol oynayan büyüme faktörlerinden biri de vasküler endotelial büyüme faktörü (VEGF)'dür. Damarlanmanın ana düzenleyicisidir ve 7 üyeden oluşmaktadır Yara iyileşmesinde büyük ölçüde vasküler endotelial büyüme faktörü-A (VEGF-A) işlev görmektedir [10]. VEGF ile yapılan çalışmalarda damar endotel hücre çoğalmasını hızlandırdığı, oluşturulan yara modellerinde inflamasyonu azaltarak anjiyogenezi teşvik ettiği görülmektedir [11].

Granülosit makrofaj stimüle edici faktör (GM-CSF) ise, moleküler ağırlığı 22.000 D olan bir glikoprotein yapıda doku büyüme faktörüdür ve deride çok fonksiyonlu bir yara iyileştirici sitokin gibi görünmektedir [12]. GM-CSF, yaralanmadan kısa bir süre sonra epiderm hücresi proliferasyonuna (otokrin bir ekli ile) aracılık eden derideki keratinositler tarafından salgılanmaktadır. Kronik yaralarda lokal olarak verilen rhGM-CSF'nin ilk kullanımını 1994 yılında bildirilmiştir [13]. GM-CSF ile yapılan çalışmalarında oluşturulan yara modellerinde GM-CSF 'nin damarlar içinde ve çevresinde inflamatuvar infiltrasyon ve fibrinoid dejenerasyonu teşvik ettiği görülmektedir [12].

Akut ve kronik yaraların tedavisinde büyüme faktörlerinin stabilitesini geliştirmek ve kontrollü salınımını sağlamak için birkaç farklı ilaç taşıma sistemi geliştirilmiştir. Büyüme faktörleri için ilaç taşıma sistemi matriks yapılarına ve çok yönlü sistemlere göre sınıflandırılmaktadır. Son zamanlarda, birçok biyomalzemenin, ilaç salınımını gerçekleştirmek için hidrojeller ve mikroküreler gibi taşıyıcılar bildirilmiştir. Bunlar arasında, gözenekli mikrokürelerin gözenek boyutları kolay bir şekilde kontrol edilerek istenilen düzeyde ilaç/protein salınımı gerçekleştirebildiklerinden oldukça cazip hale gelmişlerdir [11]. İlaç ve/veya proteinlerin kontrollü salım sistemlerinde polimer-lipit hibrit partiküllerde tasarlanmaktadır. Polimer-lipit hibrit partiküllerde polimer/lipit oranları değiştirilerek etken maddelerin kapsüllenme verimleri ayarlanabilmektedir [14]. Bu bilgiler doğrultusunda diyabetik yaraların iyileşmesinde kullanılmak üzere çalışma kapsamında kombine tedavi amacıyla kullanılabilir, birden fazla bileşimin salınımına olanak verecek çok bileşenli mikro içinde 'nano/nano in mikro' yapılı sıralı salımı sağlayabilecek bir sistem tasarlanmıştır ve ilaç alım ve salım veriminin incelenmesi ve hayvan modellerinde performansının gözlenmesi planlanmıştır. Tez çalışmasında amaç polimer temelli partiküllere VEGF ve GM-CSF eş zamanlı yüklenmesi, kontrollü ve sıralı salımının gerçekleştirilmesi ve böylece yara iyileşmesi sürecinde prosesin ihtiyaç duyduğu ligantların gerekli zamanda salımının sağlanmasıdır. VEGF ve GM-CSF salımının seçilen model moleküller kullanılarak kontrollü olarak gerçekleştirilmesinin ardından bu yapıların uygulanabilirliği göz önüne alınarak bir poloksamer (F127) hidrojel

bazlı bir yara örtüsü içine entegrasyonu hedeflenmiştir. Böylece tasarladığımız yara örtüsü, yara bölgesini nemli tutarak VEGF/GM-CSF'nin salımlarının kontrollü bir şekilde gerçekleşmesi sağlanarak iyileşmesi zor olan yaraların (farklı iyileşme basamaklarını etkileyerek) iyileşmesi hedeflenmiştir. Tez çalışmasında tercih edilen diyabetik sıçanlarda gelişen damar sorunları uç organlardaki (parmak, ayak vs) iskeminin temel nedenidir. Bunun çözümü, varolan damarların endovasküler girişimler ile açılması ya da anjiyogenezin tetiklenerek iskemi ile baş edilmesi gerekmektedir. VEGF ile bu sorunun giderilmesi hedeflenmiştir. Öte yandan diyabetik hastalarda hücrel ve hümorel yanıtta yetersizlikler ve bozuklukların da GM-CSF ile giderilmesi hedeflenmiştir. Bu ikili kombinasyonun yara bölgesinde makrofajları stimüle etmesi ve anjiyogenesizi artırma özelliği nedeni ile yara iyileşmesini hızlandıracağı öngörülmüştür. İn vivo olarak da işlenebilirliğini gösterebilmek amacıyla diyabetik hale getirilen Spraque Dawley ratlarda yara modelleri oluşturularak ön çalışma gerçekleştirilmiştir.

2 GENEL BİLGİLER

2.1 Deri

Vücudun en büyük organı olan deri, yaşam için gerekli olan fizikokimyasal olguları barındırır ve örttüğü dokuları ultraviyole (UV) ve radyasyondan, mikroorganizma lardan ve dış etmenlerden korur. Deri sıcaklığı ayarlayabilme ve kendi kendine iyileşme yeteneğine sahiptir [15]. Ortalama bir yetişkinin cildi yaklaşık olarak 170-200 cm² ve ağırlığı 15-17 kg arasında değişmektedir [16].

Normal bir deri dıştan içe doğru epidermis,dermiş ve hipodermis olarak üç katmandan oluşur.

- Epidermis

Derinin en dış katmanıdır ve bariyer görevi görmektedir. Patojenlerden kaynaklanabilecek enfeksiyonlara karşı korur. UVA ışınlarından korumaktadır.

- Dermis

Derinin en büyük bileşenidir. Dermiste birçok hücre tipleri ve sinir ağları bulunur.

- Hipodermis

Mekanik ve fizyolojik destek sağlar, daha büyük sinir ve damar ağları içerir.

2.1.1 Epidermis

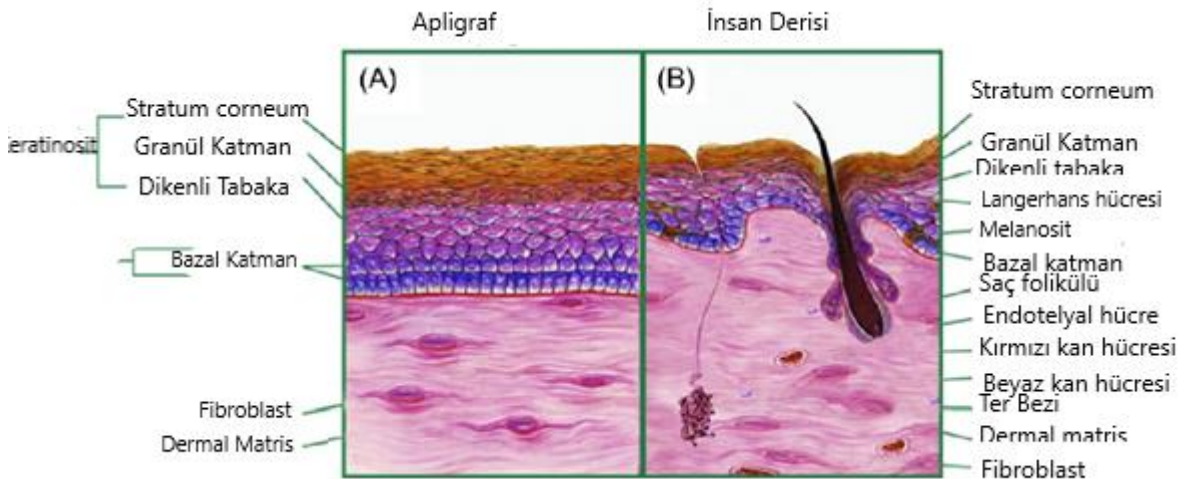
Vücudun en dış tabakasıdır ve vücudun farklı yerlerinde farklı kalınlıkta bulunmaktadır. En kalın epidermis, avuç içi ve ayak tabanında 1,5 mm kalınlığında, en ince epidermis ise göz kapaklarında 0,05 mm kalınlığındadır [17]. Toksik maddelere ve zararlı organizmalara karşı geçirgen değildir. Ayrıca vücudun su kaybını kontrol eden tabakadır damarsal yapılar bulunmaz beslenmesi ve metabolik değişimi difüzyon ile gerçekleşir [18]. Ana hücresi çok katlı yassı epiteli oluşturan, kıl ve tırnağın temel yapısını oluşturan filament yapılı protein olan keratini üreten keratinositlerdir ve hücrelerin %95'ini oluşturmaktadır [19]. Geri kalan %5'i melanositler, Langerhans hücreleri ve Merkel hücreleri oluşturmaktadır.

Epidermis tabakası keratinosit farklılaşmasına bağlı olarak stratum corneum (en dış katman), granül katman, spinöz katman ve bazal katman (en iç katman) olmak üzere dört ana katmana ayrılır. (Şekil 2.1). Bazal membran epiderminin en alt tabakasıdır, tek katmanlı keratinosit hücrelerini içermektedir. Bu hücreler çoğalarak cildin fiziksel bariyerini sağlayan ve en dıştaki ölü deriyi temsil eden stratum corneum hücrelerine

farklılaşmaktadır. Ayrıca melanositler ve Merkel hücreleri de içermektedir. Bu tabakada cilt pigmenti olan melanin üretimi gerçekleşmektedir [20]. Merkel hücreleri kişinin derisine uygulanan temasın farkedilmesini varmasını sağlayan hücrelerdir [10]. Dermis katmanının hemen üzerinde yer almaktadır. Bazal membranda bulunan hücreler üst katmanlara doğru farklılaştıkça işlevlerini kaybetmekte ve ölmektedirler, deriden dökülerek dışarı atılmaktadır. 12-25 günde gerçekleşen bu süreç keratinizasyon olarak tanımlanmaktadır. Bazal membrandaki hücreler yukarı doğru hareket ederken yassılaşıyor ve nükleuslarını kaybederler ve canlılıklarını yitirerek ölü keratin yapılarına dönüşürler. Bu yapılar epiderminin en dış katmanı stratum corneum oluştururlar. Bu katman sayesinde vücuda su dahil, yabancı maddelerin deriye girmesi veya vücut sıvılarının çıkması engellenir. Keratinositlerin çekirdeklerinin kaybetmesiyle keratin adı verilen sert yapılar oluşur, kimyasal etkilere dayanıklıdır ve o bölgede organları koruduğu için derinin diğer tabakalarından önemli rol oynamaktadır [18] [23].

Stratum spinosumda hücreleri birbirlerine bağlayan yüksek konsantrasyonda keratin filamentleri ve desmozomlar bulunur. [17] Bu tabakada daha çok langerhans hücreleri bulunur. Langerhans hücreleri ciltte immünolojik durumlarda antijen üreten hücrelerdir. Bu hücreler arasında cildin nem dengesini sağlayan lipidlerin üretimleri de gerçekleşmektedir [20].

Stratum spinosum tabakası üzerinde stratum granulosum yer almaktadır. Stratum granulosumda sıralı yassı hücrelerle keratin üretimine katkı sağlamaktadır.



Şekil 2-1 Derinin Yapısı [19]

Epidermin katmanlarında keratinositler, melanositler, Langerhans hücreleri ve Merkel hücreleri olmak üzere dört hücre tipi bulunmaktadır.

2.1.1.1 Keratinositler

Epidermin ana hücresi keratinositlerdir [17]. Saç ve tırnağın temel yapısını oluşturan keratini üreten hücrelerdir. Epidermin bütün katmanlarında bulunmaktadır. Bu hücreler yassıdır en alt tabaka olan stratum bazale'nin kök hücre havuzlarında meydana gelmektedir. Bazal membranda üretilen hücreler üst katmanlara doğru farklılaştıkça işlevlerini kaybetmekte ve ölmektedirler deriden dökülerek dışarı atılmaktadır. 12-25 günde gerçekleşen bu süreç keratinizasyon olarak tanımlanmaktadır. Keratinizasyon süreci sentez aşaması ve bozunma aşaması olmak üzere iki aşamadan meydana gelmektedir [17]. İlk aşama bazal membrandaki hücreler bölünmeye başladıktan sonra başlar, hücrelerin bir kısmı bazal membranda kalırken bir kısmı ise yüzeye doğru ilerler ve farklılaşmaya başlar [17] [21]. Hücreler stratum spinosum tabakasında keratin üretmeye başlar.

Keratinositler, hastalık, yaralanma ve iltihaplanma durumlarında hızlı çoğalma yeteneklerine sahiptirler ve mikroorganizmalara karşı koruyucu etki yapar.

2.1.1.2 Melanositler

Stratum bazalede bulunurlar ve nöroendokrin sistemin bir parçası olan hücrelerdir. Melanositler melanin sentezlerler ve epidermin pigment oluşturan hücreleridir. Yüzde, bacak ve genital bölge dahil vücudun farklı bölgelerinde farklı yoğunlukta bulunmaktadır [17]. Bu hücreler, keratinositlerin aralarında bulunan dendritik uzantılara sahiptirler. Güneş görmeyen deride melanositler bazal tabakada bulunmakta, güneş ışınları ile birlikte melanositlerde enzim aktivitesi hızlanarak, melanin yapımı hızlanmakta ve keratinositlerde birikimi artmaktadır Melanin pigmenti cildi ultraviyolenin zararlı etkilerinden korur. Melanin pigmentinin keratinositlerde birikmesiyle melanofor yapıları oluşmaktadır. Bu yapılar insanlarda ve hayvanlarda derinin rengini vermektedir.

2.1.1.3 Langerhans Hücreleri

Dendritik uzantıları olan stratum spinosum tabakasında bulunan yıldız şeklinde hücrelerdir. Kemik iliğinden köken alırlar. Langerhans hücrelerinin primer fonksiyonu ciltteki ilk immünolojik savunmayı oluşturmaktır [17] [22]. Bu antijen sunan hücreler, yabancı saldırgan maddeleri alır ve onları T hücrelerine sunmak için işleme tabi tutar

[17]. Ultraviyole ışınlarına uzun süreli maruz kalındığında bu hücrelerde duyarlılık gözlenir ve yeteneklerinin kaybolmasına neden olur.

2.1.1.4 Merkel Hücreleri

Avuç içi, ayak tabanı, oral ve genital mukoza ve tırnak yatağının stratum bazalede bulunan merkel hücreleri dokunma duyusunun algılanmasında rol oynar. Bu hücreler sensorik sinir sonları ile ilişkilidir.

2.1.2 Dermis

Dermis, epidermisin altında yer almaktadır. Dermisin kalınlığı en kalın sırt bölgesinden (3 mm), en ince dermiş göz kapağında olarak değişmektedir. Beslenmeyi sağlayan damarları duyuyu sağlayan kan damarları ve sinirleri aynı zamanda saç kökleri ve ter bezleri gibi yapıları içerir [17]. Bol miktarda kollajen ve elastik ipler içerir. Epidermise hem besleyici hem de yapısal destek sağlar.

Dermis iki tabakadan oluşmakta, papiller dermiş ve retiküler dermis olarak adlandırılmaktadır. Papiller dermis epidermisin hemen altında retiküler dermis daha derinlerde bulunur. Papiller dermis, ince kollajen fibrillerin iç içe bulunduğu bölümdür. Retiküler dermis daha aselülerdir ve papiller dermise göre daha kalın kollajen içerir ve elastik liflerden daha yoğun bir ağ örgüsüne sahiptir [19].

2.2 Yara ve Yara iyileşmesi

2.2.1 Yara

Ciltte ya da mukozada, travma, cerrahi girişim veya hastalık sebebiyle meydana gelen, fonksiyon kaybına, doku bütünlüğünün bozulmasına yara denilmektedir. Yaralanmalar deri altı doku, kaslar, tendonlar, sinirler, damarlar ve kemik gibi diğer dokulara ve yapılara kadar uzanabilmektedir [23].

2.2.2 Yara Tipleri

Yaralar iyileşebilme yeteneklerine göre ikiye ayrılmaktadır. Yara yalnızca deri tabakasının küçük bölgeleri, epidermis veya dermisin (ikinci tabaka) yüzeysel kısımlarıyla sınırlıysa, cildin kendi kendine iyileşme yeteneği ile 4 hafta gibi bir sürede iyileşir [2]. Bu tip yaralar akut yaralar olarak sınıflandırılmaktadır. Eğer yaranın derinliği dermis ve hipodermise (üçüncü tabaka) ulaşırsa kronik yaralar olarak

sınıflandırılmaktadır. Öte yandan kronik yaralar çoğu zaman doku bütünlüğünü tehlikeye atan metabolik sorunlar, yatkınlık durumları vs. gibi olarak vücut içerisindeki mekanizmalar tarafından meydana getirilmektedir. Bu tip yaralarda çoğu defa doku kanlanması yetersiz olmaktadır. Yaralarda iyileşme, yaşlılık, beslenme bozukluğu, diyabet ve immün yetersizlik gibi nedenlerle zorlaşmaktadır.

Kronik yaralar diyabetik ülserler, venöz ülserler ve bası yaraları gibi gruplara ayrılmaktadır [24].

1. Diyabetik ülserler

Damar tıkanmaları ve periferik sinir hücrelerinin hasarlanmasına bağlı olarak doku bütünlüğünün bozulmasına neden olan komplikasyondur.

2. Venöz ülserler

Bacağın toplar toplardamarındaki yetmezlik nedeniyle meydana gelen kronik yaralardır.

3. Bası yaraları

Diyabetik ve venöz ülserler genellikle yaşlılarda gözükmesine rağmen bası yaraları her yaşta insanda gözükmektedir. Bir bölgenin uzun süreli ve aralıksız olarak basınca maruz kalmasıyla bası yaraları oluşmaktadır.

2.2.3 Yara iyileşme tipleri

2.2.3.1 Primer iyileşme

Bütünlüğü bozulan dokunun cerrahi dikiş veya bantlar ile karşı karşıya getirilip kapatılması esasına dayanır. Primer iyileşmede küçük ödem, ince bir yara izi ve enfeksiyon olmadan devam eder. Primer iyileşme enfeksiyon olmadan 4-6 günde hızlıca iyileşir.

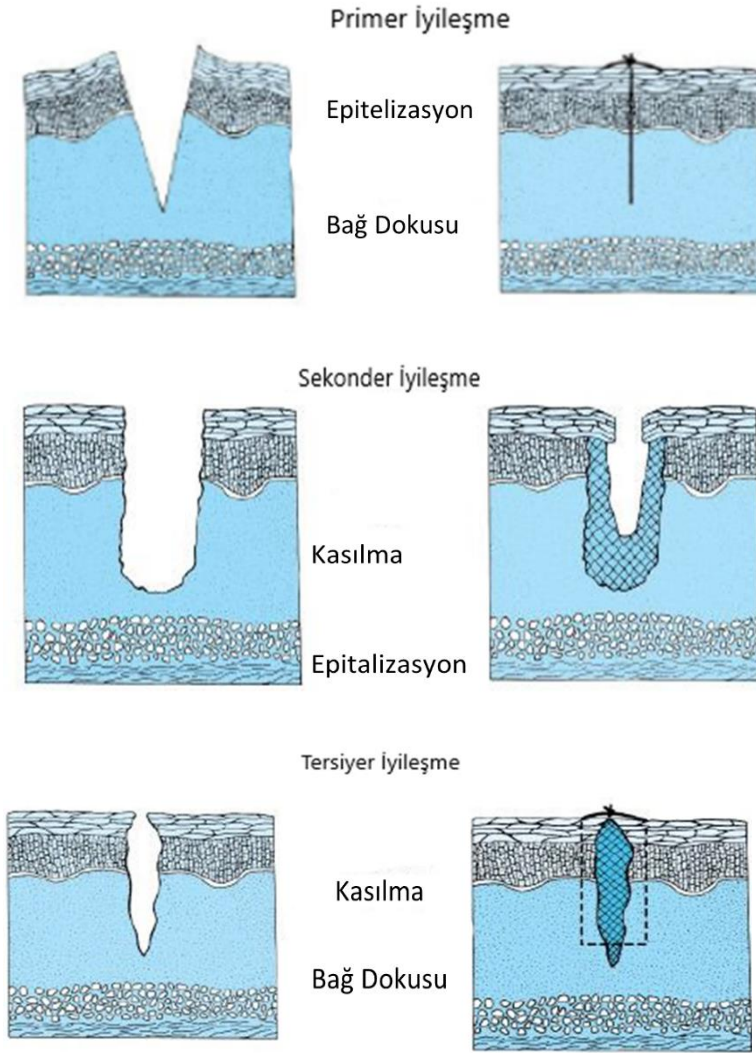
2.2.3.2 Sekonder iyileşme

Tam kat yaralarda yara bölgesi açık bırakılarak yaranın kendi kendine iyileştiği durumdur. Açık bırakılan yara kontraksiyon, granülasyon ve epitelizasyon ile kapanmaktadır. Daha büyük bir yara izi oluşur, yara kapanması uzun süreli olursa kronik yaraya dönüşmektedir. Yaranın iyileşmesi 2-3 hafta sürmektedir. Enfekte yaraları, böcek ısırığının oluşturduğu yaralar ve yanık iyileşmesinin tipi buna örnek verilebilir.

2.2.3.3 Tersiyer İyileşme

Yaranın girişim yapılmadan açık kaldığı süreçte görülen iyileşme tipidir.

Yaralanma ile başlayan yara iyileşmesi hemostaz/inflamasyonu fazı ve yeniden şekillenme fazını içeren çok hücreli organizmalardaki karmaşık olaylardan biridir. İyileşme iki farklı mekanizma ile gerçekleşebilir; a) rejenerasyon b) onarım. Rejenerasyon orijinal dokunun iyileşmesini sağlarken, onarım matriks sentezi, hücresel yanıtlar sonucunda skar formasyonu oluşumudur [3]. Yara iyileşme tipleri şekil 2. 2’de gösterilmiştir.



Şekil 2-2 Yara İyileşme Tipleri [25]

Yara iyileşmesini etkileyen faktörleri lokal ve sistemik olarak gruplandırmak mümkündür [10, 26].

Lokal faktörler

- Kuruluk/Nem
- Bakteriyel Enfeksiyon

- Nekrotik Doku
- Basınç
- Travma ve Ödem
- Sigara kullanımı

Sistemik Faktörler

- Yaş
- Vücut Tipi
- Kronik Hastalıklar
- Radyasyon Tedavisi
- Beslenme mazuriyeti
- Anemi
- İmmün/Metabolik sorunlar

2.3 Yara İyileşmesinde Görev Alan Yapılar

Yara iyileşmesinde farklı hücre tipleri, pıhtılaşma faktörleri, bağ dokusu, büyüme faktörleri, sitokinler ve vasküler sistem hücreleri gibi yapılar görev almaktadır. Yara iyileşmesi bu yapılar arasındaki etkileşimleri tarafından gerçekleşmektedir [27-29].

2.3.1 Hücreler

Yara iyileşmesinde görev alan hücreler aşağıdaki gibidir.

Trombosit: Yara iyileşmesinin hemostaz aşamasında rol oynamaktadır. Damar ile ilgili yaralanma bölgelerinde kanamayı durdurucu görevleri mevcuttur. Kan pıhtılaşmasında önemli bir yere sahiptir. Önemli matriks bileşeni fibrinojendir. Ek olarak, doku onarımını destekleyen, anjiyogenez, inflamasyon süreçleri etkileyen maddeleri içermektedir. Çekirdeksiz hücrelerdir ona rağmen doku faktörü ve interlökin-1 beta sentezleyebilmektedirler [30].

Nötrofiller: Nötrofiller ve makrofajlar bağışıklık sistemi hücrelerindedir. Yaralanmada yara bölgesine ilk ulaşan bağışıklık sistemi hücresi nötrofillerdir. Yara iyileşmesinin ikinci basamağı olan inflamatuvar evresini başlatırlar.. Bu hücrelerin başlıca görevi açık yarayı istila eden bakterileri yok etmek ve o bölgeyi dekontamine (tezmilemek ile) görevlidir.

Nötrofillerin çok hızlı ve etkili tepkisi, deri vs.gibi bariyer yüzeylerinin yaralanmasında enfeksiyon şansını en aza indirirler Nötrofillerin görevlerini tamamladıktan sonra doku onarımı ve iyileşme süreci başlamaktadır [31].

Makrofaj: Makrofajlar yara iyileşmesinde merkezi bir rol oynamaktadır şayet makrofajlar aktif olmazsa ardışık seyreden yara basamaklarının ilerlemesi kesintiye uğramaktadır. Yaralanmadan 24 saat sonra yaralanma bölgesinde farklılaşan monositler yoğunlaşır İnflamasyon evresinde antimikrobiyal savunma gibi önemli bir rolde görev alırlar

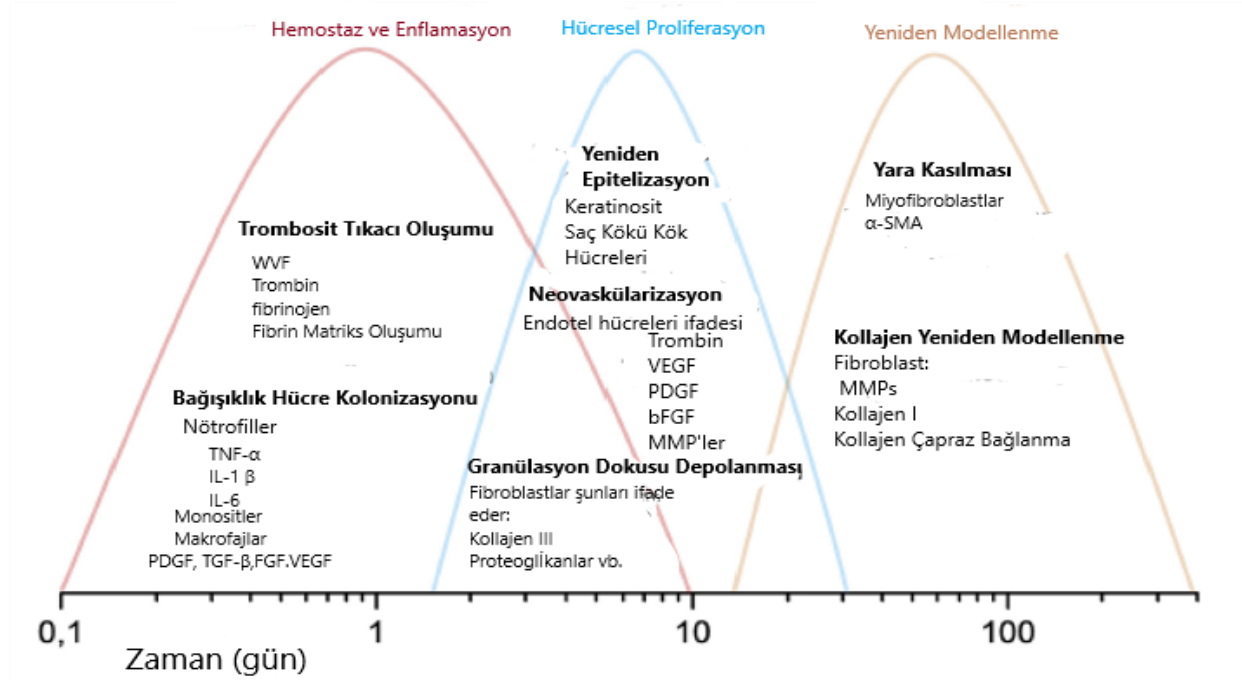
Fibroblastlar: Yara iyileşmesinde etkili ekstrasellüler matriks (ECM) sentezi ile yaranın kontraksiyonunun sağlar bir başka deyişle kollajen yapımını arttırarak diğer hücresel aktiviteleri destekler Yaranın kontrakte olmasında önemli rol oynar [32].

Gelişen myofibroblastlar aynı zamanda anjiyogenez ve granülasyon dokusu oluşumunu destekler.. Yara kontraksiyonunda temel rol oynayan hücreler myofibroblastlardır. Bunların yokluğunda atonik yaralar gelişir.

Kollajen Lifler: Kollajen, hücre dışı dermal matriksin (ECM) büyük bölümünü oluşturan üçlü sarmal yapıda protein molekülüdür. Yapısal ve işlevsel olarak hücre dışı matriksin önemli bir proteindir. Yara iyileşmesinde yeniden modelleme fazında rol oynarlar. Yaranın gerilim gücünden sorumludur. Gerilme kuvveti ile kollajen lifleri arasında doğru orantı bulunmaktadır. Kollajen liflerin az olduğu durumlarda iyileşmiş dokunun direnci de azalmaktadır.

2.4 Yara iyileşme basamakları

Yara iyileşmesi dört aşamadan meydana gelmektedir.



Şekil 2-3 Yara İyileşme Aşamaları ve Hücreleri [3] [33] [34]

2.4.1 Hemostaz

Hemostaz yara oluştuktan sonra pıhtı oluşturarak kanamanın durdurulmasını sağlayan damarların verdiği ilk yanıtıdır [23]. Damar yaralandıktan sonra oluşan pıhtı fibronektin, trombin, trombositler ve kollajenden oluşur [35]. Pıhtılaşma ile eş zamanda mast hücrelerinden histamin salınır. Histamin vazodilatasyon ve vasküler geçirgenliği artırarak inflamatuvar hücrelerin yara bölgesinin hücre dışı boşluğuna girmesine yardımcı olur [23, 36]. Oluşan geçici fibrin yapı hücrelerin yaralı bölgeye taşınmasına izin verir [23, 32]. Ek olarak, trombositler tarafından salınan faktörler bir vazokonstriksiyon sürecini tetikler ve yaradaki lökositlerin toplanması için kemotaktik ajanlar olarak işlev görür, böylece inflamatuvar yanıtı başlatırlar.

2.4.2 İnflamasyon

İnflamasyon nötrofillerin yara bölgesine ulaşması ile başlar. Nötrofiller yabancı maddeleri ve bakterileri temizlemek için interlökin 1-beta (IL-1), interlökin 6 (IL-6)

nekroz faktörü- α (TNF- α) gibi kemotaktik ajanlar salgılar. Yaralanmadan sonra 24-48 saat içerisinde nötrofillerin seviyesi en yüksek düzeye ulaşmaktadır.

Daha sonra bölgeye monositler ulaşır ve makrofajlara dönüşür bölge yabancı cisimler ile temizlenirken aynı zamanda iyileşmeyi devam ettirmek için insülin benzeri büyüme faktörü 1 (IGF-1), dönüştürücü büyüme faktörleri α ve β (TGF- α – TGF- β) serbest bırakır [3]. Makrofajlar bu aşamada sinyal faktörlerini uyardığı için önemli bir rol oynamaktadır. Bu aşamada makrofajlar ve nötrofiller dokunun yeniden yapılandırılması için ortam oluşturmak ile görevlendirilmişlerdir [37]. Makrofaj kaynaklı sitokinler fibroblast göçü, yeniden damarlanma, kollajen üretimi ve yara kontraksiyon ile ilişkilendirilmektedir [38]. Kontamine yaralarda inflamasyon fazı uzamaktadır bu sebeple makrofajların stimülasyonu ve skar dokusu artmaktadır [39].

2.4.3 Proliferasyon

Bu aşama yaralanmadan sonraki 3-5. günlerde kan pıhtısının, yabancı cisimlerin ve bakteriyel enfeksiyonların ortamdaki gittiği, yaklaşık 14 gün süren bir süreçtir. Bu evre fibroblast göçü, kollajen sentez, anjiyogenez ve granülasyon dokunun meydana gelmesi olarak karakterize edilmektedir [38].

Pıhtılaşmadan sonra çoğalan fibroblastlar kollajen tip III, hyaluronik asit ve fibronektin içeren matriks metalloproteinazlar ve ekstraselüler matriks elemanları üretirler [3]. Fibroblastlar yara iyileşmesinin 2. haftasında miyofibroblastlara dönüşürler [40].

Fibroblastlar tarafından üretilen kollajenler proliferatif ve yeniden şekillenme aşamalarında yara bölgesinin doku bütünlüğünü ve gücünü kazandırmaktadır [40, 41].

Trombositler tarafından TGF- β , PDGF ve FGF'nin salınmasıyla hemostatik tıkaç oluştuğunda bu aşamada anjiyogenez başlar [23, 36]. Anjiyogenez endotel hücrelerinden yeni kan damarlarının oluşmasıdır. Anjiyogenezin en önemli düzenleyicileri, vasküler endotelial büyüme faktörü A (VEGFA) ve fibroblast büyüme faktörü 2'dir [42].

Anjiyogenezin başlaması ile fibroblast proliferasyonu azalmakta, damarlanma ile sağlanan oksijen ile olgunlaşmamış kollajen lifleri çapraz bağlanarak olgun kollajeni meydana getirmektedir [40]. Yara kenarındaki fibroblastlar, kollajen lifler ve kapiller yara yüzeyine paralel bir şekilde yer alarak yara kenarlarını birbirine bağlamaktadır [43]. Proliferasyon aşama sırasında, yara bölgesi granülasyon doku olarak bilinen vasküler bağ dokusu ile dolmaktadır [3]. Granülasyon dokusunun gelişimi yara iyileşmesi için önemli parametredir [40].

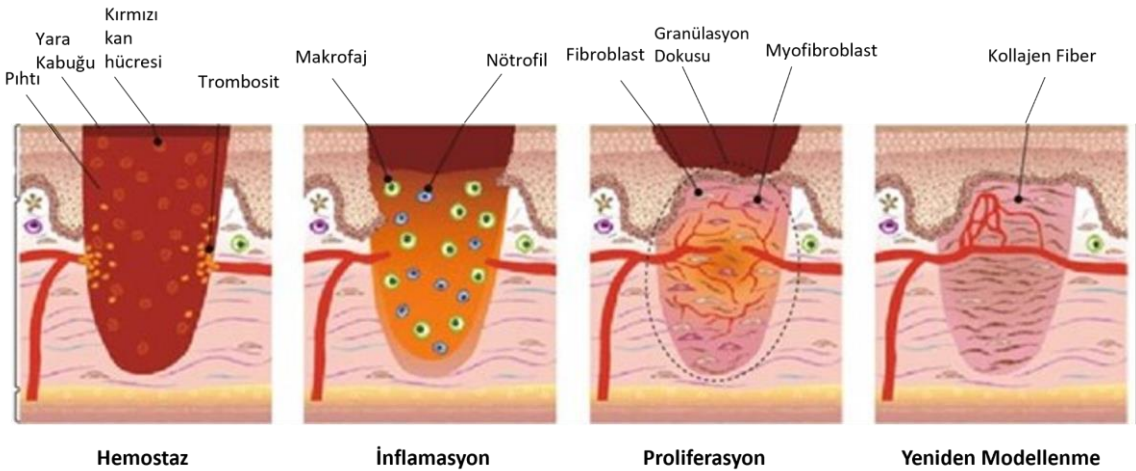
2.4.4 Yeniden Şekillenme (Remodelling)

Yara iyileşmesinin son basamağı olan yeniden şekillenme yeni epitel ve skar dokunun oluştuğu aşamadır [38]. Diğer aşamalara göre en uzun süreli aşamadır 1-2 gün veya daha fazla sürmektedir. Bu aşamada proliferasyon aşamasında oluşan granülasyon dokusu skar dokusu ile yer değiştirmektedir [44].

Daha sağlam bir ağa doğru organize olan kollajen oluşumunu kapsamaktadır [35]. Yara iyileşmesinin başlangıcında fibroblastlar tarafından oluşturulan tip III kollajen, daha sağlam yapıda olan tip I kollajene dönüşmektedir [39].

Yara iyileşme aşamasında fibroblastların ve makrojafların yoğunluğu azalmaktadır [38, 45]. Bu fazda kılcal damar büyümesi durarak yara bölgesinde kan akışı ve metabolik aktivite azalmakta böylelikle direnci artmış bir skar dokusu oluşmaktadır [38].

Yara iyileşme süreci yaklaşık olarak 21 günde tamamlanmaktadır.



Şekil 2-4 Yara iyileşme fazlarının şematik gösterimi [46]

2.5 Yara İyileşmesinde Kullanılan Tedavi Yöntemleri

Yaralar çeşitli şekilde enfekte, akut, venöz, kronik ve arteriyel olmak üzere sınıflandırılmaktadır. Etkili yara tedavisi için yaranın durumu, hastanın sağlık durumu, çevre şartları ve yara tedavisinde kullanılan malzemeleri özellikleri gibi etkenlerle iyi bir değerlendirme yapmak önemlidir. Yara iyileşme sürecini geliştirmek ve daha iyi anlaşılması amacıyla farklı tedavi yöntemleri mevcuttur [47]. Bu yenilikçi tedaviler sırası ile şu şekildedir; platelet zengin plazma tedavisi (PRP), negatif basınçlı yara tedavisi, hiperbarik oksijen (HBO), kök hücre, topikal ajanlar, ozon tedavisi ve büyüme faktörleri vb. yöntemlerdir [48]. Tez çalışma kapsamında tercih edilen tedavi yöntemi büyüme faktörü içeren yöntemidir. Bir yaranın başarılı bir şekilde iyileşebilmesi hücresel süreçleri

düzenleyen büyüme faktörlerine, sitokinlere bağlıdır. Bu ajanlar, bir hedef hücrenin büyümesini ve farklılaşmasını sağlayan biyolojik olarak aktif polipeptitlerdir.

2.6 Büyüme Faktörleri ve Sitokinler

Canlıların hayatlarının devamlılığı için, hücresel büyüme, proliferasyon ve hücresel farklılaşması gibi olaylar düzenlemede uyarıcı özelliğe sahip moleküllere ihtiyaç vardır. Bu moleküller büyüme faktörleri ve sitokinlerdir. Genellikle protein ve steroid olmak üzere iki farklı hormon yapısındadırlar.

Büyüme faktörlerin ağırlıkları 4 000-60 000 Da arasında değişiklik gösteren birçok türü mevcuttur ve çok az miktarda bile etkili olabilmektedirler.

Sitokinler, küçük molekül ağırlıklı hücresel düzenlemeyi sağlayan küçük proteinlerdir. Bağışıklık, inflamasyonu ve kan hücreleri oluşumuna aracılık ederler ve bu süreçleri düzenlerler. Çok çeşitli hücrelerce üretilebilirler ve çok çeşitli hücrelere etki gösterebilirler [49].

2.6.1 Büyüme Faktörleri ve Sitokinlerin Yara İyileşmesindeki Rolü

Hücreler arası etkileşiminde görev alan büyüme faktörleri ve sitokinlerin yara iyileşmesinde önemli rolleri vardır. Büyüme faktörleri yara iyileştirme özelliği damarlanmayı sağlaması ve hücreler farklılaşma üzerinedir [38]. Sitokinler ise yara iyileşmesine hücre bölünmesi üzerine etkilidir. Büyüme faktörleri yara iyileşmesinin her fazında etkin rol oynamaktadırlar. Örneğin inflamasyon fazında makrofajların uyarması ile yara bölgesine gelmektedirler.

Yara iyileşmesinde önemli görevlere sahip olduğu kanıtlanmış büyüme faktörleri arasında, PDGF, FGF, VEGF, TGF- β , EGF, IGF, GM-CSF, IL-1, IL-2, TGF- α yer almaktadır.

Epidermal büyüme faktörü (EGF), birçok memeli türünün farklı doku ve vücut sıvılarında bulunan 53 aminoasitten oluşan bir polipeptittir. Yara iyileşmesini hızlandırmak için potansiyel olarak incelenen büyüme faktörüdür ve en iyi tanınan büyüme faktörleri EGF ailesine üye olanlarıdır. EGF ailesi üyeleri, hücre büyümesi, çoğalması ve farklılaşması için anahtar düzenleyiciler olarak kabul edilmişlerdir [50].

EGF, fibroblast, makrofaj, keratonosit ve trombositlerden köken almaktadır. Epitel hücre ve fibroblast proliferasyonu, anjiyogenez (damar oluşumu), kollejenaz aktivitesini uyarmak reepitelizasyonu arttırmak gibi etkileri vardır.

Fibroblast büyüme faktörü (FGF), 23 üyeden oluşmaktadır. Kronik yara iyileşmesinde rol olan en önemli üç üye FGF-2,FGF-7 VE FGF-10'dur. FGF'ler keratinositler, fibroblastlar, endotel hücreleri, düz kas hücreleri,kondrositler ve mast hücrelerinden köken almaktadırlar[9]. Yara iyileşmesinde görevleri anjiyogenezi uyarmak, endotel profireasyonu ve motiliteyi arttırmak, neovaskülarizasyonu hızlandırmaktır.

Transforme edici büyüme faktörü (TGF), makrofaj, epidermal hücreler, trombositler, makrofajlar, nötrofiller, lenfositler tarafından üretilmektedir. Alfa ve beta olmak üzere iki grup içerirler.

TGF- β ailesi TGF- β 1, kemik morfojenik proteinleri (BMP) ve aktivinleri içermektedir. Yara iyileşmesinde, TGF- β 1 inflamasyon,anjiyogenez, yeniden epitelizasyon ve bağ dokusu rejenerasyonunda önemli bir yere sahiptir. Kolajen üretimini uyarma yeteneğine sahiptir ve skar gelişiminde rol oynadığı düşünülmektedir [51].

TGF- α , EGF ile benzerlik göstermektedir. Hatta EGF hücre reseptörüne 100 kat affinite özelliği gösterecek şekilde bağlanarak biyolojik etkilerini gösterebilmektedir. Yara iyileşmesinde keranositlerin çoğalması ve göçünde etkilidir. Kan akışının düzenlenmesinde, yeni damarların oluşmasında EGF 'ye göre daha güçlü etki ettiği bildirilmiştir [52].

Trombosit Kökenli Büyüme Faktörü (PDGF), makrofajlar,trombositler, endotel hücreleri, keratonosit, kondrositler ve düz kas hücrelerinden köken almaktadırlar. Yara iyileşmesinin her aşamasında rol oynamaktadır. Makrofaj ve nötrofil kemotaksisi ve proliferasyonu uyarmakta, anjiogenez stimülasyonu düzenlemekte ayrıca remodellinge yardımcı olmaktadır. Yaralanma sırasında yara sıvısında bolca bulunmaktadır.

Vasküler Endotelial Büyüme Faktörü (VEGF), endotelial hücreler, makrofajlar, keratonositler, fibroblastlar ve düz kas hücreleri tarafından üretilmektedir [39]. VEGF-A,VEGF-B,VEGF-C, VEGF-D, VEGF-E ve plasenta büyüme faktörü gibi üyelerden oluşmaktadır. Çeşitli in vitro çalışmalarda VEGF-A'nın endotelial hücre göçü ve proliferasyon olmak üzere anjiyogenezdeki erken olayları desteklediği için yara iyileşmesinde önemli olduğu bildirilmiştir.

Granülosit Makrofaj Koloni Stimüle Edici Faktör (GM-CSF), yara iyileşmesinin inflamatuvar fazında nötrofil ve makrofajları kemotaksisini sağladığı için önemli bir faktördür [9]. Fibroblast, endotel hücreleri ve T lenfositlerinden köken almaktadır. GM-CSF, yaralanmadan kısa bir süre sonra epiderm hücresi proliferasyonuna otkrin bir şekilde aracılık eden derideki keratinositler tarafından salgılanmaktadır [13].

2.6.2 Vasküler Endotelyal Büyüme Faktörü

Fizyolojik süreçlerde, gelişim sırasında, yara iyileşmesinde vasküler doku beslenmesi çok önemlidir. Vaskülogenez ve damarlanmanın oluşmasında vasküler endotelyal büyüme faktörü etkilidir.

VEGF, vaskülogenezi ve anjiyogenezi uyaran bir sinyal proteindir. Bu protein platelet kökenli büyüme faktörü (PDGF) ailesinin üyelerinden birisidir. Bu büyüme faktörünün endotel hücrelerinin yaptığı embriyogenez, yara iyileşmesi, tümör büyümesi, oküler neovasküler hastalıklar gibi kronik inflamatuvar hastalıkları kapsayan fizyolojik ve fizyopatolojik olaylarında gerekli olduğu literatürdeki çalışmalarda görülmüştür [52]. VEGF'in vücutta sentezlendiği hücreler: arteriollerini çevreleyen fibroblastlar, aktive makrofajlar, ovaryum folikülleri, korpus luteum, Leydig hücreleri, akciğer alveol hücreleri, bronşiyal ve koroid pleksus epitelyum hücreleri, renal glomerül visseral epitelyum hücreleri, böbrek proksimal tübül hücreleri, adrenal korteksin tüm hücreleri ve hepatositler'dir [53]. Büyüme faktörlerinin işlev görebilmesi için öncelikle reseptörlere bağlanması gerekmektedir. VEGF reseptörleri ilk olarak endotel hücrelerinde saptanmıştır. VEGF hücre dışında salgılanarak 3 tirozin kinaz, 2 nörofilin reseptörüne bağlanmaktadır [54].

Canlıda VEGF'in ifadesi etkileyen belirli durumlar vardır. Glikoz seviyesinin düşük olması ve oksidatif stres VEGF salınımını arttırmaktadır. Bunların yanı sıra hipofiz hormonları, nitrik oksit, inflamatuvar sitokinler VEGF seviyesini etkilemektedir [54]. Tıkanmış kalp damarlarına bağlı olarak oluşan hipoksi sonrasında VEGF ekspresyonu artmaktadır. Hipoksi VEGF ekspresyonunu arttırırken CO tarafından ekspresyonu azalmaktadır [52]. Hipoksi, VEGF ve reseptörlerinin yapımını indükleyen ve damarlanmayı başlatan en etkili stimuluslardan biridir. Hipoksinin yanında bazı sitokinler veya büyüme faktörleri de VEGF yapımını düzenlemektedir. Canlı vücudunda VEGF'nin birçok işlevi mevcuttur.

VEGF'in fonksiyonları aşağıdaki gibi sıralanabilir.

- Endotel hücrelerin proliferasyon, migrasyon aktivitesini uyarmaktadır.
- Vaskülogenez ve bölgede damarlanmayı sağlamaktadır.
- Hücre ölümlerini engelleyerek hücre devamlılığını sağlamaktadır.
- Nöron koruyucu etkileri vardır. Çünkü VEGF hipoksiyi indükleyen nörotropik etkiye sahip bir anjiyojenik bir peptittir [55].

- Bir çalışmada retinal damar geçirgenliği ve lökostatı arttırdığını bildirmişlerdir [56].
- VEGF reseptörleri, inflamatuvar hücrelerde ve trombositlerde bulunduğundan lökositlere bağlanabilir. Böylece proinflamatuvar etki göstermektedir.
- Yaşlanmayı geciktirme etkisi vardır.

VEGF gen ailesi

VEGF ailesi 6 üyeden oluşmaktadır. Bu üyeler, VEGF-A (Human-VEGF), VEGF-B, VEGF-C, VEGF-D, VEGF-E ve Plasenta büyüme faktörü (Placenta growth factor; PIGF) 'dır. Bu faktörler temel olarak anjiyogenez, damar geçirgenliğini düzenlerler fakat VEGF reseptörlerine bağlanma özellikleri farklıdır. VEGF-A temel olarak anjiyogenezde rol oynarken, VEGF-C ve VEGF-D lenf anjiyogenezde yer almaktadır [57].

En güçlü ve üzerinde en çok araştırma yapılan proanjiyojenik araçlardan biri VEGF-A'dır. VEGF-A 45 kDa heterodimerik heparin bağlayıcı bir proteindir [58]. VEGF -A'nın üretildiği yerler makrofajlar, aktiflenmiş T-lenfositler, endotel hücreleri gibi çeşitli hücrelerdir. VEGFR1 ve VEGFR2 yoluyla etki eder ve hipoksi ile aktive olmaktadır [54]. VEGF-A'nın şimdiye kadar bilinen sekiz adet izoformu bulunmaktadır. Bunlar VEGF-A₁₂₁, VEGF-A₁₄₅, VEGF-A₁₄₈, VEGF-A₁₆₂, VEGF-A₁₆₅, VEGF-A₁₈₃, VEGF-A₁₈₉ ve VEGF-A₂₀₆ olarak isimlendirilir. İsimlerdeki sayılar içerdikleri aminoasitlerin sayılarını belirtmektedir [59]. VEGF₁₆₅ en etkili izoformdur ve anjiyogenezi stimüle etme açısından en güçlü olanıdır.

VEGF-B, VEGF-A'nın aksine anjiyogenik aktivitede daha az rol oynamaktadır. VEGF-B apoptotik hücre ölümü ile ilgili genlerin ifadeleri baskılayarak hücre apoptozunu engelleyerek nöronların, vasküler hücrelerin hayatta kalmasını desteklemektedir [60].

VEGF-C görevi ise lenfatik damarların büyümesini sağlamaktır. Bazı hayvan modellerinde lenfanjiyojenik özellikler göstermiştir [61]. VEGF-D, lenfatik damarların büyümesini teşvik eden VEGF alt grubun bir diğer üyesidir. VEGF-C ile yapısal ve fonksiyonel benzerlikler vardır. VEGF-E'nin keratinosit işlevlerini düzenlediğini ve bu sayede yeniden epitalizasyonu sağladığı çalışmalarda gösterilmiştir [62]. Plasenta büyüme faktörü (PIGF) embriyogenez sırasında anjiyogenez ve vaskülogenezde rol oynayan VEGF alt ailesinin bir üyesidir [63].

VEGF'in Yara Tedavisindeki Rolü, Yara iyileşmesi fibroblastlar, kollajen ve kan damarlarını içeren fibrovasküler doku gibi granülasyon dokusunun oluşması aşamasını

içermektedir. Yeni kan damarlarının oluşması damarların yaralanmasından yaklaşık 3 gün ortaya çıktığı anjiyogeneze bağlıdır [64]. Canlı dokuda damarlanma arttığı zaman hücre beslenmesi artması beklenir. Hücre beslenmesi arttığı için hücre çoğalması ve migrasyonuna bağlı olarak doku onarımı gerçekleşmektedir. Bu aşamalarda VEGF damarlanmayı sağlamaktadır. Yeni damar oluşumunun önemine dikkat edildiğinde doku hasarı bağlı hastalıklarda, doku mühendisliğinde ve yara tedavilerinde VEGF kullanılması uygun bir yaklaşımdır [65].

Tez çalışma kapsamında çalışılan VEGF'in çeşitli hastalıklarda damarlanma etkisinin gösterildiği ile ilgili çalışmalar çizelge-2.1 'de özetlenmiştir.

Çizelge 2-1 VEGF'in çeşitli hastalıklarda damarlanma etkisinin gösterildiği ilgili çalışmalar

Polimer Türü	Taşıyıcı Sistem	Boyut	%Kapsülleme Verimi	%İlaç Salımı	Çalışmanın Amacı
PLGA	Mikropartikül	5.1 ± 1.3 µm	83.8 ± 6.6%	İlk 6 saatte 10± 1% 28 günün sonunda 75% salım	Akut Myokard iskemide damarlanma etkisi [66]
PLGA	Nanopartikül	~400 nm	-	4 günün sonunda %89 salım, 20 günün sonunda %90 salım	Vasküler Büyüme [67]
Aljinat/Kitosan/PLA-H	Kompozit İskele		50.7 ± 9.5%	24 saatte %13 salım, 5 hafta %65 salım	Kemik defektlerinde damarlanma etkisi [68]
Çekirdek aljinat, Kabuk kitosan PCL	Çekirdek-Kabuk Mikroküreler	33.7 ± 2.2 µm- 45.6 ± 2.7 µm	72.9 ± 1.6%- 81.9± 2.1%	24 saatte %13 salım, 3 hafta ~ %70 salım	Vasküler endotelial büyüme faktörünün kontrollü salınımı için mikroküre üretimi [69]
PVL-b-PEG-b-PVL	Hidrojel	-	-	35 günde damarlanma	Enfarktüs Stabilizasyonu ve Kalp Onarımı [70]

Jelatin ve Glisidil Metakrilatlı Dekstran	Dekstran-ko-jelatin Nanopartikülleri	130±3.5 nm	98±5.6 µg/mg	40 günde %91 salım	VEGF'in Kontrollü İletimi ile Anjiyogenez İndüksiyonu [71]
Kalsiyim-Aljinat	Mikroküre	~ 3.2 µm	-	Model protein FITC-BSA 24 saatte %48	İskemik kalbe lokal protein iletimi için VEGF yüklü mikroküre yama [72]
Heparin/Poli-L-lizin	Partikül	~ 334 nm	-	28.gün~ %48 salım	İn situ antikoagülasyon ve endotelizasyon hızlandırması [73]
Maleimid-poli (etilen glikol)-poli(εkaprolakton)	Nanopartikül	~ 85.8 nm	82%	6.gün ~ %90 salım	Hücreleştirilmiş domuz aort kapağına yerleştirerek endotelizasyonu hızlandırmak [74]
PCL/Heparin	Biyokompozit Matlar	572.1 ± 150.2 nm	0.0005 g/g	2 hafta salım %68	Vasküler Doku Mühendisliği amacıyla [75]
PLGA	Mikroküre	~ 32 µm	%46-%60	Farklı yapılarda 4 hafta salım	Taşıyıcı Sistem Eldesi [76]

2.6.3 Granülosit Makrofaj Koloni Uyarıcı Faktör

Granülosit makrofaj koloni uyarıcı faktör (GM-CSF), birçok hücre tipi tarafından üretilen 14-35 kDa molekül ağırlığına sahip bir glikoproteindir. T lenfositler, makrofajlar, mast hücreleri, fibroblast ve endotel hücreleri tarafından üretilmektedir [77]. GM-CSF'nin işlev görebilmesi için bağlandığı reseptör CD116 olarak bilinmektedir.

Granülosit makrofaj koloni uyarıcı faktör, ilk zamanlar sadece hematopoitik büyüme faktörü olarak keşfedilmiştir. İlerleyen yıllarda pulmoner homeostaz için de gerekli olduğu anlaşılmıştır. GM-CSF ayrıca bağışıklık sisteminde etkin bir role sahiptir. Bağışıklık sisteminin tepkilerinin oluşturulması ve koordinasyonunda görev almaktadır. Bu görevlerden başlıcaları şu şekildedir; makrofajların ve dendritik hücrelerin farklılaşmasını, olgunlaşmasını ve çoğalmasını sağlamaktadır. Bu hücrelerin hayatta kalmasını ve aktivasyonunu teşvik etmektedir. Vücuda giren yabancı cisimlere karşı ilk savaşı başlatan granülositlerin alınması ve aktivasyonu sağlanmaktadır.

Granülosit vücudun savunma sisteminde yer alan en önemli hücrelerden biridir. Literatürde GM-CSF işlevi durdurulmuş farelerde miyeloid hematopoezde (kan hücrelerinin oluşturulması) herhangi bir bozukluk görülmezken, otoimmün hastalıkların oluşmasına neden olmuştur. Literatürdeki bir çalışmada makrofajları uyaran sitokinlerden biri olan interferon gama ile GM-CSF'nin eksikliği kronik enflamasyon, hematolojik ve katı tümörlerin oluşumu hızlandırdığını göstermişlerdir [77]. Tedavi edici olarak GM-CSF, kemik iliği nakillerinden sonra nötrofil iyileşmesini hızlandırmak için periferik kan progenitör hücrelerini harekete geçirmek ve akut miyeloid lösemi için indüksiyon kemoterapisi alan hastalarda nötropeni süresini kısaltmak için kullanılmaktadır. İn vivo çalışmalarda GM-CSF'nin miyofibroblastların farklılaşmasını indüklediği ispatlanmıştır. Böylece inflamatuvar hücrelerin bölgesel olarak toplanmasına, epidermal hücre ve keratinositlerin proliferasyonu aracılık ederek yaranın iyileşmesine yardımcı olduğu gösterilmiştir. GM-CSF ile ilgili literatürde hayvan çalışması ve klinik çalışmalar gerçekleştirilmiştir. Yara iyileşmesini hızlandırdığını gösteren çalışmalar mevcuttur. Örneğin GM-CSF ile tedavi edilen yaralarda GM-CSF'nin iyileşmeyi geliştirdiği gösterilmiş ve farklı etiyojiye sahip insan kronik cilt ülserlerinin tedavisinde kullanılmıştır. GM-CSF yara bölgesinde makrofajları stimüle etmesiyle yaranın iyileşmesine katkı sağlamaktadır. Yara bölgesinde nötrofil sayısını arttırmak ve işlevlerini geliştirmek yara iyileşmesinin inflamatuvar aşamasında oldukça önemli olduğu kanıtlanmıştır [9]. Ayrıca yaralı cilt epidermisinde GM-CSF arttığı gösterilmiştir [78]. İn

vitro çalışmalarda GM-CSF'nin keratinosit çoğalmasını arttırdığını ve böylece yeniden epitelizasyonu aşamasını hızlandırdığı gösterilmiştir. Elde edilen sonuçlarla GM-CSF'nin direkt keratinosit üzerinde çalıştığı öne sürülmüştür. Diğer in vitro çalışmalarda bu büyüme faktörünün damarlanmada rolü olan endotel hücrelerin göçünü ve çoğalmasını arttırdığını göstermişlerdir [79]. Bir diğer örnek çalışmada Rekombinant GM-CSF'nin (rhGM-CSF) enfekte olmuş yanık yaraların iyileşmesini hızlandırdığı ve ayrıca bağışık aktivitesini uyardığı için enfeksiyonları önlediği kanıtlanmıştır [80]. Klinik çalışmalar ile rekombinat GM-CSF'nin kronik venöz ülserlerinde, eritropati ile ilişkili ülserlerde, nötrofil işlev bozukluğu ile ilişkili kronik ülserde pozitif bir etki olduğu ispatlanmıştır [81].

Kısacası bu büyüme faktörü kemik iliği ve kanda makrofaj, eozinofil gibi kan hücrelerinin oluşumunu ve çoğalmasını uyaran bir glikoproteindir. Fakat sadece kan hücreleri için değil fibroblast, endotel hücreler için de uyarıcıdır. Bu sayede yara iyileşmesinin farklı basamaklarında da rol oynayarak in vivo ve in vitro çalışmalarda denenmiş ve ümit verici sonuçlar elde edilmiştir [82].

Tez çalışma kapsamında çalışılan GM-CSF'in kontrollü salımını sağlamak amacıyla tasarlanan sistemler ile ilgili çalışmalar çizelge-2.2'de özetlenmiştir.

Çizelge 2-2 GM-CSF'in kontrollü salımını sağlamak amacıyla tasarlanan sistemler

Malzeme	Taşıyıcı Sistem	Boyut	%EE	%İlaç Salım	Çalışmanın Amacı
PLGA/PLGA-PEG	Nanopartikül	143 ± 35 nm	%85 ± 5	24 saatte ~%70 salım	Formülasyon ve in vitro karakterizasyon [83]
PLGA-Aljinat-Dekstran	Mikroküre	40–100 µm	%95.6 ± 3.1	%50'si patlama salım, 40 günde %65 salım	Taşıyıcı sistem eldesi [84]
Kitosan	Hidrojel	-	-	-	Antijene özgü bağışıklık tepkisini arttırmak [85]
Poli(laktid-ko-glikolid)	Gözenekli iskele	Gözenek boyutu ~100 µm	-	Patlama salımı ardından yavaş salım	Dendritik hücrelerin İn Vivo Zenginleştirilmesi [86]
L-α-fosfatidilkolin, kolesterol, diheksadesil fosfat	Lipozom	~200 nm` ~200-400 nm 600nm	%15.3 ±1.8 % 32.0 ±8.6 % 47.4 ±20.1 %	-	Lipozomlara GM-CSF kapsüllemesi [87]
Silika	Nanopartikül	150 nm	6.4 µg/ml-1	24 saatte % 41 salım	Silika nanopartiküllere GM-CSF kapsüllemesi [88]

Kronik yaraların gelişimine katkıdan bulunan kritik faktörlerden biri GF eksikliğidir [89]. Vücut dışındaki GF'lerin yara iyileşme üzerindeki etkisi, düşük konsantrasyonlarda bile önemli olmaktadır ve hücre göçü, hücrelerin çoğalmasında ve farklılaşmasında hızlı artışlara neden olmaktadır [90]. Bu nedenle vücut dışında elde edilen GF'ler kronik yara iyileşmesini hızlandırmak ve skar oluşumu azaltmak için yara tedavisinde potansiyel olarak kullanılmaktadır. Kronik yaralar, akut yaralar ile karşılaştırıldığında bFGF,PDGF,VEGF ve TGF- β seviyelerinin azalmasıyla GF eksikliği bildirilmiştir [90] [91]. Böylece yara kronikliğinin GF eksikliğinden sorumlu olduğu öngörülmüştür.

Modern biyoteknoloji sayesinde düşük maliyetlerle büyük miktarlarda kimyasal olarak saf büyüme faktörleri elde edilmeye başlanmış ve iyileşmesi zor yaraların tedavilerinde kullanılması bir devrim yaratmıştır.

GF'lerin yara bölgesinde kullanılmasındaki mantık iyileşme sürecini destekleyen önemli derecede eksik ajanların değiştirilmesi ilkesine dayanmaktadır. Eksik ajanların değiştirilmesi ile bazı temel gereksinimlerin karşılanması gerekmektedir. İlk önce yara tedavisinde kullanılan GF'ler vücudun kendi ekstraselüler matriks hücrelerine etki etmektedir. Bu nedenle bu ECM hücrelerin GF uyarılarına yanıt verme yeteneğine sahip olmalıdır. Uyarılara yanıt veren hücreler yaranın iyileşmesinde fayda sağlayabilmelidir. İkinci olarak vücut dışı GF'lere tedavi edici yanıt, bunların yara içindeki zamansal dağılımına bağlıdır. Vücut içerisine uygulanan GF'ler bölgede hızlıca yayılır ve yara bölgesinde proteaz gibi enzimler tarafından kolayla parçalanır etkisi hale getirilir. Böylece GF'lerin yara bölgesinde terapötik etkileri düşük olmaktadır. Bu da vücut dışı GF'lerin topikal uygulanmasında yara iyileştirme başarısını sınırlayan bir faktördür [92]. GF'lerin topikal uygulanmasında doku rejenerasyonunu desteklemek ve devam ettirmek için yüksek dozlar ve uzun süre uygulanan dozlar gerekmekte, bu da ciddi yan etkilere neden olmakta aynı zamanda maliyeti arttırmaktadır. GF'lerin topikal uygulanması kremler, jeller veya merhemler tarafından sağlanmaktadır [93]. PDGF, EGF ve bFGF gibi bazı büyüme faktörlerini içeren ürünler insan kullanımı için onaylanmıştır. Örneğin, birkaç klinik çalışma, rekombinant PDGF içeren Becaplermin'in (marka adı Regranex® Gel), diyabetik ayak ülserlerinde yara kapanmasını hızlandırma ve amputasyonları önemli ölçüde azaltma yeteneğini göstermiştir [94] [95]. Fakat GF'lerle topikal tedavi uygularken debridman, enfeksiyon kontrolü gibi standart yara işleyiş prosedürlerine dikkat edilmelidir. Prosedürlere dikkat edilmeden yapılan tedavi ile yaranın iyileşmesi olası değildir. Dahası bu tedavilerle kanser riskini arttırdığını görülmüştür. 20 aylık takip

çalışması ile üçten fazla Becaplermin tüpü ile tedavi edilen hastalar ile kontrol grubuyla karşılaştırıldığında kanser riskinin arttırdığını ortaya koyulmuştur [96] [97].

Yara tedavilerinde kullanılan GF yüklü topikal formülasyonlar yaraları iyileştirmek için yeterli olmamaktadır. Çünkü kremler ve jeller yara bölgesinde reolojik özelliklerini kaybedebilir veya ikincil pansuman tarafından emilebilmektedir [98]. Topikal uygulamaların bu gibi dezavantajlarından dolayı büyüme faktörlerinin başka yöntemler ile yaraları iyileştirme yetenekleri araştırılmıştır. Araştırmalar neticesinde büyüme faktörlerinin lokal olarak taşınması için yara örtüleri tasarlanmıştır. Bu yara örtüleri yarayı kontaminasyondan korumak ve nem kontrolü sağlamak amacıyla tasarlanmıştır. En yeni modern yara örtüleri ise yara iyileşme hızını arttırırken, yara izlerinin oluşumunu azaltarak yeni işlevlere sahip olmuştur [99]. Bu yara örtüleri etken maddeleri doğrudan iyileşen dokuya iletmek için taşıyıcı sistem olarak da kullanılabilir. Bu sayede yara bölgesinde GF'lerin kontrolü iletimini mümkün kılarlar, hedef olmayan bölgelere iletilmeleri engellenerek olası yan etkiler azaltılmaktadırlar. Bu bağlamda farklı teknolojiler kullanılarak büyüme faktörleri yara örtülerine entegrasyonu ile halihazırda yeni sistemler tasarlanmıştır. Büyüme faktörlerini yara ortamında bozunmadan korurken, yaralı dokunun başarılı bir şekilde iyileşmesini sağlamak için hidrojeller, elektrospun nanolifli iskeleler, enjekte edilebilir jeller ve 3D baskılı polimerik iskeleler geliştirilmiştir. Bu sistemlere tekli veya çoklu büyüme faktörleri yüklenmektedir ve yara iyileştirme yetenekleri araştırılmaktadır. Örneğin Lin ve arkadaşları tam kalınlıklı yaraların iyileşmesi için FGF-2 içeren poliüretan hidrojel tasarlamışlardır. İn vivo çalışmalar ile yara iyileşmesinin hızlandığı kanıtlamışlardır. Aynı zamanda ticari yara örtüsü ile karşılaştırdıklarında tasarladıkları hidrojinin yara bölgesinden daha kolay çıkarıldığını göstermişlerdir ve bu da yara örtüsünün değiştirilmesi sırasında yaranın daha fazla etkilenmesini önlemiştir [100]. Bir başka örnek çalışmada ise Nejaddehbash, Fereshte ve arkadaşları elektro-eğirme yöntemi ile gümüş sülfadiazin ve büyüme faktörleri (EGF, bFGF) yüklü nano lifli bir yara örtüsü tasarlamışlardır. Tasarladıkları yara örtüsü ile tam kalınlıklı yaralarda daha hızlı epitelizasyon ve anjiyogenez (damarlanma) olduğunu göstermişlerdir [101]. Bu gibi sistemlerin hazırlanmasında jelatin aljinati dekstran, poliüretan, hyaluronik asit ve kitosan gibi biyoyumlu malzemeler kullanılmaktadır. Bu malzemelerden tasarlanan yara örtülerinin eldesi için büyüme faktörlerini inaktive edebilen organik çözücüler, yüksek elektrik voltajı veya yüksek mekanik stres kullanımı gibi yöntemler içermektedir. Bu yöntemler ile büyüme faktörleri işlevlerini kaybettikleri için yara tedavilerin yüksek bir başarı elde

edilememektedir. Bu amaçla kapsüllenmiş büyüme faktörleri yüklü yara örtüleri araştırılmaya başlanmıştır.

Mikro ve nano enkapsülasyon yüklü yara örtüleri, GF'lerin kronik yaralara gereken sürede iletilmesi için GF'leri korumak için tasarlanmışlardır. GF'lerin tekli ve/veya çoklu olarak mikro ve nano boyutlu partiküllere dahil edilmesi, yara tedavilerinde çok yönlü, yenilikçi yara örtülerininin gelişimini hızlandırmıştır. Bu yenilikçi yara örtülerinde GF'lerin iletimi mikro ve/veya nanokapsüllenmiş sistemlere yüklenen GF'ler kullanılarak kontrollü bir şekilde düzenlenmektedir. Çeşitli in vitro ve in vivo testler gerçekleştirilerek GF'lerin kontrollü salınımı sağlayabilen çeşitli yenilikçi polimerik yara örtüleri geliştirilmiştir. Örneğin bir çalışmada Choi ve arkadaşları yara bölgesinde damarlanmanın sağlanması için iki farklı büyüme faktörü hapseden çekirdek-kabuk mikrokapsüller tasarlamışlardır. Çalışmada mikrokapsüllerin fiziksel ve kimyasal özellikleri dikkatli bir şekilde manipüle edilerek yara bölgesinde damarlanmayı sağlayacak şekilde büyüme faktörlerinin salımları değiştirilmiştir [102]. Bir başka benzer çalışmada ise Losi ve arkadaşları VEGF ve bFGF ile yüklü PLGA Np'leri içeren poli(eter)üretan-polidimetilsiloksan/fibrin bazlı yapı iskelesi geliştirmişlerdir [103]. Çalışma sonucunda tasarlanan GF yüklü PLGA Np'leri içeren iskeler tam kalınlıkta dorsal deri yaralarında, GF içermeyen veya yüklenmemiş PLGA Np'leri içeren iskelelere göre 15.günde yara kapanmasını hızlandırmıştır. Ancak serbest VEGF ve bFGF içeren iskelelere tedavi edilen gruplarda yara kapanma hızı benzerlik göstermiştir. Büyüme faktörlerinin yara bölgesinde iletimlerini kontrollü hale getirmek amacıyla yapılan bir başka örnek çalışma ise Ribeiro ve arkadaşlarının tasarladığı GF içeren kitosan mikropartikülleri yüklü dekstran tabanlı hidrojeldir. Bu hidrojelin ratlara uygulanmasıyla yaralarda hiçbir lokal veya sistemik inflamatuvar yanıt belirtisi olmadan yara iyileşmesini desteklediği kanıtlanmıştır [104]. Bir başka örnek çalışmada ise rhEGF yüklü PLGA nanopartikülleri çift emülsiyon yöntemi ile elde edilmiştir. Nanopartiküller %85.6'lık kapsüllenme verimliliği sergilemiştir. Fakat partiküller in vitro da 24 saat gibi kısa bir sürede salım göstermiştir. RhEGF-PLGA nanopartikülleri,diyabetik farelerde bir kez püskütülmüş ancak 3.gününe kadar herhangi bir iyileşme tepkisine neden olmamıştır. Çalışmanın 7-21 gününde sonra EGF yüklü polimerik partiküller ile tedavi edilen grup tek başına EGF ve PLGA partikülleri ile tedavi edilen grupla karşılaştırıldığında en hızlı yara iyileşme oranını gösterdiğini söylemişlerdir [105, 106]. Literatür daha fazla araştırıldığında büyüme faktörlerinin topikal veya enjeksiyon yoluyla taşınması için lipit bazlı partikül sistemlerinin de çalışıldığı görülmüştür. Örneğin bir çalışmada rhEGF

yüklü katı lipit nanopartiküllerin veya nanoyapılı nanopartiküllerin topikal olarak düşük dozda uygulanmasıyla diyabetik farelerde yeniden epitelizasyon basamağının 8.günde daha belirgin olduğunu göstermişlerdir [107].

2.7 Büyüme Faktörü Dağıtım Sistemleri

Büyüme faktörlerin stabilitelerini geliştirmek ve kontrollü salınımı sağlamak amacıyla birçok ilaç/protein taşıma sistemi geliştirilmiştir. Bu sistemler partiküler sistemler, iskeleler, hidrojeller olarak sınıflandırılmaktadır. İlaçlar ve proteinler gibi etken malzemeler bu polimerik malzemeler ile kapsüllendiğinde ve birleştirildiğinde yara bölgesinde bulunan proteazlar tarafından bozunmaya karşı korunabilmekte ve kontrollü bir şekilde salınması sağlanabilmektedir [108].

Bu sistemler büyüme faktörlerin kısa yarı ömürleri, zayıf in vivo stabiliteleri gibi sınırlamalarının üstesinden gelmektedirler. Tez çalışması kapsamında partikül sistemleri ve hidrojel sistemi çalışılmıştır.

2.7.1 Partiküler Sistemler

Polimer bilimin nanoteknoloji ile birleşmesiyle ilaç taşıyıcı sistemlerde yeni bir araştırma alanı getirmiştir. Doğal ve sentetik polimerlerden veya diğer biyomateryallerden yapılan partikül sistemler, deneysel ve klinik ilaç teknolojisinde büyük avantajlar sunmaktadır. Topikal amaçla uygun bir sistem içerisine kolayca fonksiyonlaştırılması, kontrollü salım sağlayabilmeleri, etken maddelerin verimli ve daha az yan etkiyle uzun süre salım boyutlarına göre mikro ve nanopartikül olarak ikiye ayrılmaktadır, nanometre boyutundaki partiküllere nanopartikül adı verilirken, mikrometre boyutundaki partiküller mikropartikül adını almaktadır.

Belirli bir uygulama için yüzey alanı/hacim oranı, sistemik ve lokal dağıtım, biyolojik bariyeri geçme yeteneği, biyolojik dağılım, etkinliği, ilaç salma özellikleri gibi özellikler partikül boyutu seçiminde önemli olmaktadır [109].

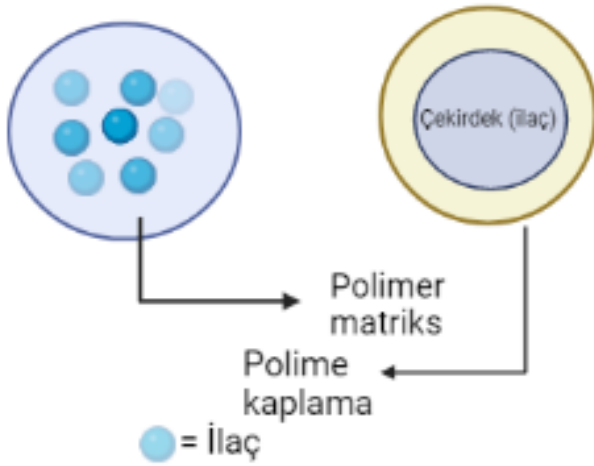
2.7.2 Mikropartiküller

Mikropartiküller, 1 ile 1000 µm arasında değişen ve doğal veya sentetik polimerlerden oluşan partiküllerdir. Bu sistem özellikle uzun süreli kontrollü salınım sağlamaktadır. Aşılarda, nükleik asitler ve proteinler dahil olmak üzere birçok makromoleküllü kapsamakta ve birden fazla yoldan taşınımı ile salınımlarını kontrol etmektedir.

Mikropartiküler ilaç dağıtım sistemi aktif bileşeni çevreleyen bir çekirdek malzeme, aktif malzemeyi dış ortamdan koruyan ve ihtiyaca göre salınımı uzatan bir kaplama malzemedir. Böylece hedef bölgeye dahil edilecek ilaca ve hastalık koşullarına bağlı olarak daha iyi terapötik etki oluşturmak için farklı

polimerler kullanılmaktadır [110]. Mikropartiküler ilaç dağıtım sistemi genel olarak şekil 2.5 'de gösterildiği gibi mikrokapsül ve mikroküre olarak ikiye ayrılmaktadır. Mikroküreler daha küçük boyutlu ve küre şeklinde mikropartiküllerdir. İlacı homojen bir şekilde matris içinde hapseder. Böylece salım birinci dereceden difüzyon şeklinde gerçekleşmektedir. Mikroküler doğal, sentetik veya yarı sentetik polimerlerden sentezlenirler. Geleneksel ilaçların biyoyararlanımı iyileştirmek ve olası yan etkilerini en aza indirmek için önemlidir. Sentezlenen mikrokürelerin bazı özellikleri taşımaları gerekmektedir. Bunlardan başlıcaları; yüksek konsantrasyonda ilacı kapsülleyebilmesi, hedeflenen bölgeye göre boyut dağılımının ayarlanabilmesi, ilacı kontrollü bir şekilde salınımını gerçekleştirebilmesi, dayanıklı olması ve biyolojik sisteme uyumlu olmasıdır [111].

Mikrokapsüller, 1-100 µm boyutlarına sahip partiküllerdir. Biyolojik veya kimyasal olarak bir çekirdeğe sahip ve onu çevreleyen kapsül duvarından oluşmaktadır. Bu duvar çoğunlukla polimerlerden oluşmaktadır [112]. Etkin malzemeler bu sistemlerden çözünme ve difüzyon yoluyla daha yavaş salınmaktadır. Salımı sıfır dereceli kinetiği temsil etmektedir.



Şekil 2-5 Mikrokapsül ve Mikroküre Şematik Gösterimi

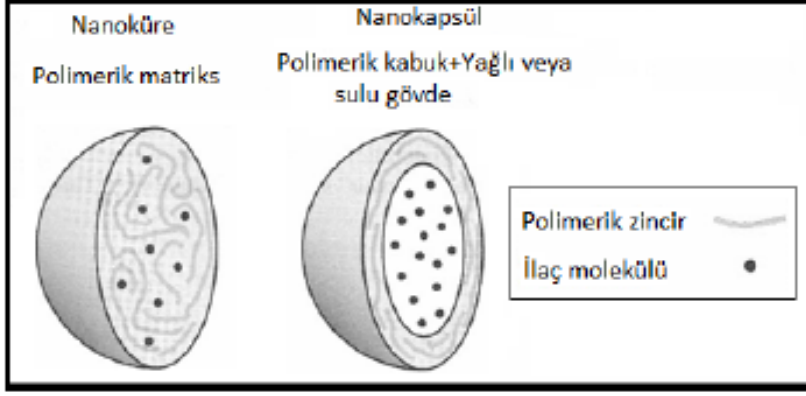
2.7.3 Nanopartiküller

Nanoteknoloji alanındaki ilerlemeler, birçok avantajı ve yeniliği ortaya çıkarmaktadır. Nanoteknoloji alanında nano ölçekte çeşitli türlerde malzemeler üretilmektedir. Nanopartiküllerde 1 nm-1µm arasında boyutlara sahip partiküller olarak tanımlanmaktadır.

Nanotıp ve nanodiyagnoz alanında, NP'ler daha çok çeşitli sistemik engellerin üstesinden gelmek için uygun olan 5~100 nm'lik parçacıklar olarak adlandırılmaktadır [113]. Np'ler, benzersiz fizikokimyasal özellikleri nedeniyle biyomedikal uygulamalarda kapsamlı faydalar göstermiştir. Biyomalzeme bazlı Np'ler, daha etkili, daha az toksik ve terapötik maddelerin istenilen bölgeye taşınması, tıbbi tedavide kullanılması nedeniyle özel ilgi görmüştür [113]. Çözünürlüğü düşük ve biyoyararlığa sahip ilaçların vücutta istenilen bir sürede salımını gerçekleştirmek ve sağlıklı dokulara olan etkilerini azaltmak için nanopartiküller ilaç taşınımı ve dağıtımını amacıyla kullanılmaktadır [114, 115]. Np'ler hidrofobik ilaçları kapsülleyebilir ve kovalent olarak birleştirilebilirler. Ayrıca in vivo da stabilitelerini arttırmak, kan da dolaşım süresini uzatmak için hidrofilik ilaçları veya proteinleri, peptitler nükleik asit gibi biyomakromolekülleri kapsülleyebilirler [113]. Vücuttaki en küçük kılcal damarların çapı 5-6 µm'dir. Kan dolaşımına dağılan partiküllerin boyutları damar tıkanıklığına neden olmaması için 5 µm' den küçük olmalıdır. Bundan dolayı intravenöz uygulamalar için nanopartiküller mikropartiküllere göre daha çok avantajlıdır [116].

Nanopartiküller sentezlenirken biyolojik olarak parçalanabilen malzemelerin kullanılmasıyla istenilen bölgede günler ve haftalar boyunca etken malzemelerin salımına izin verilmektedir [116]. Np'lerin üretilmesinde doğal, sentetik ve yarı sentetik yapıları polimerlerden yararlanılmaktadır. Polimerik Np'ler hazırlama yöntemlerine göre nanokapsül ve nanoküre olmak üzere ikiye ayrılmaktadır. Bu partiküllerde tedavi edici ajan farklı salım özellikleri sergilemektedir [117].

Şekil 2.6'da etrafı bir polimer membran ile çevrili ve tedavi edici ajanı bir boşlukta hapseden veziküler sistem nanokapsülü, tedavi edici ajan fiziksel olarak ve tek dağılım şeklinde dağılmış matriks sistemi de nanoküreler temsil etmektedir [117].



Şekil 2-6 Nanoküre ve Nanokapsül Şematik Gösterimi [101] [114]

Üretildiği malzemenin türüne bağlı olarak nanopartiküller, lipit bazlı Np'ler, polimerik Np'ler, inorganik Np'ler, hibrit Np'ler ve biyolojiden ilham alan Np'ler olmak üzere beş ana kategoride sınıflandırılabilir [118].

2.7.3.1 Polimerik Partiküller

Polimerik nanopartiküller boyutları 10-1000 nm arasında değişen yapılardır. Hem biyotıp hem de biyomühendislik alanında ilgi çeken biyoyumlu sistemlerdir. Polimerik partikül elde edilmesinde günümüzde aljnat, jelatin, kitosan gibi doğal polimerler, polikaprolaktan (PCL), poli laktik-ko-glikolik asit gibi sentetik polimerler kullanılmaktadır. Doğal ve sentetik polimerler ile farklı boyutlarda hazırlanan partiküllere etken maddeler hapsedilebilmektedir. Kronik yaraların iyileşme sürecini hızlandırmak için polimerik partikül sistemleri geliştirilmiştir. Bu sistemler, yara tedavisinde etkili ilaçların ve büyüme faktörlerinin istenilen bölgeye taşınımı ve kontrollü salınımı gerçekleştirerek kronik yaraların iyileşme sürecini hızlandırıcı etkiye sahiptir. Örneğin Zarubova ve arkadaşları kronik yaraların tedavisi için kombine bir taşıma sistemi geliştirmişlerdir. Geliştirdikleri sistem biyopolimer tabanlı (alginat-heparin) VEGF/Gentamisin yüklü mikropartiküllerdir. Tasarlanmış bu partiküller anjiyogenezi teşvik ederken bakteriyel enfeksiyonla savaşabilen ikili dağıtım sistemini önererek kronik yaraların iyileşme sürecini hızlandırmayı amaçlamışlardır [119]. Polimerik partiküller ilgili bir diğer çalışmada Dong ve ark. Sıçanlarda şeker hastalığının neden olduğu ülserleri tedavi etmek için su içinde yağ (W/O/W) çözücü buharlaştırma ile hazırlanan rhEGF yüklü PLGA mikrokürelerini kullanmıştır [120]. Bir başka örnek çalışmada ise Elçin et al. bir iyon değiştirme yöntemi kullanılarak hazırlanan VEGF yüklü aljnat mikroküreler geliştirilmiştir. İn vitro analizler, mikrokürelerin 3. güne kadar çok düşük bir başlangıç

VEGF salım profili ve 4 ila 7 gün arasında kontrolsüz salım sergilediğini göstermiştir [121]. 1997'de gerçekleştirilen bir çalışmada farklı oranlarda PLA/PLGA içeren mikrokürelere GM-CSF kapsüllemişlerdir ve in vitro - in vivo karakterizasyon testleri gerçekleştirmişlerdir [122]. Bir başka örnek çalışmada Shamloo ve arkadaşları tam kalınlıkları yaraların iyileşmesini hızlandırmak için PCL mikrokürelere içeren PVA/kitosan/jelatin hidrojel sistemi tasarlamışlardır. Bu sistem ile tam kalınlı yara bölgesinde bFGF'nin sürekli salımını sağlayarak tam kalınlıklı yaranın hızlı bir şekilde iyileşmesini amaçlamışlardır. İn vitro ve in vivo sonuçlar ile biyouyumlu olan hidrojel ile bFGF'nin tam kalınlıklı yaraların hızlı bir şekilde iyileştiğini kanıtlamışlardır [2].

Son zamanlarda, etken malzemelerin nanometre ölçeğindeki partiküllere kapsüllemesi çalışılmaktadır. VEGF'in yarılanma ömrünü uzatmak ve uzun süre salımını göstermek amacıyla VEGF içine alan PCL nanopartiküller tasarlanmıştır. Sonuçlara göre PCL nanopartiküllerde VEGF'in düşük kapsülleme gösterdiği ve 35.güne kadar sadece %10'unu saldığı gösterilmiştir [65]. Anjiyogenezi yani damarlanmayı tetikleyen bu sayede kan dolaşımını sağlayan büyüme faktörü tedavilerine bir başka örnek Chereddy ve arkadaşlarının yaptığı çalışma verilebilir. Çalışmada PLGA nanopartikülleri tasarlanmıştır. PLGA yapısından bulunan laktatın da yara iyileşmesinde etkisi olduğunu gösterilmiştir. Aynı zamanda PLGA nanopartikül içerisine VEGF kapsülleyerek laktat ve VEGF'in birlikte etki mekanizmasıyla diyabetik ve diyabetik olmayan yaraların iyileşme hızının arttığını kanıtlamışlardır [123].

Literatürde GM-CSF'nin partikül içerisine kapsüllendiği ve in vitro testlerin gerçekleştirildiği yeteri kadar çalışmaya rastlanılmamıştır. Örneğin Dehkordi ve arkadaşlarının çalışmasında GM-CSF yüklü kitosan nanopartikülleri içeren nanokristal selüloz ile güçlendirilmiş yeni bir hiyalüronik asit bazlı kompozit yara örtüsü geliştirilmiş ve yara iyileştirme hızı incelenmiştir. Çalışmanın sonuçlarına bakıldığında GM-CSF yüklü yara örtüsü ile tedavi edilen yaralarda düşük inflamatuvar reaksiyon oluştuğunu ve yeniden epitelizasyon aşamasının hızlandığı, granülasyon dokusunun oluştuğu gösterilmiştir [124]. PLGA ve PCL polimeri büyüme faktörlerinin taşınımında sıklıkla kullanılan polimerlerden biridir. Örneğin Chereddy ve arkadaşlarının çalıştığı bir çalışmada antimikrobiyal ajanları içine alan polimerik nanopartiküllerden yararlanmışlardır [125]. PLGA nanopartiküllerden yararlanan çalışmada iyileşme sürecini hızlandıran bir taşıyıcı sistemini ispatlamışlar. Chu ve arkadaşlarının yaptığı bir çalışmada rhEGF yüklü PLGA nanopartiküller elde edilmiştir. Bu partiküller çift emülsiyon buharlaştırma yöntemi ile sentezlenmiş ve %85,6'lık yüksek bir kapsülleme

elde etmişlerdir [105]. rhEGF nanopartiküllerin, tam kalınlıkta yaraları olan diyabetik sıçanlarda fibroblast proliferasyonunu desteklediği ve iyileşme oranlarını arttırdığını kanıtlamışlardır [90].

Polimerik partiküllerde hidrofilikliğı arttırmak ve bu sayede etken malzemelerin kapsüllenmesini arttırmak için lipitlerden yararlanılmaktadır. Örneğin Martinez ve arkadaşlarının yaptığı bir çalışmada sığır serum albumin'nin surfaktanların ve lipidin karbonil kuyrukları arasında hidrofobik etkileşimler oluşturarak nanopartiküllere dahil ederek kapsüllenme verimini arttırdığını göstermişlerdir [126].

Tez çalışmasında da farklı oranlarda (100 mg, 200 mg, 500 mg) lesitin kullanılarak kapsüllenme oranı arttırılmaya çalışılmıştır.

İlaç taşıyıcı sistemlerde sıklıkla kullanılan, sentetik polimer olan polikaprolaktan (PCL) biyobozunurluğu ve biyoyumluluğu nedeniyle daha çok tercih edilmektedir. En önemli avantajlarından biri etken maddelerin uzun süreli (21 gün) kontrollü salımlarını gerçekleştirilmesidir. PCL, polilaktitlere kıyasla daha kararlı olduğu için monomer başına daha az ester bağına sahiptir ve bu nedenle PCL zincir fragmanlarının vücutta enzimatik olarak hidrolize olması için daha uzun sürmektedir [127]. Bir diğer avantajı bozduğunda toksik olmayan bozunma ürünleri ortaya çıkarması ve ürünlerin vücut tarafından tamamen ortadan kaldırılmasıdır.

2.7.3.2 Polimer-Lipit Hibrit Nanopartiküller

Polimerik nanopartiküller (NP'ler), ilaçlar, genler ve proteinler gibi terapötik malzemelerin taşınımı için kapsamlı bir şekilde geliştirilmiştir. Fakat polimerik partiküllerin sentezlenme sırasında toksik organik çözücülerin kullanımı, hidrofilik ilaçların düşük kapsüllenmesi gibi çeşitli sınırlamaları vardır[128]. Polimerik partiküller hidrofilik ilaçların ve proteinlerin patlama salınımına da yol açmaktadır. Literatürde lipitler, lipozomlar ve katı lipit nanopartiküller (SLN), nanoyapılı lipit taşıyıcılar ve lipit-ilaç konjugatı, çeşitli ilaç dağıtım sistemlerinde yıllarca kullanılmaktadır. Lipozom en az bir çift lipit tabakasından oluşan bir ilaç taşıyıcı sistemidir. Kesecik olarak da adlandırılmaktadır. Lipozomların birçoğu biyoyumludur, biyolojik olarak parçalanabilir ve toksik değildir. Yapısında bulunan lipit bileşenleri doğal kaynaklardan geliyorsa canlı vücudunda immünojenik değildir. Ancak lipozomal ilaç taşıyıcı sistemlerinde etken malzemelerin düşük stabilitesi, üretim ölçeğinin büyütülmesi ve tekrarlanabilmesinde sınırlamalar mevcuttur [129]. Protein taşınımı ve salınımı için lipitlerin kullanıldığı sistemler mevcuttur. Katı lipit nanopartiküller (SLN), nanoyapılı lipit taşıyıcılar (NLC)

ve lipozomlar protein taşınımı ve salınımı için tercih edilen sistemlerden bazılarıdır. Fakat bu lipit temelli taşıyıcı sistemlerin, deri yüzeyinde kısıtlı ilaç dağıtımı, suda çözünür proteinlerde düşük kapsülleme verimliliği ve kontrollü ilaç salımı olmaması gibi dezavantajları mevcuttur [130, 131]. Lipozomlardaki bu gibi dezavantajları SLN'lerin kullanılmasıyla en aza indirilmiştir. Örneğin bir çalışmada Serpe ve arkadaşları tarafından araştırılan çalışmada doksorubisin yüklü SLN, doksorubisin'nin PEG'lenmiş lipozomal ve tek başına doksorubisin hücre içi birikimi ve sitotoksik aktivitesi araştırılmıştır. Çalışmanın sonuçları doksorubisin yüklü SLN'nin belirli hücrelerde tek doksorubisinin veya lipozomal doksorubisinin daha güçlü bir şekilde inhibe ettiğini ve SLN için IC50 değerinin de önemli ölçüde düşük olduğunu göstermiştir [132].

Polimerik partiküllerin ve lipit temelli taşıyıcı sistemlerin yukarıda bahsedilen kısıtlamaları nedeniyle bu taşıyıcıların birleşmesi ile dezavantajlarının üstesinden gelmeye çalışılmıştır. Bu çalışmalarla yeni bir taşıyıcı sistem geliştirilmiştir. Bu sistem lipitlerin biyomimetik özellikleri ve polimer çekirdeğin mimari avantajı ile yeni bir ilaç taşınım sistemi oluşturmak için lipozomların ve polimerik partiküllerin birleştirilmesiyle oluşturulmuştur. Sistem polimerik partiküllerin hem de lipit temelli taşıyıcı sistemlerin olumlu özelliklerini birleştiren lipit-polimer hibrit nanopartiküller (LPN'ler)'dir. LPN'ler lipitler tarafından sarılmış polimerik nanopartiküllerdir. Bu nanopartiküller üç bileşenden oluşmaktadır. Bu bileşenler; (1) hidrofobik polimerik çekirdek, (2) polimerik çekirdek içinde etken malzemelerin tutulmasını sağlamak için biyoyumlu lipit tabakasından oluşan lipit tabakası, (3) nanopartiküllerin stabilitesini arttırmak için lipit tabakanın dışında bir hidrofilik polimerdir [133]. Yapıdaki polimer etken malzeme salınımı kontrol etmekte lipit ise etken malzemenin kapsülleme verimliliğini arttırmaktadır [134]. LPN'ler polimerik partiküller ve lipozomlardan daha fazla in vivo hücresel dağıtım yeteğine sahiptir [134]. Lipit-polimer hibrit nanopartiküllerin en büyük avantajı suda çözünürlüğü yüksek olan etken malzemelerin (proteinler, genler, sitokinler, ilaçlar) kapsüllemesi ve salımlarının kontrollü bir şekilde gerçekleştirilmesidir. Biyolojik olarak parçalanabilen polimerlerde genellikle polilaktik-ko-glikolik asit (PLGA), polikaprolakton (PCL), dekstran veya albümin tercih edilmektedir. Tercih edilmelerinin nedeni biyoyumlu olmaları, biyolojik olarak parçalanabilmeleri, toksik olmamalarıdır. Lipitlerde genellikle zwitterionic, katyonik, anyonik lipitler kullanılmaktadır. Lesitin, 1, 2-dipalmitoil-sn-glisero-3-fosfokolin (DPPC), 1,2-dipalmitoil-3-trimethylammonium-propane (DPTAP), 1,2-dioleoil-3-trimethylamonyum-propan (DOTAP) ya da 1,2-dioleoil-sn-glisero-3-fosfoetanolamin (DOPE) kullanılan lipitlerden bazılarıdır.

Lipit-polimer hibrit nanopartiküller yapılarına göre sınıflandırılmaktadır. Sınıflandırma polimer çekirdek lipit kabuk tipi, çekirdek kabuk tipi içi boş lipit polimer lipit nanopartikül, eritrosit zarı ile kamufle edilmiş polimerik nanopartiküller, monolitik lipit polimer hibrit partiküller ve polimer kafesli lipozomlar şeklindedir. Polimer çekirdek-lipit kabuk tipi hibrit partiküller lipit katmanları ile kaplanmış polimer partiküllerden oluşan sistemlerdir. Literatürde tümör hücreleri için hedeflendirilmiş lipit kaplı nanopartikülleri geliştirmişlerdir. Nanopartiküller ile tümör nekroz faktörü içselleştirilmiş ve tümör hücrelerine iletimi sağlanması amaçlanmıştır [135]. Çekirdek-kabuk tipi içi boş lipit-polimer-lipit nanopartiküller de aynı merkezli lipit tabakası ile kaplı içi boş iç çekirdek ortada polimerik tabaka en dışta tekrar lipit-PEG ile lipit tabakasından oluşan sistemlerdir. Literatürdeki örnek çalışmada siRNA'nin kapsüllenmesi ve taşınması için bu sistem geliştirilmiştir. Shi ve arkadaşları önceki lipit-polimer hibrit partikül sistemlerinden farklı olarak dört farklı bileşenden oluşan sistemi geliştirmişlerdir. Çekirdek polimerik tabaka olarak PLGA polimerinden yararlanmışlardır. En dış katmanda da lipit-PEG'lerden yararlanmışlardır [136]. Bir diğer hibrit yapı nanopartiküller eritrosit zarı ile kamufle edilmiş polimerik nanopartiküllerdir. Bu partiküller 100 nm altında boyutlara sahiptir ve eritrosit zarının karmaşık yüzeyini taklit etmek için RBC membrandan türetilen veziküllerden oluşmaktadır. Biyomimetik nanopartiküller olarak da adlandırılmaktadır [137]. Monolitik polimer lipit hibrit partiküller ise lipit moleküllerinin polimerik bir matris içine dağılmasıyla oluşan partiküllerdir. Polimer kafesli lipozomlardan oluşan hibrit partiküller lipozomların stabiliteğini korumak için geliştirilen sistemlerdir. Bu sistemler, polimerler lipozomların yüzeyine sabitlenmiş ve aşılabilir olarak sentezlenmektedir. Literatürde bu sistemle meme kanseri tedavisi üzerine çalışılmıştır. Lee ve arkadaşlarının geliştirdiği sistem pH'ya duyarlı polimer kafesli nanobinlerdir. Polimer kafesli nanobinlere bir kanser ilacı olan doksorubisin yüklenerek in vivo da tedavisi değerlendirilmiştir. Çalışmada geliştirilen ilaç taşıyıcı sistemin kanser tedavisinde potansiyel faydası olduğu kanıtlanmıştır [138]. Literatürde polimer-lipit hibrit partiküllerin optimizasyon çalışmaları ve belirli hastalıkların tedavisinde kullanıldığı birçok çalışma mevcuttur. Örneğin Devrim ve arkadaşları lizozim yüklü lipit-polimer hibrit nanopartiküllerin hazırlanması, karakterizasyon ve stabilite çalışmalarını gerçekleştirmişlerdir. Polimerik çekirdek materyali olarak PCL ve lipit tabakası olarak tripalmitin:leçitin karışımı ile hazırlanan LPNP'lerin, protein taşınımı için umut verici yeni bir sistem olabileceği sonucuna varmışlardır [14]. Örneğin güncel bir çalışmada fluoksetin hidroklorür yüklü lipit-polimer

hibrit partiküllerin, SARS-CoV-2 enfeksiyonuna karşı olası etkinlik gösterdiğini kanıtlamışlardır. Khater ve arkadaşlarının gerçekleştirdiği çalışmada tek veya tek katmanlı lipitlerle çevrili polimerik çekirdekten oluşan hibrit partikülleri iyi biyoyumluluk ile hidrofilitik, lipofilitik ve amfifilitik ilaçları kapsülleyebilmesi ve farklı hedefleme ligandları ile kolayca geliştirebildikleri için tercih etmişlerdir [139].

LPNP'lerin yara tedavilerinde kullanıldığı ayrıca çalışmalar literatürde mevcuttur. Thakur ve arkadaşları fusidik asit yüklü lipit-polimer hibrit nanopartiküllerin MRSA ile enfekte olmuş yanık yara modeli üzerine araştırma çalışması gerçekleştirmişlerdir. Dermatokinetik profili incelenmiştir. Fusidik asit yüklü partikülleri karbopol jel içerisine koyarak yara bölgesine topikal olarak uygulanmasını sağlamışlardır. Daha iyi geçirgenlik özelliği taşıdığını göstermişlerdir. İn vitro ve in vivo çalışmalarla hibrit partikül yüklü jel sisteminin nemli ortam oluşturarak ve bakteriyel enfeksiyondan korunma sağlayarak MRSA ile enfekte olmuş yanık yaralarının tedavisi için etkili bir sistem olduğunu kanıtlamışlardır [140]. Yara tedavisini içeren bir başka örnek çalışmada Jangde ve arkadaşları biyoaktif ilaçların topikal taşınımı için hesperidin yüklü lipit polimer hibrit nanopartiküller ile çalışmışlardır. Hesperidin yara iyileştirme özelliği gösteren bir maddedir. Ancak hesperidin topikal olarak uygulandığında biyoyararlanımı sınırlıdır ve bu nedenle terapötik etkinliği düşüktür. Tedavi edici özelliği geliştirmek için yeni bir taşıyıcı sisteme gerek duyulmuştur. Çalışmadaki amaç da hesperidin yüklü lipit-polimer hibrit nanopartiküller (HLPN) geliştirmek ve Hesperidin'in yara yatağındaki endojen bölgedeki iletimini ve etkinliğini artırmaktır. Sonuçlara göre HLPN'lerin ilacın yara bölgesinde sürekli salınımı sağlayabildiği ve in vitro da güçlü antioksidan aktivite sergilediğini göstermişlerdir [141]. Bu tez çalışmasında da LPNP'lerin tüm bu avantajları nedeniyle hibrit nanopartiküllerin hazırlanmasında PCL ve 1:1 oranında lesitin ve gliseril monostearat kullanılmıştır.

LPNP'lerin yapısı karmaşık olmasına rağmen, LPNP'lerin hazırlanma yöntemleri oldukça basittir ve hem lipitlerin hem de polimerlerin çok yönlülüğü sayesinde gelecekte çok çeşitli polimer-lipit hibrit sistemlerinin üretimini arttırmada önemli rol oynamaktadır. LPNP'lerin sentezlenme yöntemleri aşağıda ayrı başlık altında incelenmiştir.

2.7.3.2.1 Polimer-Lipit Hibrit Partiküllerin Sentezlenme Yöntemleri

Lipit polimer hibrit partiküller genellikle tek aşamalı sentez ve iki aşamalı sentez olmak üzere iki farklı yöntem ile hazırlanmaktadır.

İki Aşamalı Sentez Yöntemi

İki aşamalı sentez yöntemi çift katmanlı veya çok katmanlı bir lipit kabuk ile hibrit partikülleri hazırlamak için kullanılır. Bu yöntemde, polimer çekirdek emülsiyon metodu yüksek basınç homojenizatör metodu nanoçökeltme metodu kullanılmaktadır [142-144]. Polimer çekirdek emülsiyon metodunda polimer çekirdek sentezinde istenilen boyutlarda ve ilacın hidrofobiliğini geliştirmek için çeşitli metodlar kullanılmaktadır. İlaç, organik bir çözücü içinde polimer ile karışabiliyorsa veya polimer zincire kovalent olarak konjuge edilmişse, ilaç yüklü polimer çekirdeğini sentezlemek için genellikle tek emülsiyon yöntemi (W/O) kullanılır [145, 146]. Tek emülsiyon yöntemi kısaca, ilaçlar ve polimerler suyla karışmayan bir organik çözücü içinde çözülür ve yağ fazı oluşturulur. Oluşan yağ fazı uygun emülgatör içeren sulu çözeltiye eklenir ve ardından yüksek hızlı homojenizasyon ile tek emülsiyon oluşturulur.

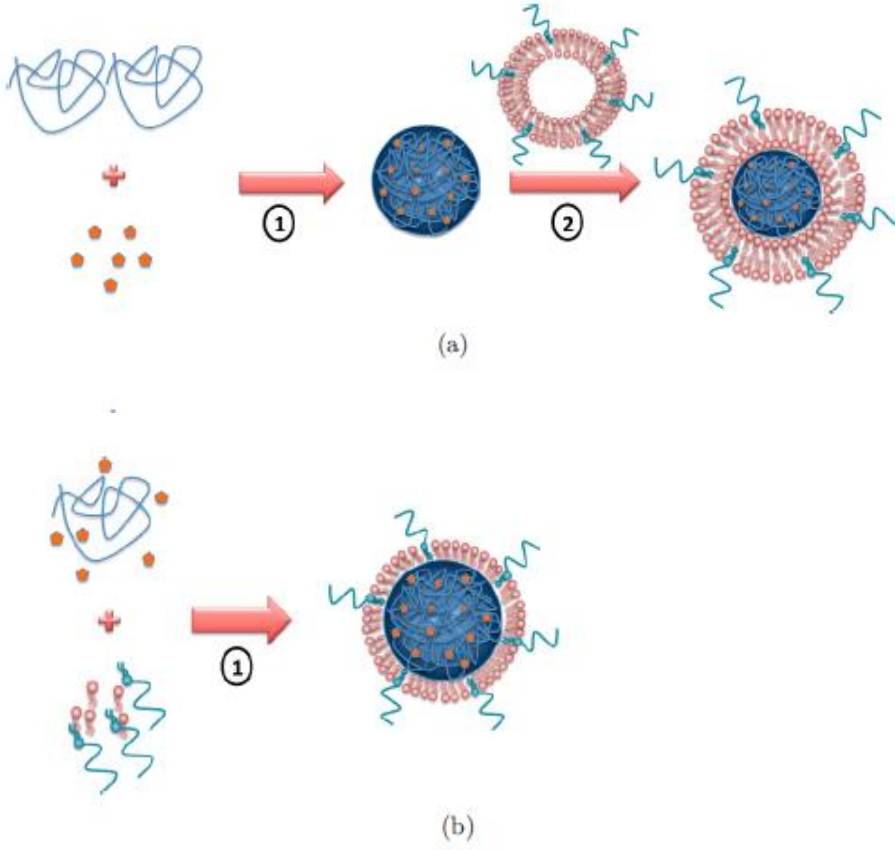
Etkin maddeler hidrofilikse ve suda karışmayan organik çözücü içinde çözilemiyorsa, polimer çekirdeği hazırlamak için yağ içinde su içinde yağ (w/o/w) çift emülsiyon yöntemi gereklidir [147, 148]. Yöntem kısaca şu şekilde açıklanabilir bir yağ içinde su (w/o) emülsiyonu, polimer içeren organik çözücüye sulu çözelti halinde olan etken malzeme ilave edilerek oluşturulur. Birinci emülsiyon elde edilir. Elde edilen emülsiyon (w/o) daha sonra çift emülsiyonu (w/o/w) oluşturmak için dış faz olan ikinci su fazına eklenir. Oluşturulan çift emülsiyonda çözücü uzaklaştırılarak emülsiyon sertleştirilir ve partiküller elde edilir. Bu işlemler genellikle homojenizasyonlar ile gerçekleştirilir. İşlem sonunda polidispersite indeksi yüksek büyük partiküller elde edilir. Bu aşamadan sonra polimer-lipit hibrit partiküller elde etmek için polimerik partiküller ile lipit filmler veya lipozomlar karıştırılır. Yöntemi kısaca açıklamak gerekirse lipit bileşenler organik çözücü içinde çözdürülür. Lipit filmler oluşturulur ve polimerik partiküller ile karıştırılır. Daha sonra yüksek basınçlı homojenizasyon, yüksek hızlı vorteksleme gibi karıştırma ile lipit filmler ve lipozomlar çekirdek olan polimer partiküllerin yüzeyine birleşir ve böylelikle polimer lipit hibrit parçacıklar elde edilir [149].

Tek Aşamalı Sentez Yöntemi

Lipit-polimer hibrit partikülleri hazırlarken kullanılan tek aşamalı sentez yöntemi bir lipit tek katmanlı kabuk oluşturmaktadır. Bu yöntemde polimerler ve hidrofobik ilaçlar suyla

karışabilen organik çözücü içinde çözdürülür ve sulu bir çözelti içinde çözdürülen lipitler ve lipit PEG eşlenikleri içerisine damla damla eklenir. Polimerik partiküller oluşmaya başlar. Lipitler ve lipit PEG polimerik partiküllerin yüzeyine kendiliğinden birleşir. Lipitlerin hidrofobik kuyrukları polimer çekirdeğe yapışacak ve lipitlerin hidrofilik baş grubu dış sulu ortama doğru olacaktır. Lipit ve lipit PEG'lerin bu şekilde kendiliğinden birleşmesiyle polimer-lipit partiküller oluşmaktadır. Bu nedenle tek adımlı sentez yöntemi uygun maliyetli, ölçeklenebilir bir yöntemdir. Literatürde de daha çok tercih edilen bir yöntemdir. Örneğin bir çalışmada Devrim ve arkadaşları lizozim yüklü lipit-polimer hibrit nanopartiküllerini çift emülsiyeye çözücü buharlaştırma yöntemi ile sentezlemişlerdir. Çalışmadaki amaç model protein olarak lizozimin taşınımı ve salınımı sağlamak için lipit-polimer hibrit nanopartikülleri geliştirmek ve karakterize etmektir [14]. Bir başka çalışmada Tahir ve arkadaşları meme kanseri tedavisi için hidrofilik ve lipofilik doksorubisinin kontrollü dağıtımı için lipit-polimer hibrit nanopartikülleri tek aşamalı modifiye edilmiş nanoçökeltme yöntemiyle üretmişlerdir. Belirli optimizasyon çalışmaları ile lipit-polimer hibrit nanopartiküllerin, meme kanseri hücrelerinde DOX'un hem hidrofilik hem de lipofilik formunun güvenli taşınımı ve kontrollü salımı için olası bir ilaç salım sistemi tasarlamışlardır [150].

Her iki sentez yönteminin şematik gösterimi şekil 2.7'de gösterilmiştir.



Şekil 2-7 Lipit-Polimer hibrit partiküllerin sentezlerinin şematik gösterimi a) İki aşamalı Sentez Yöntemi b) Tek aşamalı Sentez Yöntemi

2.8 Büyüme Faktörü Taşınımı için Sentetik Polimerler

Polimerler ilaç taşınımı alanında oldukça önemli malzemelerdir. Polimer bilimindeki gelişmeler farklı yeni ilaç dağıtım sistemin geliştirilmesine neden olmuştur. Polimerler doğal ve sentetik polimer olmak üzere ikiye ayrılmaktadır. Doğal polimerler protein temelli ve polisakkarit temelli olarak alt dallara ayrılmaktadır. Protein temelli polimerlere kollajen, albumin, jelatin örnek verilebilir. Polisakkarit temelleri olanlara ise aljinat, siklodekstrin, kitosan, dekstran, hiyalüronik asit gibi polimerler örnek verilebilir. Sentetik polimerler ise biyolojik olarak parçalanabilir ve parçalanamaz olarak ikiye ayrılırlar. Polikaprolakton (PCL), poli laktik-ko-glikolid (PLGA) gibi polimerler biyolojik olarak parçalanabilenlere örnek olarak verilebilir [151].

Proteinler çeşitli tedavi edici özellikleri nedeniyle ilaç pazarında önemli bir yer bulmuşlardır. Ancak bu proteinlerin hedef bölgeye taşınmasında bazı güçlükler ile karşı karşıya kalınmaktadır. Tedavi edici proteinlerin geliştirilmesindeki bir başka zorluk ise

bu proteinleri uzun süre stabilitelerini koruyamamalarıdır. Vücut sıvılarına maruz kaldıklarında birkaç saat içinde bozulabilmektedirler. Terapötik proteinleri vücut sıvılarından korumak için taşıyıcı sistem olarak polimerler araştırılmıştır [152].

2.8.1 Poli (laktit-ko-glikolid) (PLGA)

Poli (laktik-ko-glikolik asit) (PLGA), poli laktik asit (PLA) ve poli glikolik asidin (PGA) bir alifatik polyester kopolimeridir. Biyouyumluluk ve biyobozunurluk özelliğine sahip FDA onaylı polimerler ailesine aittir. PLGA, terapötik malzeme taşıyıcı olarak sürekli salım profilleri gibi potansiyel sergilediği için, proteinlerin ve peptitlerin taşınımı için yaygın olarak kullanılmaktadır. Örneğin Dong ve arkadaşları kronik diyabetik yaraların tedavisi için su içinde yağ içinde su ekstrasyon-buharlaştırma yöntemi ile rhEGF yüklü PLGA mikrokürelerini sentezlemişlerdir. Çalışmada saf rhEGF ile tedavi karşılaştırıldığında, mikrokürelerin in vitro da fibroblast proliferasyonunu arttığını ve in vivo da yara iyileşmesini hızlandırdığını ispatlamışlardır [120]. PLGA ayrıca çeşitli özelliklere sahip çok yönlü partikül oluşturmak için diğer polimerler ile birleştirilebilmektedirler.

2.8.2 Poli-ε-kaprolakton (PCL)

Polikaprolakton (PCL) 1930'larda Carothers ve arkadaşları tarafından sentezlenmiştir. Polimer tabanlı ilaç taşıyıcı sistemlerde sıklıkla kullanılan sentetik polimerlerden biridir. Poli-ε-kaprolakton, yarı kristal, hidrofobik, biyolojik olarak parçalanabilen ve biyolojik olarak uyumlu bir polyesterdir [153]. PLGA 'dan daha yavaş bozunma oranına sahiptir bu nedenle uzun süreli salım profillerine ihtiyaç duyulduğunda PCL tercih edilmektedir. Ayrıca PCL'nin bozunması proteinlerin yapısını ve özelliklerini bozabilecek asidik bir ortam oluşturmamaktadır [128].

PCL'nin bozunma hızı bazı değişkenlere bağlıdır. Bu değişkenler molekül ağırlığı kristalinite ve bozunma şartlarıdır. PCL'in bozunma süresi bozunma hızına bağlı olarak değişkenlik gösterebilir. Bir ayda da bozunabilirken bir yılı aşkın sürede de bozunmayıp ilaç salımı gerçekleştirebilmektedir.

2.9 Hidrojeller

Hidrojeller su ve biyolojik sıvıları absorbe özelliğine sahip ve çözünmeyip yapılarını kaybetmeyen hidrofilik üç boyutlu polimerik yapılardır [154]. Polimer zincirlerinin ajanlar ile çapraz bağlanması ile yapıları üç boyutlu olmaktadır [155]. Çok su içeren yapısından dolayı biyolojik dokulara benzemektedirler, bu sayede biyomimetik uygulamalarda, yapay doku ve organlar için iskele geliştirmek için kullanılmaktadır. Mekanik özellikleri, biyobozunurluk, biyouyumluluk, reolojik özellikler, termal ve pH stabiliteyi gibi çeşitli fiziko-kimyasal özellikleri değiştirebildiği için biyomedikal uygulamalarda önemli hale gelmişlerdir. Ticari ürün olarak ilk hidrojel kontakt lenslerdir. Kontakt lens yapımında en çok hidroksi etil metakrilat (HEMA) hidrojelleri kullanılmaktadır. Çeşitli polimerler ile hidrojeller hazırlanmaktadır. Bu polimerler doğal, sentetik ve monomer olabilmektedir.

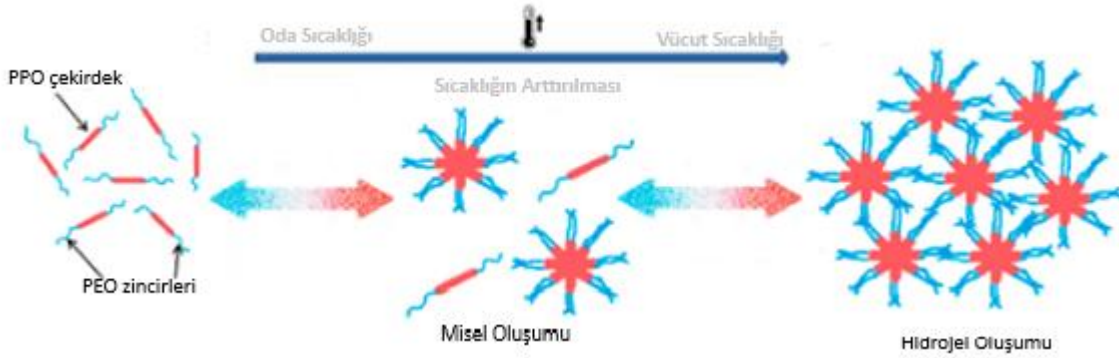
Hidrojeller tıp,eczacılık, kozmetik kimya gibi farklı alanlarda kullanılmaktadır [156]. Kontrollü ilaç salım sistemlerinde oral, oküler, epidermal ve deri altı uygulamalarında kullanılmaktadır. Etken malzeme yüklü hidrojellerde etken malzemelerin salım hızları kontrol edilebilmekte böylece ilaç uygulama yöntemlerinin eksiklikleri giderilmektedir. Ayrıca ilaçların yan etkileri ve toksisitelerini azaltmaktadır [157].

Biyokimyasal ve mekanik özelliklerinden dolayı yara örtüsü alanı hidrojellerin kullanıldığı alanlardan birisidir. İyi hidrofilikleri, üç boyutlu gözenekli yapıları nedeniyle ideal yara örtüsü adayı haline gelmiş ve birçok araştırmacının dikkatini çekmiştir. Kitosan, jelatin, hyaluronik asit, aljinat ve dekstran gibi doğal polimerler ve poli(etilen glikol) (PEG) ve poloksamer, poli(vinilalkol) gibi sentetik hidrofilik polimerler, olefin içeren polimerize monomerler gibi birçok hidrofilik polimerler, poliakrilamid (PAM), poli(akrilik asit) ve polipeptitler, çeşitli kimyasal veya fiziksel çapraz bağlama metodu ile hidrojel oluşturmak için kullanılmaktadırlar [158]. Oluşturulan hidrojeller biyouyumlulukları ve yüksek su tutma kapasitesinden dolayı yara bölgesini nemli tutmaktadırlar ve yara yatağının enfeksiyon riskini azaltmaktadırlar. Yara iyileşme sürecini hızlandırmak için veya şu anda kullanılan yara örtüsü malzemelerin tedavi edici özelliklerini geliştirmek için polimer bazlı terapötik malzemeler yüklü hidrojeller hakkında birçok çalışma yapılmıştır. Bu hidrojellere hücreleri, sitokinleri ve ilaçları yükleyerek yavaş ve kontrollü salımlarıyla yara iyileşmesine katılabilir, inflamasyon, anjiyogenez ve granülasyon dokusunun oluşumunu düzenleyen çok sayıda hücre-sinyal iletim yolunu aktive edebilmektedir [159].

Yara tedavilerinde farklı işlevlere sahip hidrojeller tasarlanmıştır. Bunlar antibakteriyel hidrojel, yapışkan hemostatik hidrojel, kendi kendine iyileştiren hidrojel, iletken hidrojel, yarayı izleme yeteneğine sahip hidrojel ve kontrollü dağıtım ve salım özelliğine sahip hidrojel yara örtüleri olarak adlandırılmaktadır. Tez kapsamında kontrollü salım özelliğine sahip hidrojel yara örtüsü çalışılmıştır. Bu özelliğe sahip hidrojeller gözenekli yapısı ve çok çeşitli maddelerin yüklenmesiyle ve istenilen bölgeye kontrollü bir şekilde serbest bırakması nedeniyle yaralar için uygun hale gelmiştir. Hidrojellere yüklenen etken maddeler arasında ilk sırada ilaçlar yer almıştır. Yüklenen ilaçların çoğu antibakteriyel özellikte olan antibiyotiklerdir. Yara iyileşmesi keratinosit, fibroblastlar, endotel hücreleri, nötrofiller ve makrofajlar dahil olmak üzere çeşitli hücre tipleri arasında hücrelerel etkileşimleri gerektirmektedir bunun içinde büyüme faktörlerin, sitokinlerin ve kemokinlerin endojen salımları düzenlenmelidir. Bu nedenle yara iyileşmesinde gerekli olan sitokinlerin, büyüme faktörlerin lokal olarak verilmesi yara iyileşmesini hızlandırma bir avantaj sunmaktadır. Kök hücre türleri arasında adipozdan türetilen kök hücreler (ADSC'ler) de etkili bir hücre tedavisi sağlamaktadır. Bu tür kök hücreler doku rejenerasyonunu teşvik etmek için anjiyogenezi ve yeniden epitelizasyonu uyarak yara onarımında gerekli faktörleri salgılayabilmektedirler. Bu nedenle, hücre yüklü hidrojel yara örtüleri en yaygın kullanılan yara örtüleri haline gelmiştir [158]. Örneğin Lin Kaisang ve arkadaşları Pluronik F127 hidrojelde gömülü adipoz türevli kök hücrelerin diyabetik yaranın iyileşmesini desteklediğini göstermişlerdir [160]. Fibroblastlar kollajen I gibi hücre dışı matris molekülleri ürettikleri ve temel büyüme faktörleri salgıladıkları için yara tedavisinde önemli bir işlevi vardır. Fibroblast kaynaklı faktörler, endotel hücrelerinin gelişmeye başlaması, epitelin yaranın merkezine doğru gelişmesiyle yara iyileşmesini hızlandırması için gereklidir. Bu amaçla Amir Shamlo ve arkadaşları tam kalınlıklı yaraların iyileşmesini hızlandırmak için fibroblast büyüme faktörünün sürekli salımını sağlayan hibrit hidrojel/mikroküre sistemi tasarlamışlardır. İn vivo sonuçlar tasarladıkları hibrit hidrojel/mikroküre sisteminin biyoyumluluğu ve bFGF'nin kontrollü-sürekli salımının tam kalınlıklı yaraların iyileşmesine önemli ölçüde katkıda bulunduğunu göstermişlerdir [161].

Biyomedikal alanda lokal ilaç taşıyıcı olarak ısıya duyarlı hidrojeller kullanılmaktadır. Bu hidrojeller farklı sıcaklıklarda çözelti-jel geçişi (sol-gel transiton) sunmakta ve etkin maddeyi kontrollü bir şekilde salımını ve istenilen bölgede kalmasını sağlamaktadır. Literatürde ısıya duyarlı jeller için poloksamerler kullanılmaktadır. Poloksamerler su molekülleri ile kararlı hidrojen bağları oluşturmaktadır. Bundan dolayı düşük

sıcaklıklarda daha hızlı çözünmektedirler. Sıcaklık arttıkça hidrojen bağları zayıflamakta ve kendiliğinden birleşerek küresel miselleri oluşturmaktadırlar. Sıcaklığın daha fazla yükselmesiyle miseller gitgide büyümekte ve birbirlerine dolanarak üç boyutlu bir jel yapısını oluşturmaktadır [161] [162] [163]. Bu değişimlerle poloksamer ailesinden farklı konsantrasyonlarda hazırlanan jeller +4°C 'de akışkan halde dururken vücut sıcaklığına yakın sıcaklıklarda viskoz hale gelerek jelleşmektedirler. Şekil 2.8'de hidrojel oluşumunun şematik gösterimi gösterilmiştir.



Şekil 2-8 Hidrojel Oluşumunun Şematik Gösterimi [160]

Bu jeller herhangi bir kimyasal reaksiyon olmadan basit bir şekilde hazırlanmaktadır. O yüzden yapı in vivoda sitotoksik özellik göstermemektedir. Pluronic F127 (PF-127) ısıya duyarlı hidrojel tasarlanmasında kullanılan en önemli poloksamerlerden biridir. İntamüsküler, intraperitoneal ve subkutan enjeksiyonlar gibi topikal ilaç dağıtımda uygulanmaktadır [164]. Örneğin Nasir ve arkadaşları antiinflamatuvar bir ilaç olan diklofenak sodyum için bir sistem geliştirmişlerdir. Bu sistem ısıya duyarlı jel ile ilaç taşınımı ve salımını içermektedir. Geliştirilen sistem ile diklofenak sodyum deri altı enjeksiyon aracılığıyla tavşanlara verilerek farmakokinetik etkileri araştırılmıştır. İn vitro ve in vivo deneylerindeki sonuçlarla %20 konsantrasyonda poloksamer 407'den oluşan ısıya duyarlı jel sisteminin ilaç salımını uzatmak ve ilacın kandaki terapötik etki süresini uzun süre korumak (144 saat) için başarılı bir formülasyon olduğunu ortaya koymuşlardır [165]. Başka bir örnek çalışmada Gao ve arkadaşları tümör tedavisi için kurkumin yüklü enjekte edilebilir ısıya duyarlı bir jel sistemi geliştirmişlerdir. Bu sistem ile in vitroda kurkuminin uzun süreli ilaç salımı gerçekleştirilmiş ve çözünürlüğü arttırılmıştır. Kurkumin yüklü ısıya duyarlı jelin farelerde katı tümörlerinin büyümesini etkili bir şekilde engellendiğini kanıtlamışlardır [166].

Sıcaklığa duyarlı jellerin kullanıldığı bir diğer etken madde taşıma sistemi deri altı (transdermal) taşıma sistemidir. Literatürde birçok çalışma bulunmaktadır. Bu hidrojel

deri yoluyla etken maddelerin penetrasyonunu kolaylaştırabilen ve isteğe bağlı etken madde dağıtılabilen bir sistem olarak geliştirilmiştir. Örnek bir çalışmada atopik dermatit tedavisinde nem sağlanması için poloksamer 407/karboksümetik selüloz sodyum içeren sıcaklığa duyarlı bir hidrojel geliştirilmiştir. Bu hidrojel içerisine analjezik, antimikrobiyal ve antienflamatuar özelliklere sahip olan Cortex Moutan kapsüllenmiştir. Elde ettikleri sonuçlara göre CMC'ler P407 hidrojinin fiziksel özelliklerini ve P407/CMC'ler ilacın deri penetrasyonunu kolaylaştırmıştır [167]. Örnek bir çalışmada Carmona-Moran ve arkadaşları diklofenak yüklü termo ve pH'a duyarlı nanojeller geliştirmişlerdir ve nanojelleri jellan zank tabanlı katı bir hidrojel film içine kapsüllemişlerdir [168]. Hamad ve arkadaşlarının yaptığı bir diğer çalışmada flukonazol yüklü altın nanoçubuklarını sıcaklığa duyarlı poloksamer 407 hidrojel sistemi geliştirmişlerdir. Bu hibrit sistemle flukonazolün transdermal taşınımı gerçekleştirilmiş ve insan dermal fibroblastları CCD-1064Sk hücrelerine karşı düşük sitotoksosite sergilediği kanıtlanmıştır [169] [170].

Akıllı polimerlere dayalı hidrojeller, etken malzemelerin cilde uygulanması için ideal yara örtü materyali olabilmektedir. Jel olarak Pluronik F127 yaralara uygulandığında sıçanlarda yara iyileşmesini arttırdığını gösteren çalışmalar mevcuttur. Örneğin bir çalışmada Wistar sıçanlarında kutanöz yara tedavisinde pluronik F127 ile hazırlanan jelin etkileri araştırılmıştır. Normal tuzlu su çözeltisi ve %25 (w/v) F127 jel 14 gün boyunca açık eksizyon yaralarına topikal olarak uygulanmışlardır. Günde bir kez topikal olarak uygulanan F127 jel yaranın 11. ve 14. günlerinde yara kapanmasını önemli ölçüde arttırdığını fotoğraflama ile yara kontraksiyon yüzdesinin belirlenmesiyle göstermişlerdir. Histopatolojik testlerle ise jel ile tedavi edilen grupta daha fazla lökosit infiltrasyonu ve ardından belirgin fibroblast proliferasyonu ile iyi oluşturulmuş granülasyon dokusu oluştuğunu kanıtlanmıştır. Sonuç olarak topikal olarak uygulanan kontrol grubu ile F127 jelin karşılaştırılması ile F127 jelin yara iyileşmesi hızlandırdığını kanıtlanmıştır [171]. Pluronic F127 ile çalışılan jel çalışmalarının bir başka örneğinde PLGA mikrokürelerinde yara iyileştirici bir ajanın salımı araştırılmıştır. Çalışmada yara tedavisinde kullanılabilecek bir antimikrobiyal peptid olan KLS-W'nin salımını hem mikropartikülden hem de jele yüklenmiş mikropartiküllerden incelemişlerdir. Mikropartiküller için taşıyıcı olan jelin 24,6°C veya altında sıvı olduğunu vücut sıcaklığına gelindiğinde şeffaf film gibi jel olduğunu reolojik çalışmalar ile kanıtlanmıştır. Salım deneylerinden sonra taşıyıcı sistem savaşıla ilgili yaralanmaların tedavisi için hayvan yara modellerinde değerlendirme ve test edilmesini sağlamak için

bakterisidal aktivite açısından test edilmiş ve antimikrobiyal aktivite sağladığı bulunmuştur [172].

Sıcaklığa duyarlı hidrojellerin çeşitli avantajları vardır. Bir çözelti halinde kolayca uygulanabilmekte, fizyolojik sıcaklıkta jel haline gelebilmektedir. Uygulanan bölgenin şeklini almakta yapıştırıcı özelliğinden dolayı yaraya uygulandığında dikiş kullanımını da gerek yoktur. Etken malzemelere koruma sağlamaktadır. En büyük avantajı hazırlanması kolaydır. Ancak mekanik dirençleri düşüktür, yara sıvılarında hızlı bir şekilde deforme olabilmekte bundan dolayı etken madde salımları hızlanmaktadır. Bu gibi dezavantajları en aza indirebilmek için literatürde çalışmalar mevcuttur. Literatürdeki çalışmalarda tedavi edici etken maddeyi istenilen bölgede kontrollü salımını gerçekleştirebilmek için hibrit sistem oluşturmuşlardır. Örnek bir çalışmada PLGA'ya dayalı polimerik nanopartiküllerden ve cilt yaraları üzerinde iyi bir etkisi olan sıcaklığa duyarlı Pluronik F127 hidrojel sisteminin özelliklerini birleştirmişlerdir. Geliştirdikleri sistem trombosit lizati yüklü nanopartikülleri içeren Pluronik jel sistemidir. Yaralarda tedavi edici ajan olarak trombosit lizati ile çalışmışlardır. İn vitro-in vivo da testler gerçekleştirilip, trombosit lizatlolu nanopartiküller içeren hidrojelin, serbest formdaki lizata göre daha hızlı doku yenilenmesini desteklediğini göstermişlerdir. Elde edilen sonuçlarla yaraların tedavisi için iyi alternatif sistem olacağını kanıtlamışlardır [173].

Fakat literatür daha fazla araştırıldığında GM-CSF ve VEGF'nin birlikte partikül içerisine yüklenip kronik yaralardaki etki mekanizmasını araştıran bir çalışmaya rastlanmamıştır. İkisinin birlikte kapsüllenmesiyle molekül ağırlıklarına göre sıralı bir salım sağlanarak iyileşmesi zor olan yaranın farklı basamaklarını etkileyerek hızlı iyileşmesi öngörülmüştür. Tez çalışmamızla bu eksiğin giderilmesi amaçlanmıştır.

Tez çalışma kapsamında diyabet hastalığından dolayı zor iyileşen kronik yaraların iyileşme hızları araştırılmıştır. Tezin bölüm 2.10 'da diyabet hakkında bilgi verilmiştir.

2.10 Diyabet

Diyabet hastalığı endokrin hastalıklarından biridir, insülin eksikliğinden veya insülin salgısının problemlerinden kaynaklanan hiperglisemi ile karakterizedir.

Kronik hiperglisemi, gözler, böbrekler, sinirler ve kan damarları olmak üzere birçok organlar üzerinde uzun sürede bozulmalara yol açmaktadır. Tip 1 ve tip 2 olmak üzere iki tür diyabet vardır. Tip 1 diyabet insülin salgısının yokluğundan/eksikliğinden kaynaklanmaktadır. Tip 2 diyabet ise insülin direncinden ve/veya yetersiz insülin salgılanmasından kaynaklanmaktadır [174].

Diyabet, kronik yaraların önde gelen nedenlerinden biridir. Diyabetik hastalardaki küçük yaralar genellikle enfeksiyona yatkın ve iyileşmesi zor olan kronik ülserlere dönüşebilmektedir [175].

2.10.1 Tip 1 Diyabet

Insulin, Pankreas beta hücreleri tarafından salgılanır. Bu hücrelerin otoimmün yıkımı ya da yetersiz insülin salgılamaları diyabete neden olmaktadır. Tip 1 diyabet genellikle çocukluk döneminde, Tip 2 diyabet ise ergenlik dönemlerinde ortaya çıkmakta ve ömür boyu süren hastalık haline gelmektedir [174]. Hastalık küçük yaşta ortaya çıktığı için juvenil diabetes mellitus olarak da tanımlanmaktadır. Tip 1 diyabet hastalarına insülin uygulanması önemlidir eğer hastalar insülin almazsa, şiddetli hiperglisemi gelişir ve tedavi edilmediğinde hızla komaya ve ölüme yol açabilmektedir [176].

Tip 1 diyabet güçlü bir genetik yatkınlığa sahiptir. Bağışıklık sisteminde rol oynayan duyarlı genler ve çevresel faktörler ile de ilişkilendirilebilir [176, 177].

Bilim adamları halen tip 1 diyabet hastalığının risk faktörlerini araştırmaktadırlar. Bugüne kadar elde edilen bilgiler doğrultusunda risk faktörleri aşağıda özetlenmiştir [178].

1. Aile Öyküsü

Ailede herhangi bir kişide tip 1 diyabet tanısı varsa o kişide tip 1 diyabet gelişme riski artmaktadır.

2. Genetik

Belirli genetik yapıdaki kişilerde tip 1 diyabet gelişme riski yüksektir.

3. Coğrafya

Ekvatorдан Kuzeye doğru çıkıldıkça tip 1 diyabet hastası olma riski artmaktadır.

4. Virüsler

Virüs nedenli enfeksiyonları geçiren kişilerde de pankreas adacıklarında otoimmün yıkım tetiklenebilir ya da virusun kendisi adacık hücrelerinde doğrudan harabiyete uğratabilmektedir.

5. D-vitamini eksikliği

Bilim adamları D –vitaminin tip 1 diyabete karşı koruyucu bir özelliğinin olabileceğini düşünmektedirler.

6. Beslenme

Omega 3 yağ asitlerinin tip 1 diyabete karşı bir miktar koruyucu özelliği vardır. Bebek mamasına erken dönemde tahıl ürünlerinin eklenmesiyle tip 1 diyabet riskini etkileyebileceği ileri sürülmüştür.

7. Diğer risk faktörleri

Doğumdan hemen sonra sarılık veya solunum yolu sorunları geçiren çocuklarda tip 1 diyabet riskinin artabileceğinden kuşulanılmaktadır.

Tip 1 DM’li hiperglisemik hastalar, nöropati, retinopati, vaskulopati ve nefropati gibi komplikasyonlara oldukça duyarlıdır.

2.10.2 Tip 2 Diyabet

Diyabetin bu formu diyabet hastalığının %90-95’ini kapsamaktadır. En çok yetişkinlerde görüldüğü için erişkin tip diyabet adı verilmektedir. Tip 2 diyabet, insüline direnç ve hedef dokulardaki dolaşan insülin seviyesinin azalması veya immün tepkisi ile karakterizedir. Hastaların ilk başlarda insülin tedavisine ihtiyaçları yoktur. Bu tip diyabetin birçok nedeni olabilmektedir ve ayrıca oto-immün yıkıma neden olmamaktadır [174]. Diyabet öncesi dönemde pankreas kandaki normal şeker düzeyini sürdürmek için artan miktarda insülin salgılayabilir, ayrıca insülin direncinin üstesinden gelmek için de yağ asitleri seviyesini arttırabilir. Ancak beta hücreleri seviyeyi artırırken başarısız olmaya başlar ve tip 2 diyabete neden olan artan glikoz ve yağ asidine neden olur [176]. Bu tip hastalığa sahip olan birçok hasta obezdir ve obezite bir dereceye kadar insüline direnç göstermektedir. Tip 2 diyabetin risk faktörleri yaş, obezite ve fiziksel aktivite ile hatta tip 1 diyabetten daha çok genetik yatkınlık ile ilişkilendirilebilir [174].

2.10.3 Diyabet ve Yara İyileşmesi

Diyabet hastalığı vücutta göz, kan damarları, böbrekler ve sinir sistemi dahil birçok organı etkileyen kronik komplikasyonları oluşturmaktadır. Damar sistemindeki bozulmalar sonucu dokulara giden kan miktarı azalmaktadır. İskemi, korone, arter hastalığına yol açarken uzuvlarımızın uçlarında yetersiz kan akımına bağlı yaralar oluşmaktadır. Özellikle hücrel immüniteki bozulmalar da enfeksiyona yatkınlığa yol açmaktadır. Bozulan metabolizma, oluşan yaraların iyileşmesi üzerinde birçok olumsuz etkilere yol açmaktadır [179].

Bacak ve ayak ülserleri en sık diyabetik hastalarda görülmektedir [180]. Yaralar herkesi etkilese de diyabet ayak ülseri diyabetli hastaların risk faktörlerinden biridir [179]. Diyabetik hastalarda, glikozu metabolize etme yetenekleri azalmıştır bu da hiperglisemik durumlara yol açarak yara iyileşmesini bozmaktadır [180]. Sonuçta iyileşmesi zor olan kronik yaralar oluşmaktadır.

Diyabetli kişilerde ayak ülserlerinin oluşmasını sağlayan ve iyileşmenin gecikmesine yol açan bazı faktörler vardır. Bu faktörlerin başında nöropati, periferik damarsal hastalıkları gelmektedir. İmmun sistemde özellikle hücrel immünitedeki yetersizlik yaranın inflamasyon basamağındaki yetersizliğe yol açmaktadır. Ardışık olarak ilerleyen iyileşme süreci kesintiye uğramaktadır. Bu çalışmada hücrel immüniteyi tetikleyen GM-CSF bu nedenle seçilmiştir. Angiopati sorunu için angiogenezi uyaran VEGF seçilmiştir. Burada iskeminin tedavi edilip edilemeyeceği sorgulanmıştır.

Nöropati, ayak ülserlerinin %90 'ında tespit edilen bir durumdur. Duyusal nöropatide hastalar herhangi bir yaralanmada ağrı, acı hissetmezler. Otonom nöropati, diyabetli hastalarda terlemenin azalmasına neden olmaktadır. Azalan terleme de dokuda kuruluk ve çatlaklara yol açmaktadır. Bu mikro çatlaklara bu bölgede enfeksiyon potansiyelini arttırmaktadır. Motor nöropatiler ise, yürüyüş değişikliği, nasır gelişimi, kronik travmalara ve uzun süreli basınç artışı ile bası yaralarına yol açmaktadır

Periferik damarsal hastalıkları, diyabetli olmayan hastalara kıyasla daha fazla görülmektedir. Bu hastalık tek başına ayak ülserine neden olmamakta diğer faktörler ile birlikte olduğunda ülserlere yol açabilmektedir. Eristrositler ince dar kan damarları içerisinde dolaşabilmektedir. Ancak diyabetik hastaların eritrositleri deforme olup vasküler komplikasyonlara yol açmaktadır. Diğer taraftan kandaki glikoz seviyesinin artmasıyla kanın vizkozitesi de artmaktadır ve kanın kan damarlarında durgunlaşmasına

neden olmaktadır. Bunun sonucu dokulardaki oksijen seviyesi azalmaktadır yara iyileşmesi gecikmektedir.

Küçük travmalar bile (dokulardaki travmatik hasarlar) yaralara neden olmaktadır. Kronik yaralar sepsise yol açabildiği gibi amputasyonlara kadar gidebilen uzuv kayıplarına da davetiye çıkarmaktadır. Fakirliğe bağlı olarak kötü beslenme, hareketsizlik gibi durumlar ayak ülserinin risk faktörleri arasında yer alabilmektedir.

Diyabetin canlı vücudunda neden olduğu bu etmenler nedeniyle diyabet hastalarda meydana gelen yaralar geç iyileşmektedir. Yaraların geç iyileşmesine 100'den fazla bilinen fizyolojik faktör etki etmektedir. Bu faktörler şu şekilde sıralanabilir; azalmış büyüme faktörü üretimi, yetersiz damarlanma ve immun yanıt [181]. Diyabetin neden olduğu kronik yaralar iyileşmeye yol açan olayların normal senkronizasyonunu kaybederek farklı aşamalarda sıkışmaktadır. Örneğin vücuttaki şeker miktarının fazla olmasıyla beyaz kan hücrelerini işlevlerini yerine getirememektedir. Beyaz kan hücreleri bağışıklık sisteminin merkezinde yer alan hücrelerdir. Beyaz kan hücreleri düzgün çalışmadığında, vücut bakteri ve mikroplar ile savaşamaz yara bölgesini temizleyemez. Yara bölgesi temizlenmediği içinde inflamasyon aşamasında takılıp kalmaktadır. Yara iyileşmemektedir. Öte yandan şeker hastalığı dolaşımı etkileyerek kanın daha yavaş hareket etmesine neden olarak vücudun yaraları iyileştirmesi için gerekli olan besinleri ulaştırması zor olmaktadır. Yara bölgesi yeterli oksijen ve besin taşınmadığında proliferasyon fazında eksik damarlanma ve hücre çoğalması gerçekleşmektedir. Böylelikle yaranın iyileşmesi için gerekli olan adımlar düzgün gerçekleşmemektedir.

Yara bölgesinde inflamasyonu azaltacak ve aynı zamanda damarlanma arttıracak bir tedavi yöntemi uygulandığında diyabetik yaraların daha hızlı iyileşeceği öngörülmektedir. Bu tez çalışmasında ise GM-CSF ile diyabetik yaralarda ilerlemeyen inflamasyon fazını ilerleterek ardından VEGF ile proliferasyon aşamasında damarlanma sağlayarak o bölgeye oksijen ve besin taşınımını gerçekleştirerek yaraların iyileşme hızının gelişeceği amaçlanmıştır.

3 DENEYSEL ÇALIŞMALAR

3.1 Kimyasal Malzemeler

Tez çalışmasında taşıyıcı sistem olarak polimerik partiküller, polimer/lesitin partiküller ve polimer-lipit hibrit partiküller (LPN) tasarlanmıştır. LPN'lerin lipit fazında lesitin ve geleol mono digliserit (Gattefose tarafından hediye edilmiştir), polimer fazında ise polikaprolakton (PCL, moleküler ağırlığı 45 kDa) (Sigma Aldrich) kullanılmıştır. Isıya duyarlı enjekte edilebilir hidrojel tasarlanmasında Pluronik F127 (~12600 g/mol) (Sigma Aldrich) kullanılmıştır. Partiküllerin hazırlanmasında organik çözücü olarak etil asetat ve diklorometan (DCM) kullanılmış ve Sigma Aldrich'ten temin edilmiştir. Polimer taşıyıcı sistemin tasarlanmasında stabiliteyi arttırmak için Polivinil Alkol (PVA molekül ağırlığı Mw 13000-23000) veya Pluronik F127 (~12600 g/mol) ile çalışılmıştır. LPN'lerin tasarlanması ile sistemin protein alım/salım deneyleri için iki model protein olarak sığır serum albumin (BSA) (molekül ağırlığı 66 kDa) ve lizozim (molekül ağırlığı 14 kDa) ile çalışılmıştır. Bu proteinler Sigma-Aldrich'ten temin edilmiştir. SDS-PAGE analizinde kullanılmak üzere akrilamid ve N'N'-bis-metilen-akrilamid kullanılmıştır. Taşıyıcı sistemin içine almasıyla diyabetik yaraların iyileşmesinde kullanılmak üzere kombine tedavi amacıyla kullanılan etkin proteinler ise vasküler endotelial büyüme faktörü (VEGF, moleküler ağırlığı 39 kDa), granülosit makrofaj stimüle edici ajan (GM-CSF, moleküler ağırlığı 14,5 kDa) kullanılmakta olup Sigma Aldrich'ten temin edilmiştir. Deneylerde Millipore Direct-Q3 UV iler artırılan ultra saf su (Millipore) (18.2 mΩ.cm) kullanılmıştır. Spraque Dawley türü sıçanları diyabetik hale getirmek için kullanılan ilaç Streptozotosin Cayman Chemical'ten temin edilmiştir. Sodyum sitrat ve hidroklorik asit Sigma Aldrich'ten temin edilmiştir. Kimyasal malzemeler ek saflaştırma işleminden geçirilmemiştir.

3.2 Protein Taşıyıcı Sistemlerin Hazırlanması

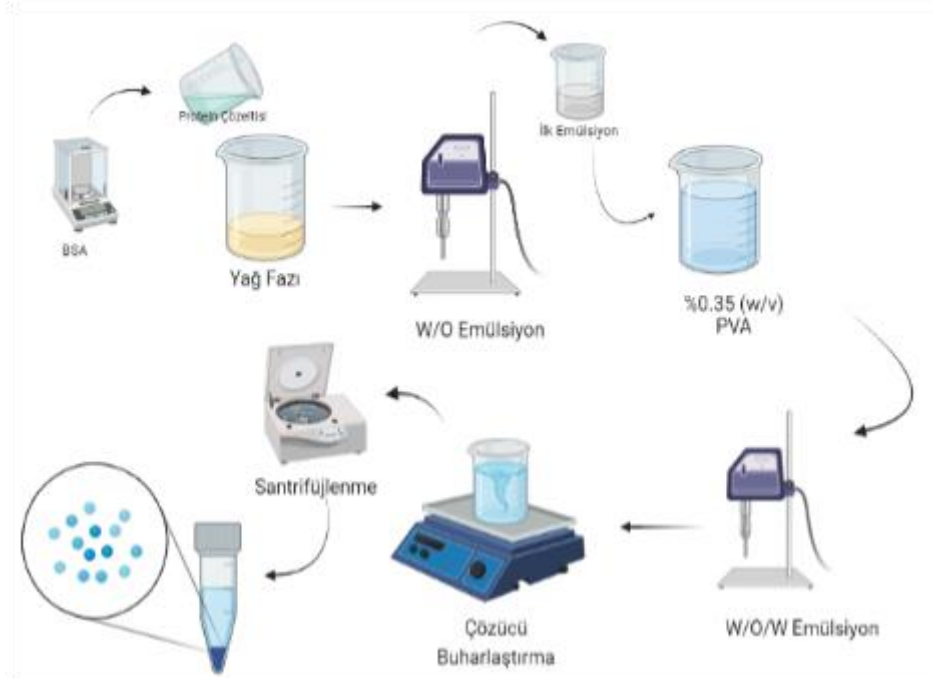
Literatürde proteinlerin taşınımı için Np'lerin hazırlanmasının birçok yolu mevcuttur. Tez çalışmasında Np'ler hem su hem de yağ fazlarında küçük değişiklikler yapılarak çift emülsiyon-çözücü buharlaştırma yöntemine göre hazırlanmıştır.

3.2.1 Polimerik Partiküllerin Hazırlanması

Gözenekli polimerik partiküller su/yağ/su çift emülsiyon çözücü buharlaştırma yöntemi ile hazırlanmıştır [153]. Polimerik partiküllerin hazırlanması için kullanılan prosedür şekil 3.1’de gösterilmiştir. Örnek hazırlama süreci şu şekildedir. Partiküllerin hazırlama prosedürü iç su fazı, yağ fazı ve dış su fazı olmak üzere 3 fazdan oluşmaktadır. İlk önce iç su fazı oluşturmak için hidrofilik özellik gösteren model protein olan BSA belirli bir miktar 0.5 ml ultra saf suda çözdürülmüştür. Yağ fazını oluşturmak için polimer ve %5 (w/v) oranında F127 DCM’nin içerisinde ağzı kapalı bir şekilde çözdürülmüştür. Dış su faz %0,35 (w/v) PVA çözeltisinden oluşmaktadır. Dış su fazı hazırlamak için belirli bir miktar PVA tartılıp ultra saf su içerisine eklenmiştir. PVA yüksek sıcaklıklarda su içerisinde çözünmektedir [182]. O yüzden sıcaklık 70 °C ayarlanarak PVA’nın çözünmesi sağlanmıştır. Prosedürün ilk aşaması olan yağ içinde su birinci emülsiyonu oluşturmak için hazırlanan iç su fazı, yağ fazına eklemiştir ve sonikasyon probu (Bandelin sonopuls uw 2070) kullanılarak (70W) karıştırılmıştır. Prosedürün ikinci aşaması su içinde yağ olan ikinci emülsiyonu oluşturmak için elde edilen birinci emülsiyon yani su/yağ emülsiyonu (%0,3 (w/v) PVA) içeren dış su fazın içerisine eklenmiştir. İkinci emülsiyon oluşumunda da aynı koşullar kullanılmıştır.

Emülsiyonlar elde edildikten sonra yağ fazını hazırlamada kullanılan çözücünün buharlaşmasını sağlamak amacıyla çözelti ağzı açık bir şekilde 3,5 saat çeker ocakta karıştırılmıştır. Bu aşamada çözücü uzaklaşırken partiküller oluşmaya başlamaktadır. 3.5 saatin sonunda partikülleri elde etmek ve yapıya dahil olmamış olan serbest protein uzaklaştırmak için 18000 rpm’de 15 dk santrifüj yapılmıştır. Partiküllerin yapısına dahil olmamış yüzey aktif maddelerini uzaklaştırmak için en son yıkama yapılmıştır. Yıkama işlemi 3 kere tekrar edilmiştir. Yıkama işleminden sonra bir sonraki karakterizasyon çalışmaları için örnekler +4°C’de saklanmıştır.

Polimerik partiküllerin boyut ve morfoloji analizlerini gerçekleştirmek için aynı zamanda içerisinde model olarak seçilen protein bulunmayan partiküller hazırlanmıştır.

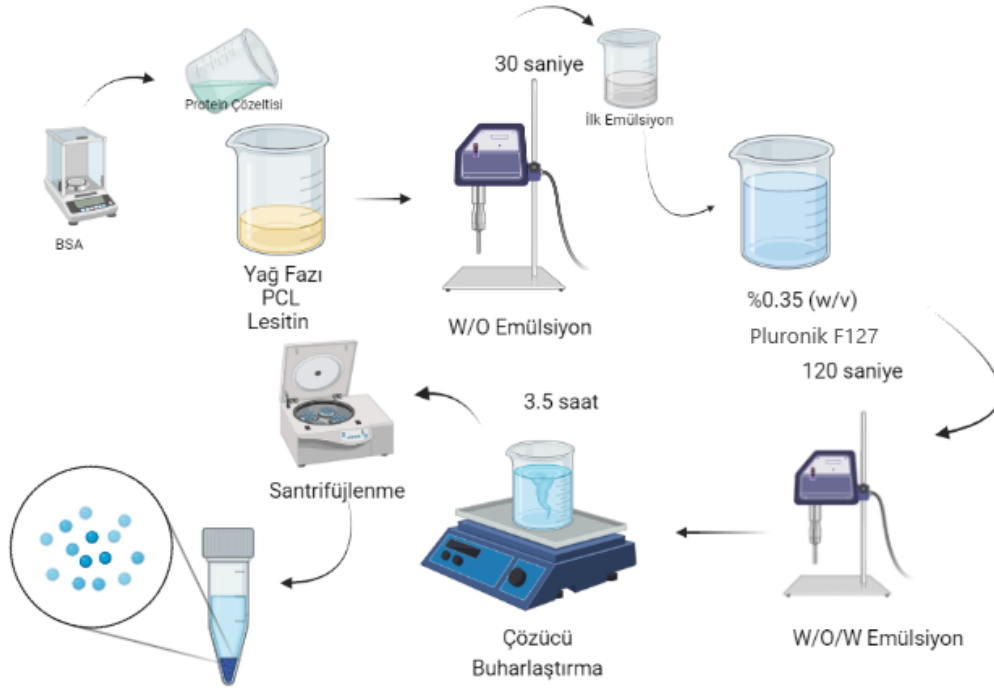


Şekil 3-1 Polimerik Partiküllerin Hazırlanma Prosedürünün Şematik Gösterimi

Aynı koşullarda aynı prosedür ile hazırlanmışlardır. İç su fazını hazırlarken herhangi bir protein eklenmemiştir

3.2.2 PCL/Lesitin Monolit Partiküllerin Hazırlanması

Lesitin/PCL monolit partiküller su/yağ/su çift emülsiyon çözücü buharlaştırma yöntemi ile hazırlanmıştır. Partikül hazırlanması sürecinde farklı oranlarda lesitin ile çalışılmıştır. Partikül morfolojisinin düzgün ve uygun boyutta olması için optimizasyon çalışmaları yapılmıştır. Monolit partiküllerin hazırlanması için kullanılan prosedür şekil 3.2'de gösterilmiştir. Partiküllerin hazırlama prosedürü iç su fazı, yağ fazı ve dış su fazı olmak üzere 3 aşamadan oluşmaktadır. İlk önce yağ fazı hazırlanmıştır. Yağ fazını oluşturmak için farklı oranlarda lesitin, polimer ile etilasetat-DCM içerisinde çözdürülmüştür. Daha sonra iç su fazı hazırlanmıştır. İç su fazı model protein olan BSA içermektedir. Belirli bir miktar BSA 0.2 ml Up içerisinde çözdürülmüştür. İlk emülsiyonu oluşturmak için iç su fazı yağ fazına eklenmiştir ve sonikasyon probu (Bandelin sonopuls uw 2070) ile 70W gücünde 30s sonikasyon ile karıştırılmıştır. Üçüncü fazı olan dış su fazı için 0.35 (w/v) F127 sulu çözelti hazırlanmıştır. İlk emülsiyon oluşturulduktan sonra dış su fazına eklenerek çift emülsiyonun son basamağı aynı koşullar altında sonikasyon probu ile 70W gücünde 120s de oluşturulmuştur. Emülsiyon sonunda süt beyazı renğinde çözelti elde edilmiştir. Emülsiyon doğru bir şekilde oluşmuştur yağ ile su fazları karışabilmiştir.



Şekil 3-2 PCL/Lesitin Partiküllerin Hazırlanma Prosedürünün Şematik Gösterimi

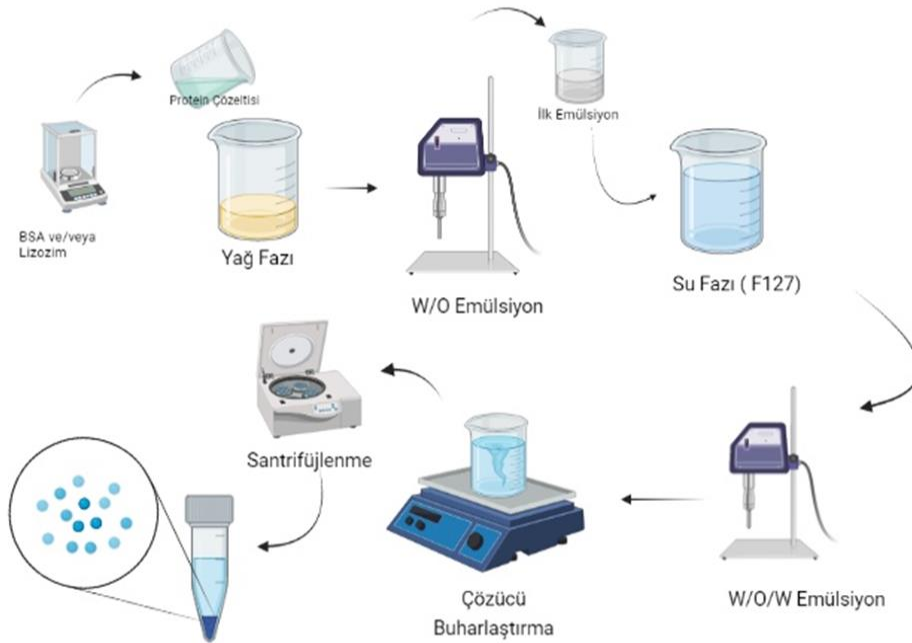
Emülsiyonlar elde edildikten sonra yağ fazını hazırlamada kullanılan çözücülerin buharlaşmasını sağlamak amacıyla çözelti ağız açık bir şekilde 3,5 saat çeker ocakta karıştırılmıştır. Bu aşamada çözücü uzaklaşırken partiküller oluşmaya başlamaktadır. 3.5 saatin sonunda partikülleri elde etmek ve yapıya dahil olmamış olan serbest protein uzaklaştırmak için 14000 rpm’de 15 dk santrifüj yapılmıştır. Partiküllerin yapısına dahil olmamış emülsiyon edici ajanı uzaklaştırmak için en son yıkama işlemi yapılmıştır. Yıkama işlemi 3 kere tekrar edilmiştir. Yıkama işleminden sonra bir sonraki karakterizasyon çalışmaları için partiküller +4°C’de saklanmıştır.

PCL/Lesitin monolit partiküllerin boyut ve morfoloji analizlerini gerçekleştirmek için aynı zamanda içerisinde model olarak seçilen protein bulunmayan partiküller hazırlanmıştır. Aynı koşullarda aynı prosedür ile hazırlanmışlardır. İç su fazını hazırlarken herhangi bir protein eklenmemiştir. O şekilde birinci emülsiyon oluşturulmuştur.

hLipit-Polimer Hibrit Partiküllerin Hazırlanması

Lipit-polimer hibrit partiküller su/yağ/su çift emülsiyon çözücü buharlaştırma yöntemi ile hazırlanmıştır. Partikül morfolojisinin düzgün ve uygun boyutta olması için optimizasyon çalışmaları yapılmıştır. Bunun için ilk önce protein içermeyen partiküller sentezlenmiştir.

Su/yağ/su çift emülsiyon çözücü buharlaştırma yöntemini açıklamak gerekirse ilk önce PCL, Geleol mono digliserit ve surfaktan olarak lesitin organik çözücü olarak kullanılan etil asetat ve diklorometan içerisinde çözdürülerek yağ fazı oluşturulmuştur. Birinci su fazı ve ikinci su fazı ise %0.35 (w/v) F127 saf su içerisinde çözdürülerek hazırlanmıştır. Oda sıcaklığında birinci su fazı yağ fazı içerisine eklenmiştir ve homojenizatörde (Bandelin sonopuls uw 2070) 30 saniye 70 W da karıştırılarak birinci emülsiyon elde edildi. Oluşan emülsiyon %0.35 (w/v) 6 ml F127 içerisine eklendi ve aynı koşullar altında 120 saniye tekrar homojenizatörde karıştırılarak ikinci emülsiyon elde edilmiştir. Karıştırıcıda 800 rpm 'de ağzı açık şekilde 3.5 saat karıştırılarak organik çözücüler uçuruldu ve hibrit partiküllerin oluşması sağlandı. Oluşan partikülleri toplamak amacıyla santrifüj cihazında (Centrifuge MPW-251) 12000 rpm'de 15 dk santrifüj edildi. Çöken partiküller ayrıldıktan sonra surfaktan kalıntısından ayırmak amacıyla saf su ile 3 kere 12000 rpm 'de 5'er dk santrifüj edilerek yıkanmıştır. Elde edilen partiküller 4°C 'de buzdolabında analizler için saklanmıştır. Sentezlenme prosedürü şekil 3.3'de gösterilmiştir.



Şekil 3-3 Polimer/Lesitin/Geleol polimer-lipit hibrit partiküllerin hazırlanma prosedürünün şematik gösterimi

3.2.2.1 BSA Yüklü Lipit-Polimer Hibrit Partiküllerin Hazırlanması

VEGF proteinine model olarak sığır serum albumin (BSA) ile çalışılmıştır. Protein yüklü olmayan boş partiküllerin reçetesinden yola çıkarak BSA yüklü hibrit partiküller sentezlenmiştir. Yöntemi açıklamak gerekirse ilk önce yağ fazını oluşturmak amacıyla 130 mg PCL 20 mg lesitin ve 20 mg Geleol organik çözücülerde (etil asetat ve diklorometan) içerisinde çözdürülmüştür. Daha sonra birinci su fazını oluşturmak için belirli miktar BSA 200 mikrolitre %0.35 (w/v) F127 çözeltisi içerisinde çözdürülmüştür. Birinci su fazı yağ fazına eklenmiş homojenizatörde 30 s 70 W'da karıştırılarak birinci emülsiyon elde edilmiştir. Oluşan birinci emülsiyon dış fazı oluşturan 6 ml'lik %0.35 (w/v) F127 çözeltisine ilave edilmiştir ve homojenizatörde 120 s 70 W'da karıştırılarak ikinci emülsiyon elde edilmiştir. Partikül oluşturulması için oluşan emülsiyon 800 rpm hızla mekanik karıştırıcıda 3,5 saat karıştırılarak çözücülerin buharlaşması sağlanmıştır. Partiküller 12000 rpm'de 15 dk santrifüj edilerek çöktürülmüş ve aynı koşullar altında 3 kez saf su ile yıkanmıştır. Elde edilen partiküller karakterize edilmek için +4°C de saklanmıştır. BSA yüklü partiküller optimize edildikten sonra aynı parametreler için VEGF yüklü partiküller elde edilmiştir.

3.2.2.2 Lizozim Yüklü Lipit-Polimer Hibrit Partiküllerin Hazırlanması

GM-CSF proteinine model olarak lizozim proteini ile çalışılmıştır. Protein yüklü olmayan boş partiküllerin reçetesinden yola çıkarak lizozim yüklü hibrit partiküller sentezlenmiştir. Yöntemi açıklamak gerekirse ilk önce yağ fazını oluşturmak amacıyla 130 mg PCL 20 mg lesitin ve 20 mg Geleol organik çözücülerde (etil asetat ve diklorometan) içerisinde çözdürülmüştür. Daha sonra birinci su fazını oluşturmak için 10 mg lizozim 200 mikrolitre %0.35 (w/v) F127 çözeltisi içerisinde çözdürülmüştür Birinci su fazı yağ fazına eklendi homojenizatörde 30 s 70 W'da karıştırılarak birinci emülsiyon elde edilmiştir. Oluşan birinci emülsiyon dış fazı oluşturan 6 ml'lik %0.35 (w/v) F127 çözeltisine ilave edilerek ve homojenizatörde 120 s 70 W'da karıştırılarak ikinci emülsiyon elde edilmiştir. Partikül oluşturulması için oluşan emülsiyon 800 rpm hızla mekanik karıştırıcıda 3,5 saat karıştırılarak çözücüler buharlaştırılmıştır. Partiküller 12000 rpm'de 15 dk santrifüj edilerek çöktürüldü ve aynı koşullar altında 3 kez saf su ile yıkanmıştır. Elde edilen partiküller karakterize edilmek için +4°C de saklanmıştır. Lizozim yüklü partiküller optimize edildikten sonra aynı parametrelerde GM-CSF yüklü partiküller elde edilmiştir.

3.2.2.3 Lizozim/BSA Yüklü Lipit-Polimer Hibrit Partiküllerin Hazırlanması

Tezin bu aşamasında GM-CSF ve VEGF proteinine model olarak BSA ve lizozim proteini ile çalışılmıştır. Protein yüklü olmayan boş partiküllerin reçetesinden yola çıkarak BSA/Lizozim yüklü hibrit partiküller sentezlenmiştir. Yöntem lk önce yağ fazını oluşturmak amacıyla 130 mg PCL 20 mg lesitin ve 20 mg Geleol organik çözücülerde (etil asetat ve diklorometan) içerisinde çözdürülmüştür. Daha sonra birinci su fazını oluşturmak için BSA ve lizozim 200 mikrolitre %0.35 (w/v) F127 çözeltisi içerisinde çözdürülmüştür. Birinci su fazı yağ fazına eklendi homojenizatörde 30 s 70 W'da karıştırılarak birinci emülsiyon elde edilmiştir. Oluşan birinci emülsiyon dış fazı oluşturan 6 ml'lik %0.35 (w/v) F127 çözeltisine ilave edilmiştir ve homojenizatörde 120 s 70 W'da karıştırılarak ikinci emülsiyon elde edilmiştir. Partikül oluşturulması için oluşan emülsiyon 800 rpm hızla mekanik karıştırıcıda 3,5 saat karıştırılarak çözücüler buharlaştırılmıştır.

Partiküller 12000 rpm'de 15 dk santrifüj edilerek çöktürüldü ve aynı koşullar altında 3 kez saf su ile yıkanmıştır. Elde edilen partiküller karakterize edilmek için +4°C de saklanmıştır. BSA/Lizozim yüklü partiküller optimize edildikten sonra aynı parametrelerde GM-CSF/VEGF yüklü partiküller elde edilmiştir.

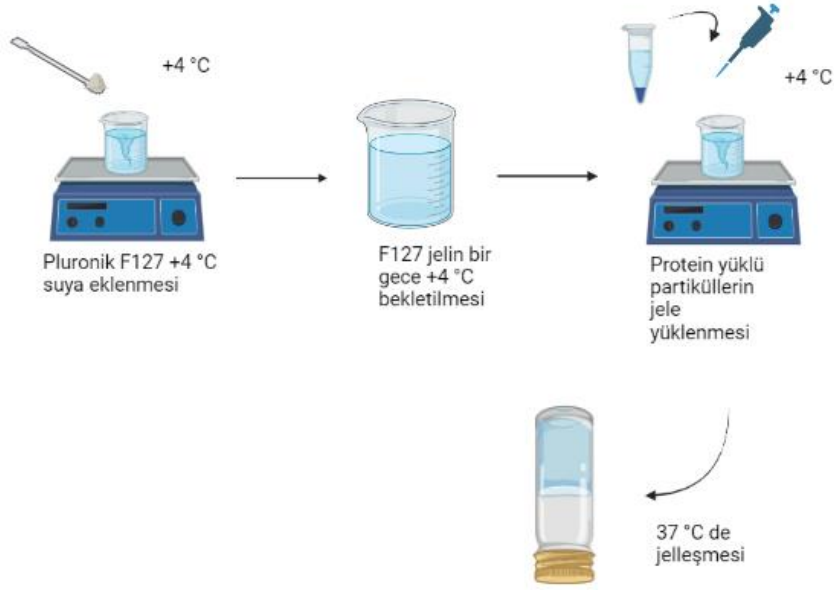
Partikül hazırlamada kullanılan parametreler çizelge 3.1 özetlenmiştir

Çizelge 3-1 Partikül Hazırlama Kullanılan Parametreler

Partiküller	Protein	Lipit	Çözücü	Emülsifiye Edici Ajan	Stabile Edici Ajan
Polimerik Partiküller	BSA	-	DCM	PVA	-
Polimerik Partiküller	Lizozim	-	DCM	PVA	-
Polimer/Lesitin Partiküller	BSA	Lesitin	Etil Asetat/DCM	Pluronik F127	Pluronik F127
Polimer/Lesitin Partiküller	Lizozim	Lesitin	Etil Asetat/DCM	Pluronik F127	Pluronik F127
Polimer- Lipit Hibrit Partiküller	BSA	Lesitin/Geleol	Etil Asetat/DCM	Pluronik F127	Pluronik F127
Polimer- Lipit Hibrit Partiküller	Lizozim	Lesitin/Geleol	Etil Asetat/DCM	Pluronik F127	Pluronik F127
Polimer- Lipit Hibrit Partiküller	BSA/Lizozim	Lesitin/Geleol	Etil Asetat/DCM	Pluronik F127	Pluronik F127

3.3 Sıcaklığa Duyarlı Enjektelerde Edilebilir Hidrojel Hazırlanması

Pluronik hidrojel soğuk yöntem ile hazırlanmıştır[183, 184]. Hidrojel hazırlanma prosedürü şekil 3.4 'de şematik olarak gösterilmiştir. Belirli miktarda pluronik F127 tartılmıştır, +4 °C bekletilmiş olan ultra saf su içinde pluronik tanecikleri tamamen çözülmeye ve berrak bir çözelti elde edilene kadar oda sıcaklığında karıştırılmıştır. +4 °C'de bir gece boyunca bekletilmiştir. 37 °C'de jelleşmesi sağlanmıştır.



Şekil 3-4 Pluronik Jelin Hazırlanma Prosedürün şematik Gösterimi

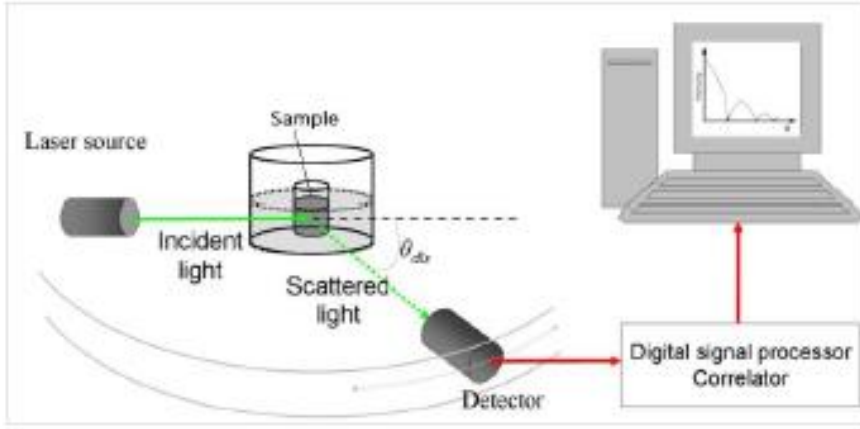
İlk önce içerisinde herhangi bir taşıyıcı sistem bulunmayan hidrojel hazırlanmıştır. Daha sonra salım deneyleri için taşıyıcı sistem yüklü jel hazırlanmıştır. Hazırlama prosedürü aynıdır. Hidrojel hazırlandıktan sonra partiküllerin üzerine eklenerek 30 dk boyunca karıştırılmıştır.

3.4 Partikül Karakterizasyonu

Partiküllerin fiziksel ve kimyasal özelliklerini incelemek için in vitro ilaç salım davranışı ve kapsülleme etkinliği, boyut ve boyut dağılımı, morfoloji ve partiküllerin yüzey yükü gibi farklı karakterizasyon yöntemleri farklı teknikler kullanılarak anlaşılmaktadır.

3.4.1 Dinamik Işık Saçılımı (DLS) Tekniği

Dinamik ışık saçılımı tekniği nanopartiküllerin boyutlarının belirlenmesi için kullanılan en yaygın tekniklerinden biridir. DLS yöntemi seyreltik çözelti içindeki nanopartiküllerden saçılan lazer ışığın şiddetinin ve değişiminin ölçülmesi prensibine dayanmaktadır. Partiküllere gelen lazer ışını farklı açılarla saçılmaktadır. Saçılan lazer ışığın şiddeti partiküllerin hareketlerinden, boyutlarından etkilenmektedir ve ışık şiddetinde bu değişimler dedektöre tarafından algılanarak partiküllerin boyutları hakkında bilgi edilebilmektedir. DLS çalışma prensibi şekil 3.5’de gösterilmiştir.



Şekil 3-5 Dinamik ışık saçılımı ölçümlerinin blok şeması [185]

Akışkan bir sıvı içerisinde bulunan partiküller brownian hareketi yaparlar. Partiküller büyüdükçe brownian hareketi yavaşlar ve partiküller üzerine yollanan tek renkli ışığın, partiküle çarptığında dalga boyu değişmektedir. Bu değişim ile partikülün boyutu hakkında bilgi alınabilmektedir.

Saçılan ışığın şiddeti ölçülerek difüzyon kat sayısı terimi edilir ve belirli eşitliklerle partiküllerin yarıçapları hesaplanabilmektedir. Stokes-Einstein eşitliğine göre difüzyon kat sayısı ile partiküllerin yarıçapları hesaplanmaktadır. (Eşitlik I)

$$Df = KBT/6 \pi \eta R H \quad \text{Eşitlik I}$$

KB: Boltzmann Sabiti

T: Çözeltinin Sıcaklığı

η : Ortamın Viskozitesi

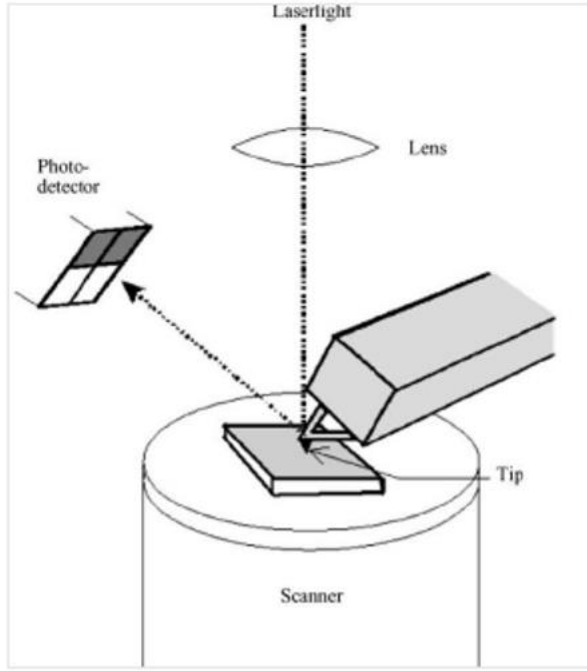
Tez çalışmasında DLS (ALV-CGS-3 Compact Gonyometer) ile analizler gerçekleştirilmiştir. Analiz için örnekler ultra saf su (UP) ile belli bir seyreltme oranı ile (1:100 v/v) seyreltilerek hazırlanmıştır. Ölçümler 30, 90, 120° açı ile gerçekleştirilmiştir.

3.4.2 Zeta Potansiyeli Ölçümü

Zeta potansiyeli sulu çözeltide partiküllerin yüzey yükünün belirlenmesinde kullanılan analitik bir tekniktir. Ayrıca zeta potansiyel partiküllerin stabilitelelerini belirleyen de bir tekniktir. Tez çalışmasında zeta potansiyeli kuvars-teflon GT-2 hücreli, molibden anotlu ve platin katotlu Zeta Meter System 3.0 (Zeta Meter Inc.) ile ölçüldü. Örnekler ultra saf su (UP) kullanılarak belli bir seyreltme oranı ile (1:30 v/v) seyreltilerek hazırlanmıştır. Tüm ölçümler üç kez tekrarlanmıştır.

3.4.3 Atomik Kuvvet Mikroskobu (AFM)

AFM, nano ölçekte örneklerin görüntülenmesini sağlayan mikroskobik bir görüntüleme tekniğidir. Atomik kuvvet mikroskobu örnek yüzeyini taramak için sivri uçlu bir prob (tip) kullanır



Şekil 3-6 AFM'nin Çalışma Prensibi Şematik Gösterimi

Bu prob numunenin yüzeyi boyunca hareket ederek malzemelerin yüzey topografisi hakkında bilgi vermektedir. Prob ile örnek yüzeyi arasındaki oynanan kuvvetler örneğin yüzey topolojik haritasını oluşturmaktadır. Yüze doğru ve yüzeyden uzaklaşan probun sapmalarını algılamak için lazer ışını kullanılmaktadır. Probun üzerinden gelen lazer ışını, yüzey üzerindeki tipin sapmasıyla gelen ışının yönünde küçük değişikliklere neden olmaktadır. Bu değişiklikleri izlemek için bir foto dedektör kullanılmaktadır[186]. Böylece foto dedektör izlenen değişiklikler örneğin yüzey topografisi hakkında bilgi vermektedir. Cihazın çalışma prensibinin şematik gösterimi aşağıdaki gibidir.

AFM iki modu mevcuttur. Probun örnek yüzeyine temas ettirildiği temas modu (kontakt mod), probun örneğin hemen üzerinde durduğu temassız mod (non-kontakt mod).

Tez çalışmasında, Cr-Au konsolları (ACTA 10M) ile temassız bir modun AFM (PSIA Corporation, XE-100E) ve 0.37 Hz frekansı kullanılmıştır. AFM örnekleri belli miktarda seyreltilmiş (1:100 (v/v)) olup bir mikroskopik lam üzerine damlatılarak oda sıcaklığında kurutulmuş hazırlanmıştır.

3.4.4 Taramalı Elektron Mikroskobu (SEM)

SEM, yoğunlaştırılmış bir elektron demetinin örnek yüzeyi boyunca tarayarak görüntü elde edilebilen bir mikroskop türüdür.

İstenilen örneğin yüzeyin taranması ve örnekten saçılan elektronların dedektörler tarafından algılanması ile görüntü elde edilmektedir. SEM’de görüntü oluşturmak için örnek atomlarının yaydığı ikincil elektronlardan faydalanılmaktadır. Bu ikincil elektronlardaki değişimler örnek yüzeyinin topografi ve kompozisyonu hakkında bilgi veren farklı sinyaller üretmektedir.

Tez çalışmasında partikülleri boyutlarını ve topografisini detaylı bir şekilde incelenebilmesi için SEM ölçümleri Bruker marka Zeiss Evo 50 elektron mikroskobu ile gerçekleştirilmiştir. Sulu örnekler bakır grid üzerine damlatıldıktan sonra oda sıcaklığında kurutulmaya bırakılmıştır analize hazır hale getirilmiştir. Hazırlanan kuru örneklerin yüzey iletkenliği sağlamak amacıyla vakum altında ince film şeklinde altın kaplandıktan sonra SEM analizi gerçekleştirilmiştir.

3.4.5 Diferansiyel Taramalı Kalorimetre (DSC)

Diferansiyel taramalı kalorimetri, biyomakromoleküllerin ve makromolekül sistemlerin stabilitesinin araştırılmasında katkıda bulunan deneysel bir ölçüm tekniğidir [187]. DSC, örnekler ısıtılırken ya da soğutulurken soğurulan ve salıveren enerji miktarını ölçmektedir. Referans ile numuneden gelen veya uzaklaşan ısı farklı sıcaklığa ve zamana bağlı olarak değişmektedir. Ölçümlerde protein, polinükleotid ve lipid gibi moleküller için termodinamik stabilite hakkında bilgi sağlamakla kalmayıp aynı zamanda biyopolimerlerin eritilmesinde meydana gelen özelliklerin analiz edilmesini mümkün kılmaktadır [187].

Tez çalışması kapsamında hazırlanan PCL/Lesitin/Geleol polimer-lipit hibrit partiküllerin DSC ölçümleri kimya mühendisliği bölümü merkez laboratuvarında gerçekleştirilmiştir. Belirli miktarda kuru örnek hazırlandıktan sonra alüminyum tepsi içinde tartılarak alınmıştır. 10 °C/ dk ısıtma hızında ve 20-350 °C sıcaklık aralığında çalışılmıştır [173].

3.4.6 Fourier Dönüşümü Kızılötesi Spektroskopisi (FTIR)

FTIR analizi, organik, inorganik ve polimerik malzeme örneklerinin tanımlanmasında kızılötesi ışık ile taranmasını sağlayan spektroskopik bir yöntemdir. FTIR, bilinmeyen malzemeleri tanımlamada ve karakterize etmede, bir malzemedeki kirleticileri tespit etmede ve katkı maddelerini bulmada faydalı olabilmektedir. Absorpsiyon bantlarının karakteristik değişiklikler örnek malzemedeki değişikliği açıkça göstermektedir. Yaklaşık $10.000-100\text{ cm}^{-1}$ 'lik kızılötesi ışık bir kısmı absorbe edilerek bir kısmı da içinde geçerek örneğe gönderilmektedir. FTIR analizi örnek tarafından ışığın soğurulmasına dayanmaktadır. Soğurulan ışık, örnek tarafından titreşim ve dönme enerjisine dönüştürülmektedir ve bir sinyal oluşturulmaktadır. Oluşan sinyal örneklerin moleküler parmak izini temsil eden $4000\text{ ile }400\text{ cm}^{-1}$ arasında bir spektrumdur [188].

Tez çalışması kapsamında hazırlanan farklı miktarda lesitin içeren (100,200 ve 500 mg) PCL/Lesitin partiküllerin FTIR ölçümleri kimya mühendisliği bölümü merkez laboratuvarında gerçekleştirilmiştir.

3.5 Nanopartiküllerin Kapsülleme Verimliliği (EE)

Kapsülleme verimliliği, partiküllerin terapötik ajanı başarılı bir şekilde içine alma kabiliyetini ifade etmektedir. Enkapsüle edilen terapötik ajan miktarının partiküller hazırlanırken kullanılan toplam terapötik ajan miktarına oranıdır.

Hazırlanan partiküllerin santrifüj ile eppendorf tüpte toplanmasından sonra, partiküllerin süpernatandan örnek alınarak 280 nm dalga boyunda UV-vis spektrofotometresi (Thermo Scientific™, GENESYS 10S) kullanılarak analiz edilmiştir ve süpernatant içinde kapsüllememiş BSA ve lizozim miktarı belirlenmiştir.

Proteinlerin tayini için biüret ve bradford tayin yöntemleri çalışılmıştır. Biüret yöntemi ile çalışabilmek için ilk önce laboratuvarımızda biüret çözeltisi hazırlanmıştır. Hazırlanma prosedürü şu şekildedir. Çözeltiyi hazırlamak için ilk önce $20\text{ ml }0.2\text{M NaOH}$ çözeltisi hazırlanmıştır. İçerisinde $0,12\text{ g}$ bakır sülfat (CuSO_4) ve $0,36\text{ g}$ sodyum potasyum tartrat ($\text{KNaC}_4\text{H}_4\text{O}_6 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$) çözülmüş ve bu karışımda malzemeler iyice çözüldükten sonra karışıma $0,2\text{ g}$ potasyum iyodür (KI) eklenmiştir. Ardından 20 ml daha $0,2\text{M NaOH}$ çözeltisi eklenmiştir. Malzeme iyice karıştıktan sonra en son açık mavi renkte bir çözelti

elde edilmiştir. Çözelti +4 °C de saklanmıştır [189]. Yöntemi ise şu şekildedir. Partikül süpernatından örnek alınarak biüret reaktifi ile 25-30 dk etkileştirilmiş oluşan mor-menekşe renginin Uv-vis spektrofotometresi kullanılarak 540 nm dalga boyunda absorbansı elde edilmiştir.

Bir başka çalışma prensibi de protein tayini için bradfort reaktifi ile partiküllerde kapsüllenmemiş protein miktarını belirlemektir [190]. Yöntemi açıklamak gerekirse santrifüj ile eppendorf tüpte toplanmasından sonra partiküllerin süpernatanından örnek alınarak bradfort reaktifi ile 10 dakika etkileştirerek 595 nm dalga boyunda UV-vis spektrofotometresi (Thermo Scientific™ GENESYS 10S) kullanılarak analiz edilmiştir. Çalışma karanlık ortamda gerçekleştirilmiştir. Partikül içerisine dahil edilen proteinlerin miktarı aşağıdaki eşitlik II kullanılarak hesaplanmıştır.

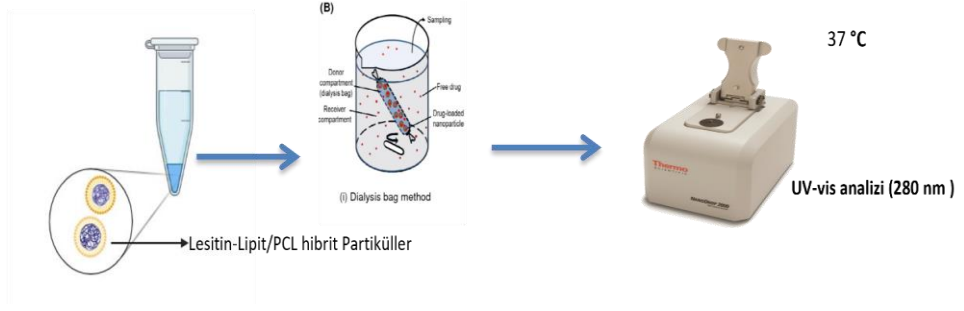
$$(\%EE) = [\text{Toplam protein miktarı-kapsüllememiş protein miktarı}] / [\text{Toplam protein miktarı}] *100$$

Eşitlik II

Ölçülen örneklerin absorbansı ile kapsüllememiş protein konsantrasyonunu belirlemek için önceden hazırlanmış proteinlerin (Bsa ve lizozim) kalibrasyon eğrisi kullanılmıştır. (Ek-1)

3.6 BSA ve/veya Lizozim İn Vitro Salım Davranışı

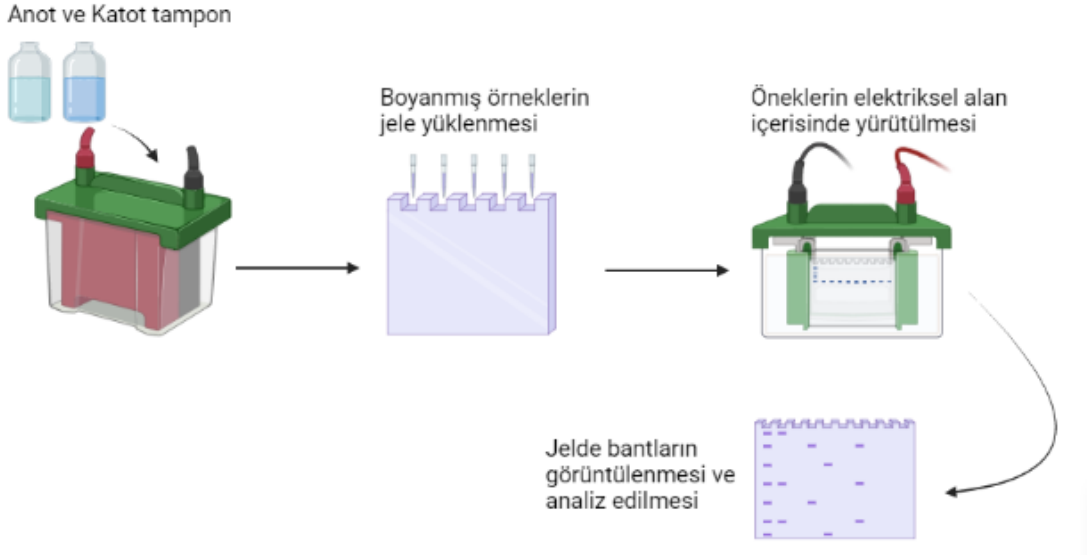
Partiküllerin in vitro salım davranışları incelemek için diyaliz membran yöntemi kullanılmıştır. Bu yöntemde, BSA ve Lizozim yüklü partiküller diyaliz membranda 3 ml fosfat tamponlu (PBS; pH = 7.4) salım ortamı ile homojen bir şekilde dağıtılmıştır. Diyaliz membran 9 ml salım ortamı (PBS pH 7.4) ve (%0,1 (h/h) Tween® %0,1 sodyum azid) içeren bir şişeye aktarılmıştır. Şişe, vücudun fizyolojik durumunu mimik etmek için 150 rpm'de 37°C'de inkübe edilmiştir. Belirli zaman aralıklarında örnekler alınıp absorbansları 280 nm ve 595 nm 'de 1 ml kuvars küvetli UV-vis spektrofotometresi (Thermo Scientific™, GENESYS 10S) ile ölçülmüştür. Çalışmanın şematik gösterimi şekil 3.7'de gösterilmiştir Bütün deneyler 3 kez tekrarlanmıştır.



Şekil 3-7 Bsa ve/veya Lizozim İn Vitro Salım Çalışmasının Şematik Gösterimi

3.7 Sodyum Dodesil Sülfat Poliakrilamid Jelde Elektrofrez (SDS-PAGE)

Sodyum dodesil sülfat poliakrilamid jel elektrofrez proteinleri yalnızca moleköl ağırlıklarındaki farklılıklarına dayalı olarak ayırmada kullanılan en yaygın kullanılan yöntemdir. PCL/Lesitin/Geleol hibrit partiküllerden tutunmayan ve salınan BSA ve lizozim'in yapısal stabilitesi ve miktarı SDS-PAGE yöntemi ile araştırılmıştır. Laboratuvarımızda SDS-PAGE analizini yapma imkânı olmadığı için analiz başka bir laboratuvarında gerçekleştirilmiştir. Analizi gerçekleştirmek için ilk önce aşağıdaki prosedüre göre %30 akrilamid jel hazırlanmıştır. 14.6 g akrilamid ve 0,4 g N'N'-bis-metilen-akrilamid tartılarak 50 ml ultra saf su içerisinde çözdürülmüştür. Jel oluşumu, akrilamid ve akrilamid türevi N-N-metilen bisakrilamidin polimerizasyonu sonucu oluşmaktadır ve örnekler bu jelde yürütölmektedir. Polimerizasyon sırasında jelin üst kısmına tarak yerleştirilerek jelde kuyucuklar oluşturulmuştur. Polimerizasyon sonunda tarak çıkartılmıştır. Jele yüklenilecek örnekler SDS ile muamele edilerek negatif yüklü hale getirilmiş ve jel kuyucuklarına yüklenebilecek hale getirilmiştir. Negatif yüklü olan örnekler coomassie mavisi ile boyanarak jelde görünür hale getirilmiştir. Negatif yüklü boyanmış örnekler kuyucuklara yüklenerek belirli alan içerisinde hareketleri izlenmiştir. Aşağıda SDS-PAGE yönteminin şematik gösterimi şekil 3.8 'de gösterilmiştir.



Şekil 3-8 SDS-PAGE yönteminin şematik gösterimi

3.8 Sıcaklığa Duyarlı Hidrojel Karakterizasyonu

Sıcaklığa duyarlı hidrojin fiziksel özelliklerini ve salım davranışlarını incelemek için karakterizasyon çalışmaları gerçekleştirilmiştir.

3.8.1 Sıcaklığa Duyarlı Hidrojin Jelleşme Sıcaklığının Belirlenmesi

Belirli konsantrasyondaki hidrojin farklı sıcaklıklarda jelleşme durumu incelenmiştir. Jelleşme sıcaklığının belirlenmesinde yöntem olarak tüp ters çevirme yöntemi kullanılmıştır [191] [192]. Yöntem şu şekildedir. 4 °C 'de tutulmuş belirli bir miktar hidrojel 25 ml 'lik bir cam şişe içerisinde soğuk su banyosuna yerleştirilmiştir. Düşük sıcaklıktaki 25 ml'lik cam şişeye termometre probu daldırılmıştır. Sıcaklık, sürekli karıştırma sırasında yavaş yavaş (2 °C/dakika) arttırılmıştır. Sıcaklık arttırıldıkça cam şişe ters çevrilmiştir ve çözeltinin akışının durduğu sıcaklık ölçülmüştür. Kaydedilen sıcaklıkta çözelti jel haline dönüşmüştür. Sıcaklık jelleşme sıcaklığı (T_g) olarak rapor edilmiştir.

3.8.2 Sıcaklığa Duyarlı Hidrojin Reolojik Değerlendirmesi

Hidrojin farklı sıcaklık ve kesme hızlarında reolojik davranışları araştırılmıştır. Reolojik davranışı incelemek için reometre cihazı kullanılmıştır.

3.8.3 Sıcaklığa Duyarlı Hidrojelin Tükenme Hızının Belirlenmesi

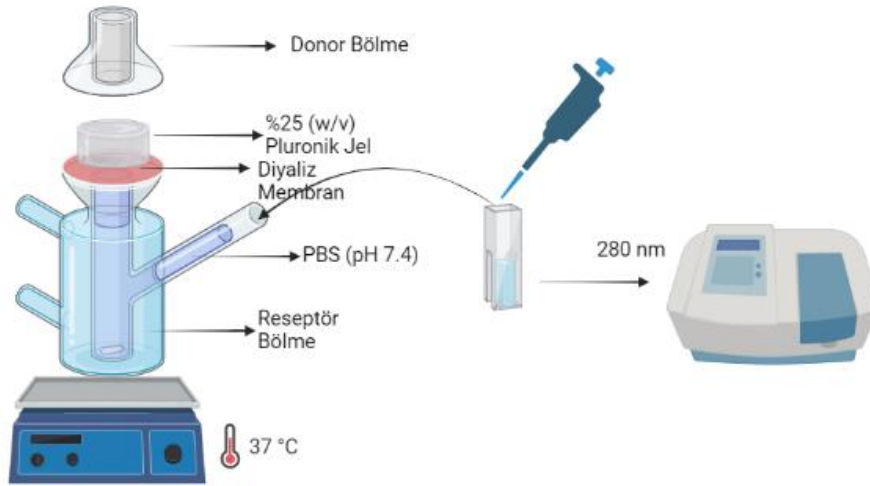
Sıcaklığa duyarlı jelin tükenme hızı membransız metot ile takip edilmiştir [184]. Belirli hacimde boş ya da partikül yüklü jeller hazırlanmıştır. 37 °C'e ayarlanan ısıtıcı üzerine yerleştirilerek jelleşmesi sağlanmıştır. Cam şişe içerisinde bulunan jel ters-düz edilerek jelleşmesi kontrol edilmiştir. Kontrol edildikten sonra cam şişe içerisinde jelin ağırlığı ölçülerek kaydedilmiştir. Daha sonra jel üzerine aynı hacimde aynı sıcaklıkta pH 7.4'te PBS yavaş yavaş eklenmiştir. Belirli zaman aralıklarında üzerindeki PBS alınarak cam şişe içerisinde kalan jelin ağırlığı ölçülmüştür. Ölçülen değer ile cam şişenin ağırlığının farkı alınarak jelin ağırlığı kaydedilmiştir.

3.8.4 Sıcaklığa Duyarlı Hidrojelin İn vitro Salım Davranışı

Hidrojelin in vitro salım davranışı iki farklı yöntem ile çalışılmıştır. Lizozim'nin jel içerisinde ve %25 (w/v) pluronik F127 jel içinde polimer-lipit hibrit partiküllerden in vitro salımı Franz difüzyon hücresi kullanılarak araştırılmıştır. Franz difüzyon hücresi kremlerden, merhemlerden ve jellerden in vitro ilaç salımını ölçmek için basit, tekrarlanabilir bir testtir. Franz hücresi, bir zar ya da membran ile ayrılmış iki ana bölmeden oluşmaktadır. Malzeme donör bölmesi ile membrana yüklenmektedir. Alt bölme reseptör bölme salım analizi için düzenli aralıklarla numunelerin alındığı salım ortamı içermektedir. Bu yöntem belirli zaman aralıklarında zardan ya da membrandan geçebilen aktif ilaç miktarını belirlemektedir.

1,5 ml malzeme yüklü jel donör bölmeye yüklenmiştir ve donör bölme ile reseptör bölme diyaliz membran ile ayrılmıştır. Reseptör bölmeye ise salım ortamı olarak pH 7.4'te 12 ml PBS eklenmiştir. Reseptör bölmesi içinde bulunan salım ortamı sabit sıcaklıkta 37°C'de tutulmuştur ve sürekli karıştırılmıştır.

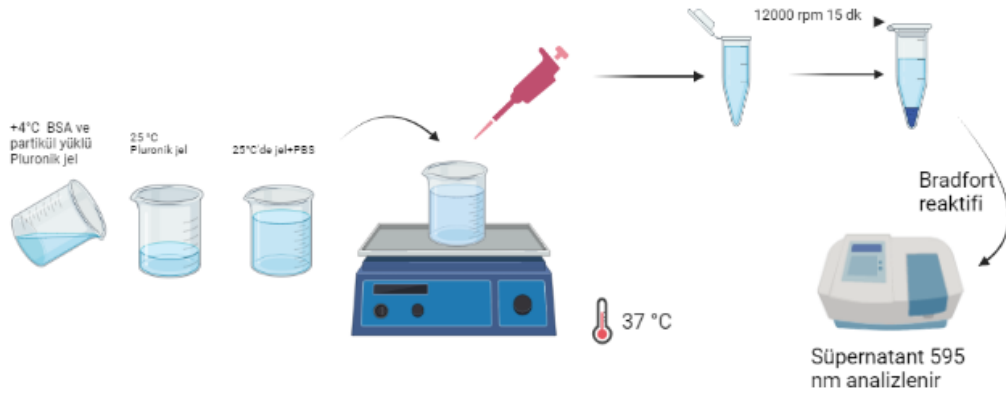
Franz difüzyon hücresi ile in vitro salım çalışmasının şematik gösterimi şekil 3.9'da gösterilmiştir.



Şekil 3-9 Lizozim'in jel içerisinde ve %25 (w/v) pluronik F127 jel içinde polimer-lipit hibrit partiküllerden salınım Franz difüzyon hücre yönteminin şematik gösterimi

Franz difüzyon hücresi vücudun fizyolojik durumunu mimik etmek için 150 rpm'de 37°C'de inkübe edilmiştir. Belirli zaman aralıklarında örnekler alınıp Lizozim'nin absorbansları 280 nm'de 1 ml kuvars küvetli UV-vis spektrofotometresi (Thermo Scientific™, GENESYS 10S) ile ölçülmüştür.

Sığır serum albumin'nin jel içerisinde ve %25 (w/v) pluronik F127 jel içinde polimer-lipit hibrit partiküllerden *in vitro* salınım membransız metot kullanılarak araştırılmıştır.[167] Yöntem şu şekildedir. Cam şişe içerisine 3 ml %25 (w/v) pluronik F127 jel çözeltisi hazırlanmıştır. İçerisine 3 ml sığır serum albumin yüklü polimer-lipit hibrit partiküller eklenmiştir. Elde edilen partikül yüklü jel çözeltisi 30 dk boyunca soğuk su banyosunda karıştırılarak jelin içerisine partiküllerin yüklenmesi sağlanmıştır. Jel çözeltisi 37°C'de ısıtıcı üzerine yerleştirilerek jelleşmesi sağlanmıştır. Şişe ters çevrilip jelleşmesi kontrol edildikten sonra üzerine aynı hacimde pH 7.4 'de PBS eklenmiştir. Eklenen PBS'in aynı sıcaklıkta olmasında dikkat edilmiştir ve yavaş yavaş eklenmiştir. Salım başlatılmıştır. Belirli zaman aralıklarında salım ortamından PBS'in tamamı alınarak santrifüj tüplerine aktarılmıştır ve santrifüj edilmiştir. Elde edilen süpernatant Bradford reaktifi ile etkileştirilerek salınan sığır serum albumin'nin absorbansı 595 nm'de 1 ml kuvars küvetli UV-vis spektrofotometresi (Thermo Scientific™, GENESYS 10S) ile analiz edilmiştir. Jel üzerine aynı hacimde taze aynı sıcaklıkta pH 7.4'de PBS eklenmiştir. Jel tükenene kadar salım devam ettirilmiştir. Sığır serum albumin'nin jel içerisinde ve polimer-lipit partikül yüklü jel içerisindeki *in vitro* salım yöntemi Şekil 3.10 'da şematik olarak gösterilmiştir.



Şekil 3-10 BSA'nın jel içerisinde ve %25 (w/v) pluronik F127 jel içinde polimer-lipit hibrit partiküllerden salımın membransız yöntemin şematik gösterimi
Bütün deneyler 2 kez tekrarlanmıştır.

3.9 İn Vivo Çalışmalar

Bu çalışma Hacettepe Üniversitesi dene hayvanları laboratuvar'ında deney hayvanları uygulama ve araştırma merkezi (HÜDHAM) tarafından gerçekleştirilmiştir. Çalışmada KOBAY D.H.L.A.Ş 'den elden edilen, ağırlıkları 250-350 g arası değişen 10 adet Spraque Dawley rat türü üzerinden gerçekleştirilmiştir. Literatürdeki ratlarda yara modelleri oluşturulan çalışmalarda genellikle erkek türü seçildiği için tez çalışmasında da cinsiyet olarak erkek tercih edilmiştir.

Gerekli etik kurul izni 23.02.2021 tarihinde, 2021/02-08 karar numarası ile Hacettepe Üniversitesi Hayvan Deneyleri Yerel Etik Kurulu'ndan alınmıştır. Sıçanlar çalışmanın devamlılığı nedeniyle ayrı ayrı kafeslere yerleştirildi ve 12 saat aydınlık, 12 saat karanlık düzeninde tutularak çeşme suyu ve standart pellet sıçan yemi ile beslenmiştir.

3.9.1 Sıçanların Diyabetik Hale Getirilmesi ve Yara Oluşturma

Deneyde kullanılan ratlarda, Streptozotosin ile diyabet hasta modeli oluşturulmuştur [193]. Ratları diyabetik hale getirmek için ilk önce pH 4.5 0,1 M Sodyum Sitrata tamponu hazırlanmıştır[194]. Sodyum sitrat tamponu 0,332 g sodyum sitratın 250 ml distile su içinde çözülürken elde edilmiştir. pH'ı 7.4 olan çözeltiye 1 M HCl damla damla eklenerek pH'ı 4.5'e getirilmiştir. Tampon çözelti (0,1 M pH 4.5) hazırlandıktan sonra -20 °C' de muhafaza edilmiş Streptozotosin içerisinde çözülürmüştür. Taze çözelti, diyabetik hale getirmeyi hedeflediğimiz 10 adet rata, intra peritoneal olarak 65 mg/kg dozunda tek doz olacak şekilde enjekte edilmiştir. Enjeksiyondan sonra yem ve su

verilerek 12 saat 12 saat gece düzeninde, sabit sıcaklık (21-24 °C ortamında) ve nem altında laboratuvar şartlarında barındırılmıştır. 0.gün, 3.gün, 7.gün, 14.gün ve 21.günde açlık kan şekerleri takibi yapılmıştır. Kuyruktan alınan kandan ölçülen açlık kan şekeri 400 mg/dl üzerine ulaşan ratların diyabetik olduğu kabul edilmiştir [195]. Açlık kan şekerini ölçmek için bir damla kan ile ölçüm yapabilen cihaz kullanılmıştır.

3.9.2 Diyabetik Hale Getirilen Sıçanlara Yara Modeli Oluşturma

Hayvanlarda yaraların oluşturulmasından hemen önce 90/10 mg/kg oranında ksilazin/ketamin intra peritoneal olarak enjekte edilerek hayvanlara anestezi uygulanmıştır. Sırt bölgesi temizlenerek tıraş edilmiştir. Sıçanların sırt temizliğinden sonra cerrahi bıçak ve forseps kullanılarak sırtın sağ ve sol tarafında paslanmaz çelik ile 2 cm çaplı 4 adet tam kat (panniculus carnosus içerecek şekilde) dairesel defektler oluşturulmuştur. Yara oluşturma prosedürü uygulaması için ratlar barındırıldıkları odalardan çalışma laboratuvarına getirilmiştir. Yara oluşturulmadan önce, tüm ratlara genel anestezi uygulanmıştır. Anestezi işlemi için her bir rata ketamin ve ksilazin intraperitoneal olarak verilmiştir. (Şekil 3.11) Anestezi altındaki ratlar yüzüstü pozisyonda yatırılmıştır. Bunu takiben tüm ratların sırt bölgesi traşı yapılmıştır ve bölge batikon ile temizlenmiştir. Tıraş sırasında sırt bölgesinin deri bütünlüğü korunmuştur. Şekil 3.12'de gösterilmiştir.



Şekil 3-11 Anestezi altındaki sıçan

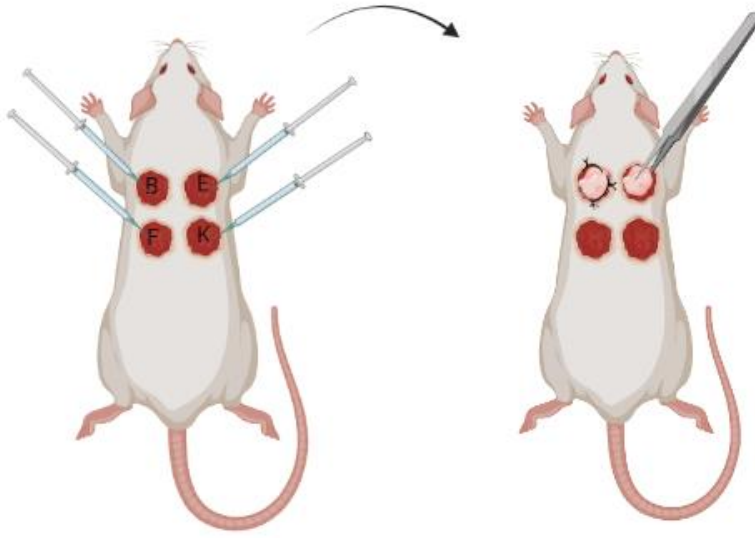


Şekil 3-12 Anestezi altındaki ratın sırt kısmının traş edilmesi

Tüm uygulamalardan sonra hayvanların ağrı ve acı duymaması için yara bölgelerine antibiyotik krem sürülmüştür. Deneyle sırasında hayvanların ağırlıkları, beslenme durumları takip edilmiştir. Hayvanlar ayrı ayrı kafeslerde tutularak 12 saat aydınlık-12 saat karanlık döngüde standart laboratuvar yemi ve %10 şekerli su ile beslenerek barındırılmıştır. Sıçanların çalışma boyunca diyabet durumları hakkında bilgi almak için yaraların 4.gününde ve 10.gününde kan şekeri ölçümü yapılmıştır.

3.9.3 Yara Bölgesinin Makroskopik Olarak Değerlendirilmesi

Yaralar oluşturulmasından sonra her bir sıçana aşağıdaki şematik gösterime göre jel içerisindeki taşıyıcı sistem sırasıyla yara bölgesine enjekte edilmiştir.(Şekil 3.13)



Şekil 3-13 Yara bölgesine Taşıyıcı Sistemin Verilmesinin Şematik Gösterimi

Şekil 3.13'e göre B harfi ile gösterilen yaraya protein yüklü olmayan boş PCL/Lesitin/Geleol polimer lipit hibrit partiküllerin yüklü jel enjekte edilmiştir.

E harfi ile gösterilen yaraya VEGF ve GM-CSF'nin tek başına bulunduğu jel enjekte edilmiştir.

F harfi ile gösterilen yaraya VEGF/GM-CSF yüklü PCL/Lesitin/Geleol polimer lipit hibrit partiküllerin yüklü olduğu jel enjekte edilmiştir.

K harfi ile gösterilen yara ise herhangi tedavi yöntemi uygulanmayan yara olmuştur.

Bu yaraların üzeri bölgeden çıkartılan derilerin dikilmesi ile kapatılmış biyolojik örtü materyali/otogrefti olarak kullanılmıştır. Uygulamadan sonraki 10 gün boyunca her hayvanın dijital olarak fotoğrafı çekilmiştir. Fotoğraflar bilgisayar ortamına aktarılarak yara alanı ImageJ programı kullanılarak yara alanları hesaplanmıştır. Elde edilen yara alanlarındaki canlı/sağlıklı deri grefti ile nekroza giden deri alanları takibe alınmıştır. Yara alanları hareketle aşağıda verilen formül kullanılarak % olarak yara alanları hesaplanmıştır.

$$\% \text{ Yara Alanı} = (A_t / A_0) \times 100$$

[Eşitlik III]

A₀ : 0. günde ölçülen yara alanı (cm²)

A_t : t. günde ölçülen yara alanı (cm²)

Yara onarımının tamamlanması, yara oluşumunun ilk günündeki (sıfıncı zamanındaki) alana eşit bir yara alanı olarak kabul edilmiştir.

3.9.4 Histomorfometri

10.günde denekler usulüne uygun olarak CO₂ odalarında sakrifiye edildi. Deney alanları pannikulus dahil edilecek şekilde eksize edilerek inceleme için formol kaplarına alındı. Makroskopik bulgular elde edildi. Histolojik çalışmalar, sırt bölgelerinden alınan tam kalınlıktaki yaralar ve bölüm 3.9.3 'de anlatıldığı gibi (10.günde alınan doku örneklerinden) histolojik incelemeler gerçekleştirilmiştir. Deney gruplarında granülasyon dokusu ve epidermisin morfolojik yapısı, granülasyon dokusundaki kollajen liflerinin doygunluğunu ve bütünlüğünü araştırılmıştır. Aynı zamanda birim alandaki damar sayımı (vaskülarizasyon) değerlendirilmiştir.

Yara örnekleri sağlam çevre dokusu ile beraber alınarak %10 fosfat tamponlanmış formalin çözeltisine alınmıştır. Örnekler tampon çözeltisi ile yıkandıktan sonra sabit vakumlu doku takip cihazında (Leica, Almanya) dereceli alkollerden ve ksilolden geçirilerek rutin yöntemle parafin bloklara gömülmüştür. Bloklardan 3-5 µm kalınlığında parafin kesitler kızaklı mikrotomda (Leica, Almanya) alındıktan sonra elde edilen kesitler deparafinize edilmiştir. GM-CSF/VEGF yüklü hibrit mikropartikül içeren jel, tek başına GM-CSF/VEGF içeren jel ve boş hibrit partikül içeren jelin uygulandığı örneklerle ait yara kesitleri Hematoksilen eozin ve Masson trikrom ile boyandıktan sonra ışık mikroskopu (Leica DMB6 B, Wetzlar, Almanya) ve dijital kamera (Leica DFC7000 T, Wetzlar, Almanya) aracılığıyla bilgisayar ortamına aktarılmıştır. Yara alanında semikantitatif olarak inflamatuvar hücre infiltrasyonu (granülasyon dokusu oluşumu), neovaskülarizasyon ve fibrozis değerlendirilmiştir. Histolojik kesitlerin inflamasyon, neovaskülarizasyon ve fibrozis açısından skor dereceleri ve kriterleri özetlenmiştir (çizelge 3.2) [196].

Çizelge 3-2 Histolojik kesitlerin inflamasyon, neovaskülarizasyon ve fibrozis açısından skor dereceleri ve kriterleri

Skor	İnflamasyon	Neovaskülarizasyon	Fibrozis
1 – 3	%25'ten az alanda granülasyon dokusu ve inflamatuvar hücre infiltrasyonu	%25'ten az alanda damarlanma	%25'ten az alanda fibroblastlar ve kollajen birikimi
4 – 6	%25-50 alanda granülasyon dokusu ve inflamatuvar hücre infiltrasyonu	%25-50 alanda damarlanma	%25-50 alanda fibroblastlar ve kollajen birikimi
7 – 9	%50-75 alanda granülasyon dokusu ve inflamatuvar hücre infiltrasyonu	%50-75 alanda damarlanma	%50-75 alanda fibroblastlar ve kollajen birikimi
10 – 12	%75-100 alanda granülasyon dokusu ve inflamatuvar hücre infiltrasyonu	%75-100 alanda damarlanma	%75-100 alanda fibroblastlar ve kollajen birikimi
13 – 15	%100 alanda (tüm yara alanında) kalın matür granülasyon dokusu ve inflamatuvar hücre infiltrasyonu	%100 alanda (tüm yara alanında) damarlanma	%100 alanda (tüm yara alanında) alanda fibroblastlar ve kollajen birikimi

İstatistiksel Analiz

Kontrol grubu ile GM-CSF/VEGF yüklü hibrit mikropartikül içeren jel, tek başına GM-CSF/VEGF içeren jel ve boş hibrit partikül içeren jel uygulanan gruplar bağımsız değişkenleri, histomorfometri verileri bağımlı değişkeni temsil etmektedir. Verilerin normal dağılımı, Shapiro-Wilk testi ile değerlendirilmiştir. Parametrik histomorfometrik veriler, çoklu karşılaştırmalar için tek yönlü varyans analizi (ANOVA), ikili karşılaştırmalar için post-hoc Duncan testi ile değerlendirilmiştir. p-değeri 0.05'ten küçük olan veri grupları istatistiksel anlamlı kabul edilmiştir. İstatistiksel analizler SPSS programında gerçekleştirilmiştir (v25, IBM Statistics).

4 SONUÇLAR ve TARTIŞMA

Gerçekleştirilen yüksek lisans tez çalışmasındaki amacımız kronik yaraların yara iyileşme hızının artırılması için birden fazla büyüme faktörlerin salınımına olanak veren çok bileşenli kontrollü salımı sağlayabilecek bir taşıyıcı sistem tasarlanmıştır. Bu sistem uygulama şekli düşünülerek poloksamer tabanlı hidrojel ve içerisine seçilen makromoleküller yüklenmiş partikülleri taşıyan bir yapı olarak tasarlanmış in vitro ve ön in vivo çalışmaları ile incelenmiştir. Bu tez çalışma kapsamında kronik yaraların iyileşme hızını arttırmaya yardımcı olan etken maddelerin (GM-CSF/VEGF) taşınımı ve kontrollü salımını sağlamak için üç farklı yapıda partikül taşıyıcı sistemin optimizasyon çalışmaları gerçekleştirilmiştir. İlk partikül sistemi uygun boyut ve yüzey özelliklerine sahip, biyoyumlu ve biyobozunur PCL tabanlı partiküllerdir. İkinci partikül sistemi farklı oranlarda lesitin içeren PCL/Lesitin monolit partiküllerdir. Üçüncü partikül sistemi ise uygun boyut ve yüzey özelliklerine sahip farklı molekül ağırlığındaki etken maddeleri taşınımı ve kontrollü salımını sağlayabilen biyoyumlu ve biyobozunur polimer-lipit yapıları hibrit partiküllerdir. Literatürde yer alan çalışmalar incelendiğinde, kronik yara tedavileri ve yara iyileşme hızını etkileyen faktörlerin incelenmesi detaylı bir araştırma konusudur. Literatürde yara iyileşmesinin birçok evresinde etkin rol oynayan iki etken maddeyi ayrı ayrı taşıyan taşıyıcı sistem ile ilgili çalışmalar mevcuttur [2, 103]. Fakat literatür daha fazla araştırıldığında GM-CSF ve VEGF'nin birlikte partikül içerisine yüklenip kronik yaralardaki etki mekanizmasını araştıran bir çalışmaya rastlanmamıştır. İkisinin birlikte kapsüllenmesiyle molekül ağırlıklarına göre sıralı bir salım sağlanarak iyileşmesi zor olan yaranın farklı basamaklarını etkileyerek hızlı iyileşmesi öngörülmüştür. Ayrıca polimer-lipit hibrit partiküller ile ilgili çalışmalar incelendiğinde GM-CSF ve/veya VEGF taşıyan taşıyıcı sistemlere rastlanmamıştır. Hatta tasarladığımız PCL-lipit sırasıyla çekirdek-kabuk sistemin yaralar üzerinde çalışmaları bilginiz dahilinde mevcut değildir. Partikül sistemlerin yara bölgesine topikal olarak verilmesi için çeşitli hidrojel sistemleri tasarlanmıştır [2] [172]. Fakat GM-CSF ve/veya VEGF'nin olduğu partiküllerin sıcaklığa duyarlı jel sistemine gömülü ve partiküllerden salımını inceleyen, iyileşmesi zor olan yaralarda iyileşme mekanizmasının araştıran herhangi bir çalışmaya rastlanmamıştır.

Bu bilgiler doğrultusunda kronik yaraların tedavisi için uygun boyut ve yüzey özelliklerine sahip polimerik ve polimer-lipit hibrit partiküllerin, etken malzemelerinin

kapsüllenmesi ve tedavi edici yönde salınması amacıyla hazırlanması amaçlanmıştır. Hazırlanması süresince temel ve yardımcı malzemeler üzerinde değişiklikler yapılmıştır. Partiküllerin optimizasyonu ve karakterizasyonu için model proteinler ile çalışılmıştır. İzoelektrik noktası (P_I) yaklaşık olarak 5 olan BSA'nın sudaki çözünürlüğü çok yüksektir. pH 5'in altında düştüğü koşullarda net yükü pozitif olmaktadır [197]. pH 5 üzerine çıktığında net yükü negatif olmaktadır [198]. Molekül ağırlığı 60 kDa'dır. Molekül ağırlığı 44 kDa olan VEGF proteinine model olarak seçilmiştir. VEGF 'de proteinler gibi sudaki çözünürlüğü yüksektir[199]. pI değeri 8.5 olan VEGF ise negatif yüklüdür. VEGF'in bu gibi özellikleriyle BSA ile benzer bulunmuş ve modeli olarak seçilmiştir. Yüksek izoelektrik noktasına (pI 11) ,14.3 kDa molekül ağırlığına sahip bir bazik protein olan lizozim, GM-CSF proteinin modeli olarak seçilmiştir. Benzer molekül ağırlığına sahip (14.5 kDa) GM-CSF izoelektrik noktanın (pI 4.95) altında ve üstünde suda çok çözünmektedir. Lizozim de suda yüksek çözünürlük özellik göstermektedir [200]. Ayrıca iki proteininde analizleme yöntemi araştırılmıştır. Araştırmalar sonunda bradford metodu ile analizlendikleri bulunmuştur [124] [201]. Lizozim ve GM-CSF ile ilgili kriterler göz önünde bulundurularak GM-CSF'nin modeli olarak lizozim tercih edilmiştir. Tez çalışma kapsamında in vitro deneyler model proteinler üzerinden ilerlemiştir.

4.1 PCL Partiküllerin Hazırlanması

Tez çalışmasında PCL, viskoelastik ve fizikokimyasal özelliklerinden dolayı polimerik bazlı büyüme faktörü yüklü malzememizin çekirdeği olarak seçilmiştir. Proteinler gibi suda çözünür etken maddelerle yüklü polimerik partiküller hazırlanması için uygun bir yöntem olan çift emülsiyon (W/O/W) yöntemi ile büyüme faktörlerin kapsüllenmesi için PCL partiküller sentezlenmiştir. Bu yöntemin avantajları şu şekilde sıralanabilir sentez basamakları basit parametrelerden oluşmakta ve işlem sırasından çok fazla toksik kimyasal madde içermemekte ve pahalı cihazların kullanımını gerektirmeden partiküller üretebilmektedir. Bu yöntemle hazırlanan yapılar suda çözünürlüğü yüksek olan, proteinleri ve peptitleri yüksek oranda içlerine alabilmektedir [202].

Tez çalışmasında, PCL'nin çözülmesi için organik çözücü olarak etil asetat kullanımı seçilmiştir. Çünkü etil asetat etken malzemelerin biyoaktivitesi üzerinde düşük bozucu etkiye sahip olduğu literatürde kanıtlanmıştır [203]. Emülsiyon edici ajan olarak Pluronik F127 kullanılmıştır. F127'nin suda ve yağda çözünmesi kolay bir yüzey aktif madde olduğu ve toksik bir özelliği taşımadığı için tercih edilmiştir. Ayrıca FDA onaylıdır.

Taşıyıcı sistem olan partiküller iki aşamada hazırlanmıştır. İlk aşama birinci emülsiyonun olduğu aşamadır. Birinci emülsiyon yağ içinde su (W/O)'yun karıştırıldığı emülsiyondur. Emülsiyonda etken malzemeleri (BSA ve/veya Lizozim) içeren sulu çözelti, etil asetat/DCM içinde PCL ve/veya lesitin/galeol çözünmesinden oluşan organik faza dağılır.

İkinci aşama, ikinci emülsiyonun olduğu aşamadır. Bu aşama birinci emülsiyonun F127 sulu çözeltisine (%0.35 w/v) veya PVA sulu çözeltisine eklenmesi ve su içinde yağ içinde su (W/O/W) elde edilmesidir. Sonra organik çözücülerin belirli sürede buharlaştırılmasıyla partiküller elde edilmiştir.

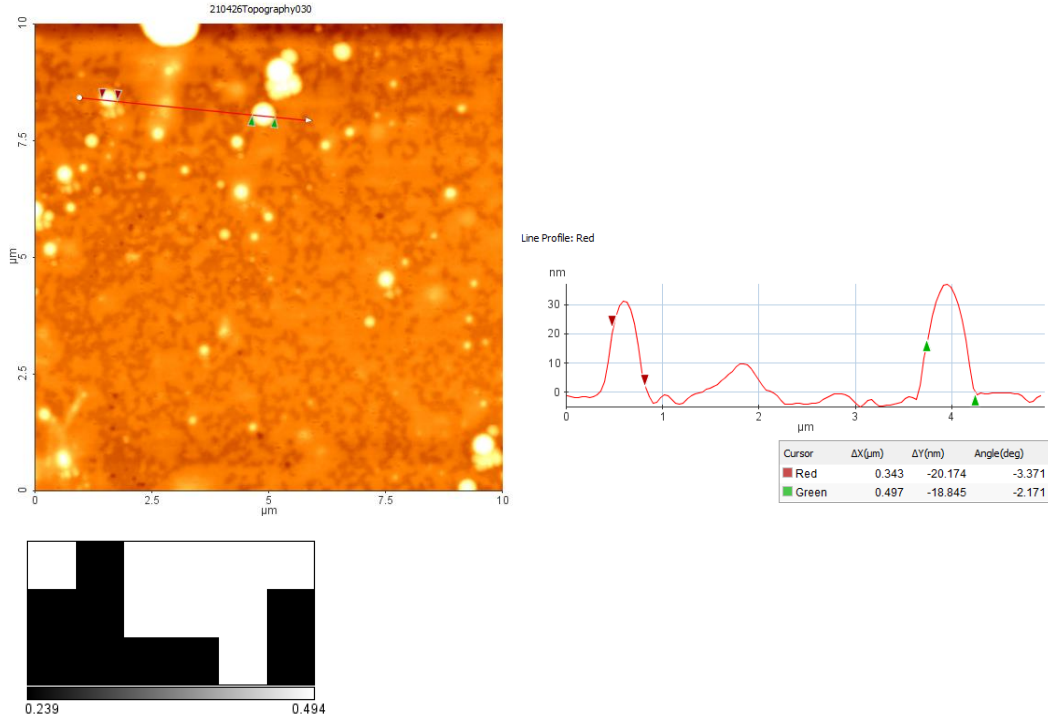
4.2 PCL Partikülleri Karakterizasyonu

Partiküllerin boyutları ve morfolojileri, atomik kuvvet mikroskobu, taramalı elektron mikroskobu ve dinamik ışık saçılımı (DLS) teknikleri kullanılarak karakterize edilmiştir. AFM ve SEM görüntüleri partiküllerin topografisini hakkında bilgi vermektedir. DLS, partiküllerin hidrodinamik yarıçapını ve boyut dağılımı profilleri hakkında bilgi edinmek için kullanılmıştır.

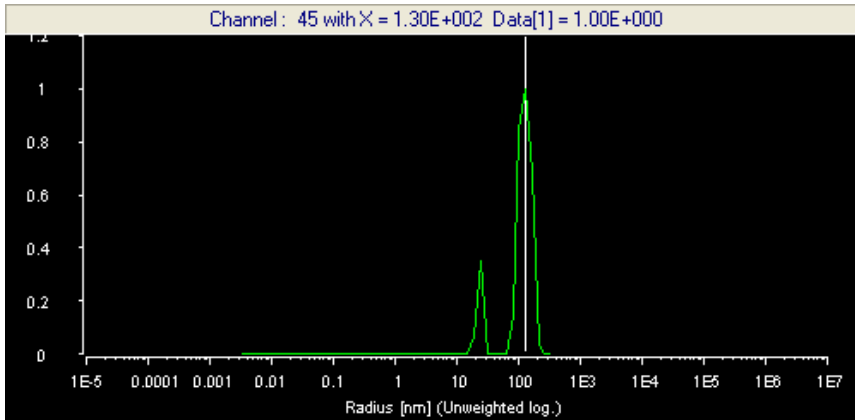
4.2.1 Polimerik Partiküllerin Karakterizasyonu

Tez çalışmasında kapsamında polimerik partiküllerin hazırlanması sırasında model protein olarak BSA ve Lizozim, polimerik malzeme olarak PCL kullanılmıştır. Daha önce grubumuzda çalışılan çift emülsiyon yöntemi ile sentezlenen insülin yüklü PCL nanopartiküller baz alınmıştır [153].

Elde edilen PCL partiküllerin AFM görüntüleri şekil 4.1'de gösterilmiştir. Şekil 4.1 incelendiğinde partiküllerin pürüzsüz bir yüzeye sahip olduğu ve küresel bir yapıda olduğu görülmüştür. Boyutlarının yaklaşık olarak 239 ± 35 nm ortalama bir çapa sahip oldukları elde edilmiştir. DLS ölçümünde polidispers bir boyut dağılımı (PDI: 0.288 ± 0.031) ile birlikte 190 ± 57 nm ortalama bir çapa sahip olduğu şekil 4.2'de dinamik ışık dağılımı görüntüsü ile gösterilmiştir.



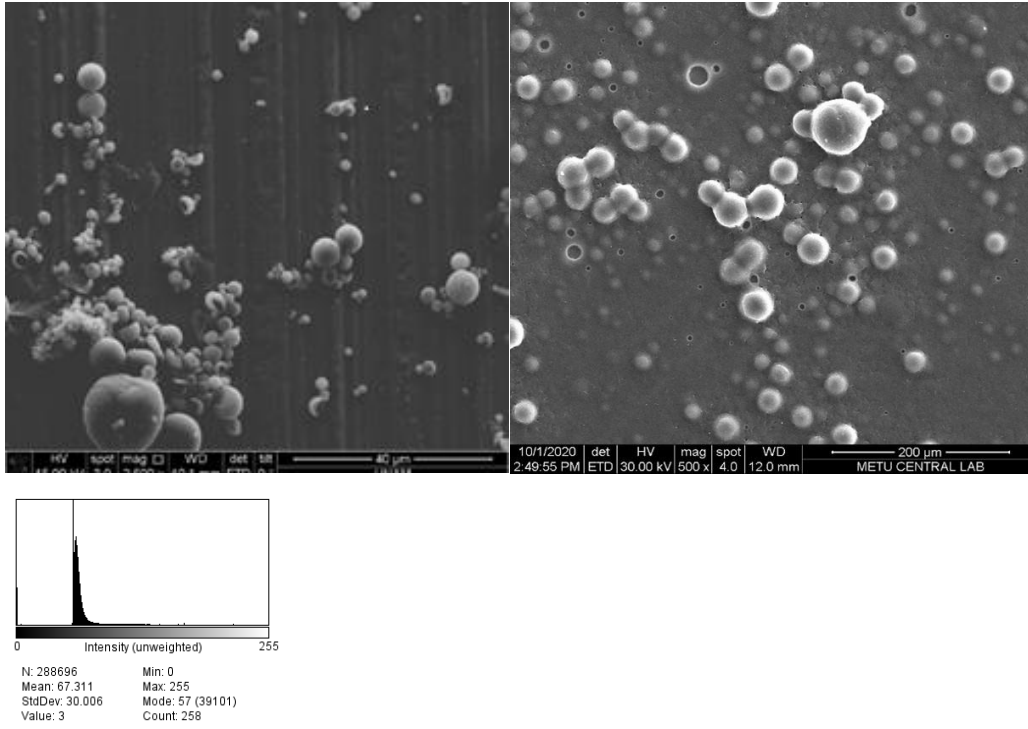
Şekil 4-1 PCL partiküllerin AFM görüntüsü



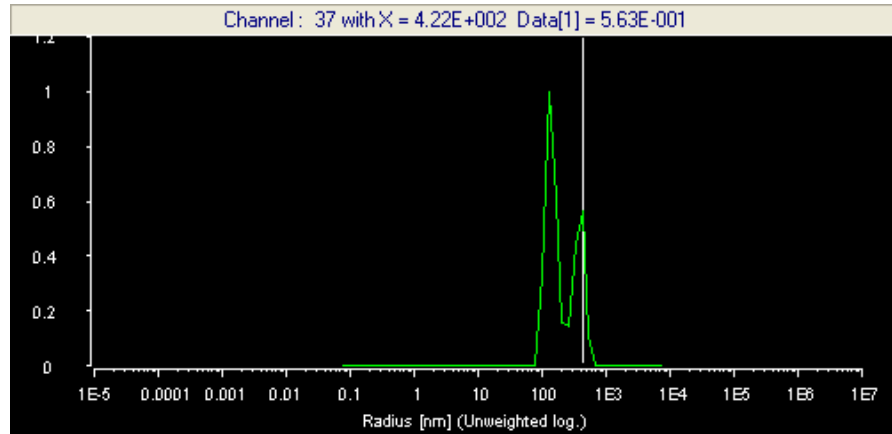
Şekil 4-2 PCL partiküllerin dinamik ışık saçılımı görüntüsü

Hazırlanan PCL partiküllerinin sem görüntülerinden (Şekil 4.3), BSA yüklü PCL partiküllerin pürüzsüz yüzeye sahip küresel bir şekle sahip olduğu görülmüştür. Bu pürüzsüz ve küresel yapı PCL polimerinin hidrofobik yapısından kaynaklandığı düşünülmektedir. SEM ölçümünde (Şekil 4.3), partiküllerin boyutların yaklaşık 947 ± 29 nm'lik bir ortalama çapa sahip olduğu görülmüştür. DLS ölçümünde (Şekil 4.4), partiküllerin bir polidispers boyut dağılımı (PDI: 0.431 ± 0.02) ile yaklaşık 980 ± 36 nm'lik bir ortalama boyuta sahip olduğu görülmüştür. DLS sonuçlarında partiküllerin

büyük olmasının nedeni DLS için örnek hazırlarken örneğin su içerisinde olması ve hidrodinamik yarıçapları ölçülmesidir.



Şekil 4-3 BSA yüklü PCL partiküllerin SEM görüntüsü

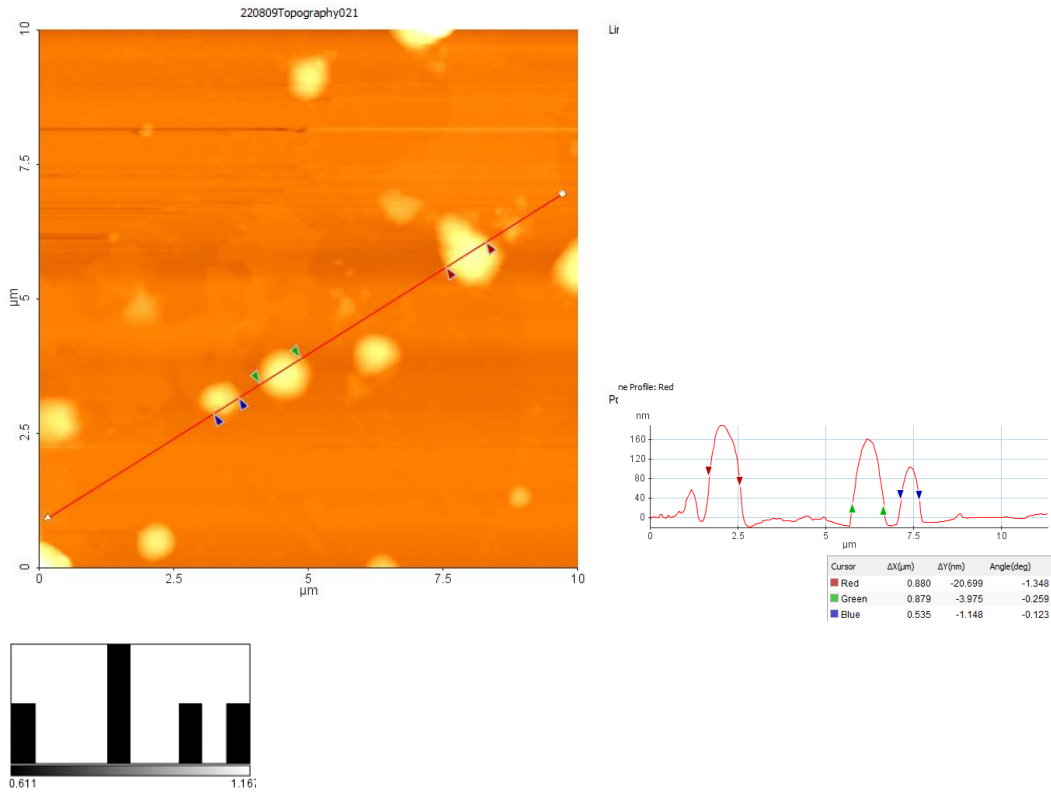


Şekil 4-4 BSA yüklü PCL partiküllerin dinamik ışık saçılımı görüntüsü

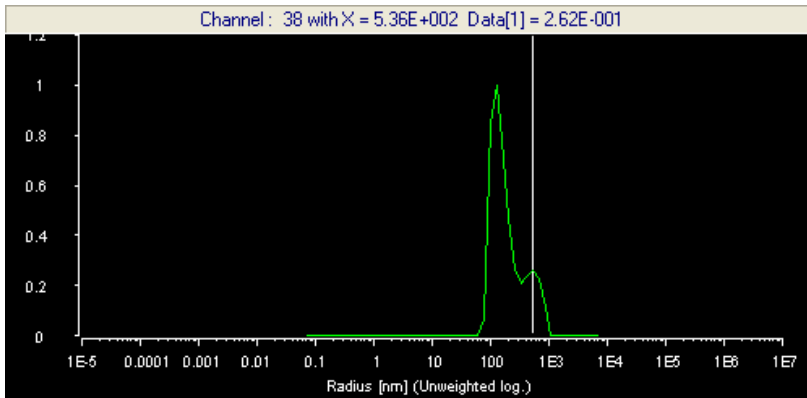
SEM ve DLS’de alınan sonuçlar literatürle ile benzerdir [204]. Boyutlar incelendiğinde yaklaşık olarak 1 mikron olduğu görülmüştür. Aynı prosedür ile sentezlenen insülin yüklü PCL nanopartiküller ile boyutlar karşılaştırıldığında önemli derece fark olduğu gözlemlenmiştir. Nedeninin ise yüklenen proteinlerin farklı molekül ağırlığına sahip

olmasından kaynaklandığı düşünülmektedir. İnsülin'in molekül ağırlığı yaklaşık 6 kDa, BSA'nın molekül ağırlığı yaklaşık olarak 60 kDa'dır.

BSA yüklü PCL partiküllerin boyut karakterizasyonu elde edildikten sonra aynı partiküllere lizozim yüklenerek lizozim yüklü PCL partiküllerin boyutları DLS ve AFM'de karakterize edilmiştir. DLS ölçümünde (Şekil 4.6), lizozim yüklü PCL partiküllerin bir polidispers boyut dağılımı (PDI: 0.4183 ± 0.09) ile yaklaşık $935,76 \pm 47$ nm'lik bir ortalama çapa sahip olduğu görülmüştür. AFM ölçümünde elde edilen sonuçlarla yaklaşık boyutlarının 909.8 ± 22 nm olduğu şekil 4.5'de belirtilmiştir.



Şekil 4-5 Lizozim yüklü PCL partiküllerin AFM görüntüsü



Şekil 4-6 Lizozim yüklü PCL partiküllerin dinamik ışık saçılımı görüntüsü

4.2.2 PCL/Lesitin Monolit Partiküllerin Hazırlanması ve Karakterizasyonu

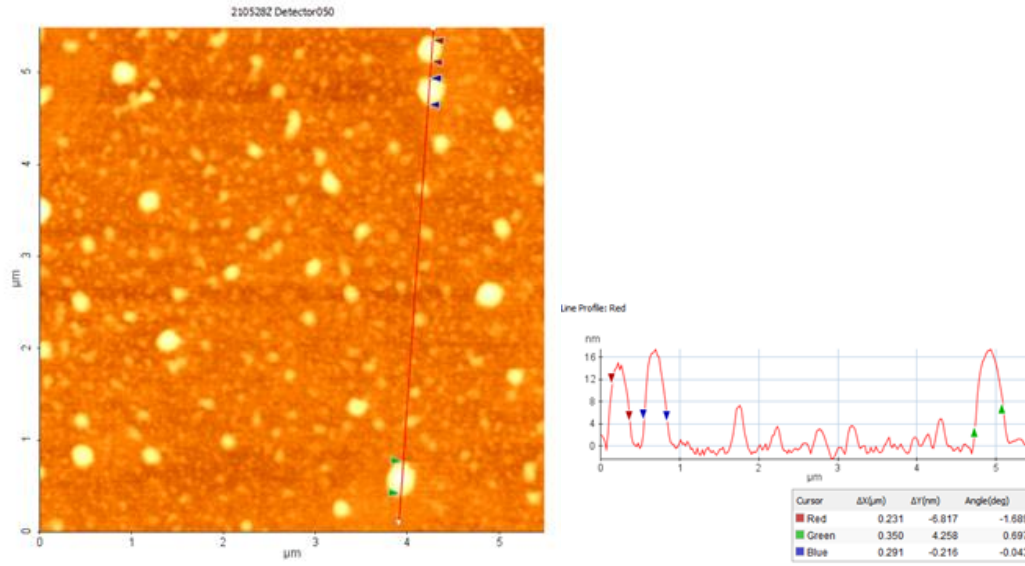
PCL, biyoyumluluk ve biyobozunurluk özelliklerin dolayı nanopartikül hazırlanmasında en çok kullanılan polimerlerden biridir [128, 205]. Suda çözünmeyen hidrofobik özelliğinde olduğu için hidrofilik ilaçların verimli bir şekilde kapsüllenmesi engel teşkil etmektedir. PCL'nin bu engelini ortadan kaldırmak için hidrofilik ilaçların- proteinleri, peptitleri verimli bir şekilde içerisine alabilmesi için çift emülsiyon oluşturma metoduna ek olarak partikül oluşturma sırasında bazı surfaktanlar ve lipitlerin eklendiği literatürde görülmüştür [14] [128] [205]. Lipitler sayesinde daha hidrofilik bir ortam oluşmakta ve protein ortamdan uzaklaşmamaktadır. Protein lipidin karbonil kuyrukları arasında hidrofobik etkileşim oluşturmaktadır [126]. Literatürde bir başka örnekte katı lipit nanopartiküllerin BSA'yı içine aldığı göstermişlerdir [206].

Bu tez çalışmasında model protein olan BSA'nın PCL partiküllerce daha fazla kapsüllenebilmesi için partiküllerin hazırlanması sırasında prosedürde bazı modifikasyonlar yapılmıştır. Polimerik çekirdek malzemesi olarak PCL kullanılmıştır. Lipit ve lipofilik yüzey aktif madde olarak lesitin (100 mg, 200 mg, 500 mg) seçilmiştir. Çift emülsiyon yönteminin bir fazı olan yağ fazını hazırlarken polimer ve lipit olan lesitin bir arada çözücü içerisinde çözünmesi sağlanmıştır. Hidrofobik ortamı biraz daha hidrofilik hale getirmek ve BSA'nın ortamdan kaçmasını engellemek için dış su fazı olarak emülsiyon edici ajan olarak F127 seçilmiştir. Literatürde BSA'nın doğası gereği hidrofobik ortamdan kaçma yaklaşımını önlemek yerine genel emülsiyon edici ajan olarak kullanılan PVA yerine Pluronic F127 kullanımı önerilmektedir [126].

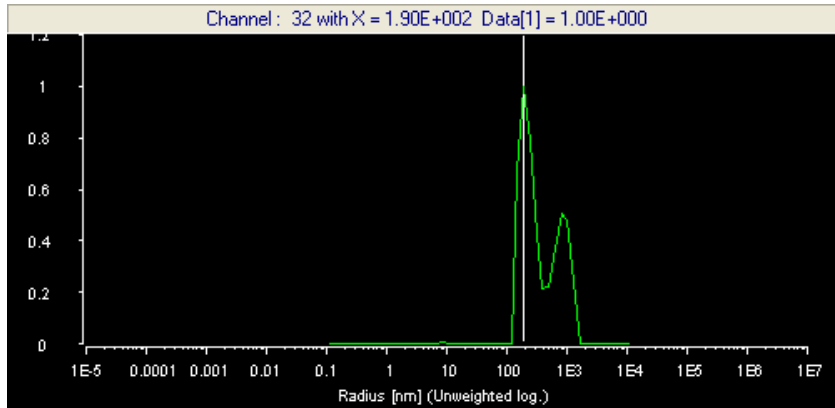
Bu partiküllerin hazırlanmasında kullanılan lesitin, bir diğer adıyla fosfatidilkolin glikolipitler, trigliseridler ve fosfolipitlerden oluşan bir karışımdır. Soya fasulyesi ve yumurta sarısında bulunmaktadır. Lesitin hem gıda hem de gıda dışı birçok ürünün önemli bir bileşenidir. Yağlı tohum endüstrisinin en çok kullanılan yan ürünlerinden biridir. Lesitin gıdalarda emülgatör ajanı olarak, viskoziteyi azaltmak için ıslatıcı ajan olarak kullanılmaktadır. Aynı zamanda salın ajanı ve kristalizasyon kontrolü sağlayıcı ajan gibi görevleri de mevcuttur [207]. İlaç taşıma sistemlerinde lipit temelli taşıyıcı sistemlerinde ana bileşen olarak kullanıldığı çalışmalar mevcuttur [208]. Ayrıca lesitin lipofilik özelliğinden dolayı polimerik partiküllerde surfaktan olarak kullanıldığı çalışmalar mevcuttur böylece polimerik partiküllerin suda iyi çözünen etken malzemelerin kapsüllenmesi yeteneğini geliştirmişlerdir [14] [128].

Farklı oranlarda lesitin ile çalışıldığı için farklı boyutlarda partiküller elde edilmiştir. DLS ve AFM görüntüleri aşağıdaki gibidir.

100 mg Lesitin içeren PCL partiküllerin AFM görüntüsünden (Şekil 4.7), PCL/Lesitin partiküllerin küresel bir şekle sahip olduğu görülmüştür. AFM ölçümünde (Şekil 4.7), partiküllerin boyutların yaklaşık 213 ± 40 nm'lik bir ortalama çapa sahip olduğu anlaşılmıştır. DLS ölçümünde (Şekil 4.8), partiküllerin bir polidispers boyut dağılımı (PDI: 0.295 ± 0.02) ile yaklaşık çaplarının 361 ± 36 nm olduğu belirtilmiştir.

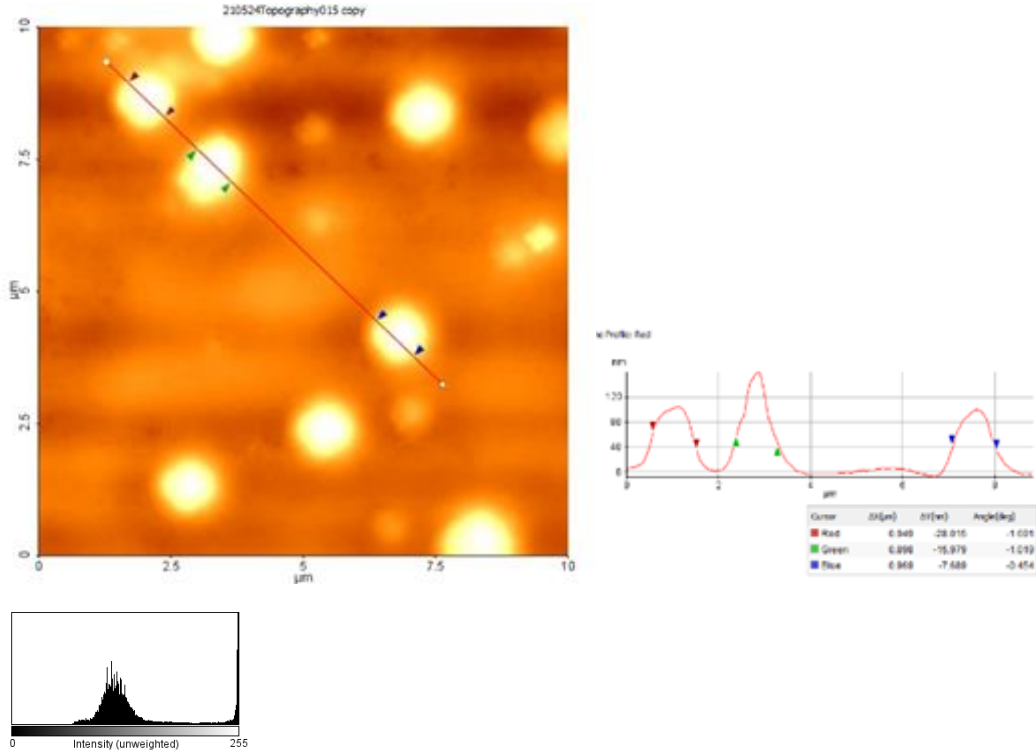


Şekil 4-7 100 mg Lesitin içeren PCL partiküllerin AFM görüntüsü

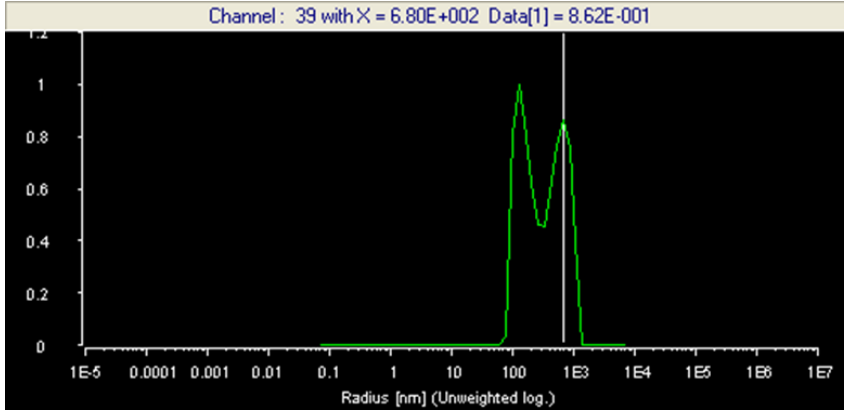


Şekil 4-8 100 mg Lesitin içeren PCL partiküllerin DLS ile elde edilen boyut dağılımları

200 mg Lesitin içeren PCL partiküllerin AFM görüntüsünden (Şekil 4.9), PCL/Lesitin partiküllerin küresel bir şekle sahip, boyutların ise partiküllerin boyutların yaklaşık 828 ± 29 nm'lik bir ortalama çapa sahip olduğu tespit edilmiştir. DLS ölçümünde (Şekil 4.10), partiküllerin bir polidispers boyut dağılımı (PDI: 0.384 ± 0.01) ile yaklaşık 889 ± 48 nm'lik bir ortalama çapa sahip olduğu görülmüştür.

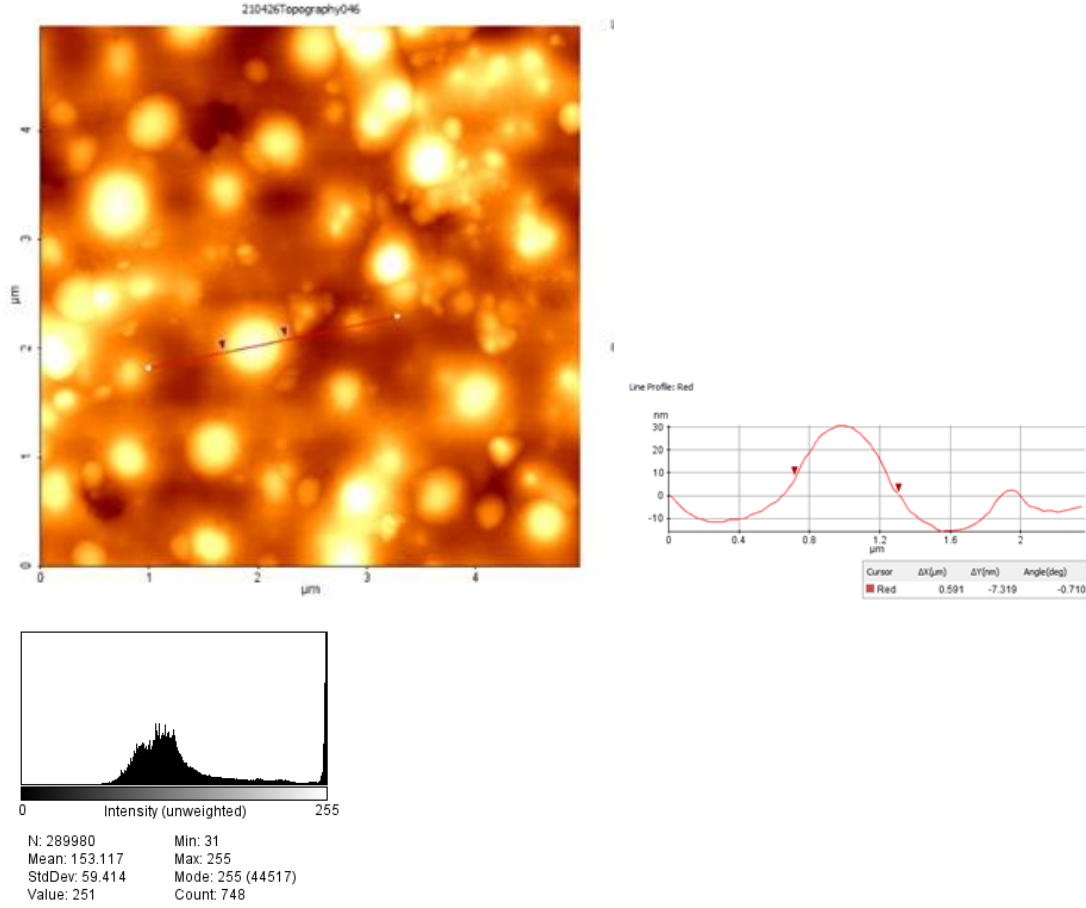


Şekil 4-9 200 mg Lesitin içeren PCL partiküllerin AFM görüntüsü

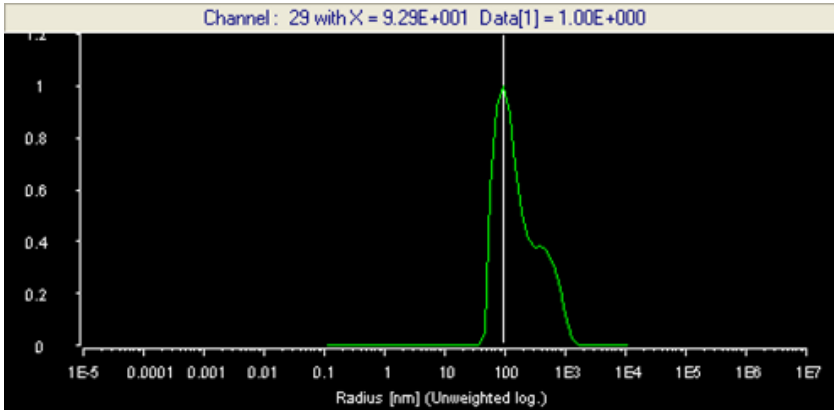


Şekil 4-10 200 mg Lesitin içeren PCL partiküllerin DLS ile elde edilen boyut dağılımları

500 mg Lesitin içeren PCL partiküllerin AFM görüntüsünden (Şekil 4.11), PCL/Lesitin partiküllerin küresel bir şekle sahip olduğu gösterilmiştir. AFM ölçümünde (Şekil 4.11), partiküllerin boyutların yaklaşık 307 ± 70 nm'lik bir ortalama çapa sahip olduğu görülmüştür. DLS ölçümünde (Şekil 4.12), ile yaklaşık 596 ± 26 nm'lik (PDI: 0.4447 ± 0.01) bir ortalama çapa sahip olduğu görülmüştür.



Şekil 4-11 500 mg Lesitin içeren PCL partiküllerin AFM görüntüsü



Şekil 4-12 500 mg Lesitin içeren PCL partiküllerin DLS ile elde edilen boyut dağılımları

BSA yüklü PCL/Lesitin partiküllerin boyutları incelendiğinde polimerik partiküllerin boyut dağılımının geniş olduğu anlaşılmıştır. En küçük partikülün 213 nm en büyük partikülün yaklaşık olarak 800 nm olduğu gösterilmiştir. Polidispers indeks sonuçlarına göre de bu kanıtlanmaktadır. Literatürde polimerik partiküllerin polidispers indeksinin 0.15'in altında olduğunda boyutlarının monodispers olduğu gösterilmiştir [209]. Tez çalışma kapsamında elde ettiğimiz PCL/Lesitin partiküllerin PDI değerleri hiç 0.15

altında olmamıştır. Her bir partikülün DLS görüntülerinden de farklı boyutları gösteren pikler elde edilmiştir. Partiküllerin boyutlarının farklı olmasının nedeninin sentez yönteminden ve BSA'yı farklı miktarlarda kapsüllenmesinden kaynaklandığı düşünülmektedir. Boyutlar literatür ile karşılaştırıldığında BSA yüklü taşıyıcı sistemler benzer sonuçlar elde edilmiştir [126].

4.2.3 PCL/Lesitin/Geleol Hibrit Partiküllerin Hazırlanması ve Karakterizasyonu

Sunulan tez çalışmanın bu kısmında PCL/Lesitin prosedürüne ek lipit olarak Glyceryl Monostearate kullanılmıştır. Glyceryl Monostearate (GMS) FDA onaylı bir mono ve digliserittir. Palmitik (C16) ve stearik (C18) asitlerin mono-di- ve triallerlerinden oluşmaktadır. 55-60 °C erime noktasına sahip lipidik araç ve modifiye edilmiş salım ajanı amacı ile kullanılan bir gliserittir. Kapsül için salım matris oluşturucu, emülsiyon ajanı ve gıdalarda tat maskeleyici için kaplama maddesi gibi başlıca görevleri vardır [210]. Literatürde emülsiyon stabilize etme potansiyelini gösteren çalışmaları mevcuttur. Örnek bir çalışmada emülsiyon stabilitesini birkaç dakikadan 12 saate kadar fazla bir sürede stabil tuttuğunu göstermişlerdir [211]. Glyceryl monostearate lipit taşıyıcılarda lipit matris olarak da kullanılmıştır [212] [213]. Polimer- lipit hibrit partiküllerde lipit ajanı olarak kullanılmıştır. Kullanıldığı çalışmada PLGA hibrit partiküllerde kullanılmış ve taşıyıcı sistemin proteinleri içine almadaki etkileri araştırılmıştır [213].

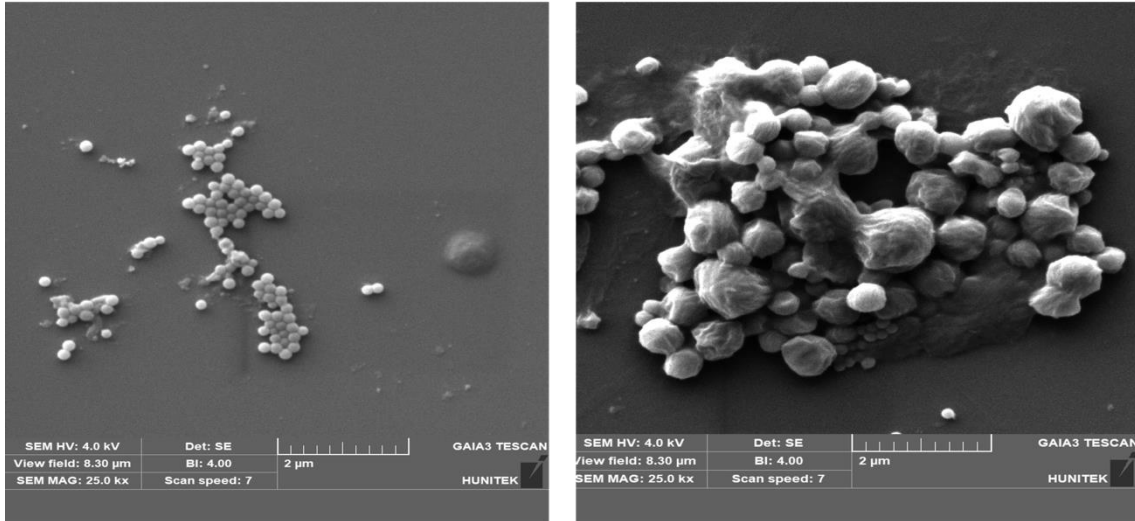
Bu bilgilerden yola çıkarak tez çalışmasının bu kısmında PCL/lesitin partiküllerin model proteinleri daha yüksek oranda içine alabilmesi için sentezin yağ fazına lesitin ile birlikte GMS eklenerek yeni bir sistem polimer-lipit hibrit partiküller elde edilmiştir. Taşıyıcı sistemin elde edilmesinde model protein olarak BSA, Lizozim ve polimerik çekirdek malzemesi olarak PCL kullanılmıştır. Lipit ve lipofilik yüzey aktif madde olarak sırasıyla GMS ve lesitin seçilmiştir. Lipit ve lesitin oranı 1:1 olarak seçilmiştir. Literatürde lesitin ve GMS bu şekilde birlikte kullanıldığı herhangi bir çalışmaya rastlanmamıştır.

Tez çalışmasının bu kısmında boyut ve morfoloji karakterizasyon sonuçları dört başlık altında incelenecektir. Başlıklar şu şekildedir: 1) PCL/Lesitin/Geleol Hibrit Partiküller, 2) BSA yüklü PCL/Lesitin/Geleol Hibrit Partiküller, 3) Lizozim yüklü PCL/Lesitin/Geleol Hibrit Partiküller, 4) BSA ve Lizozim yüklü PCL/Lesitin/Geleol Hibrit Partiküller

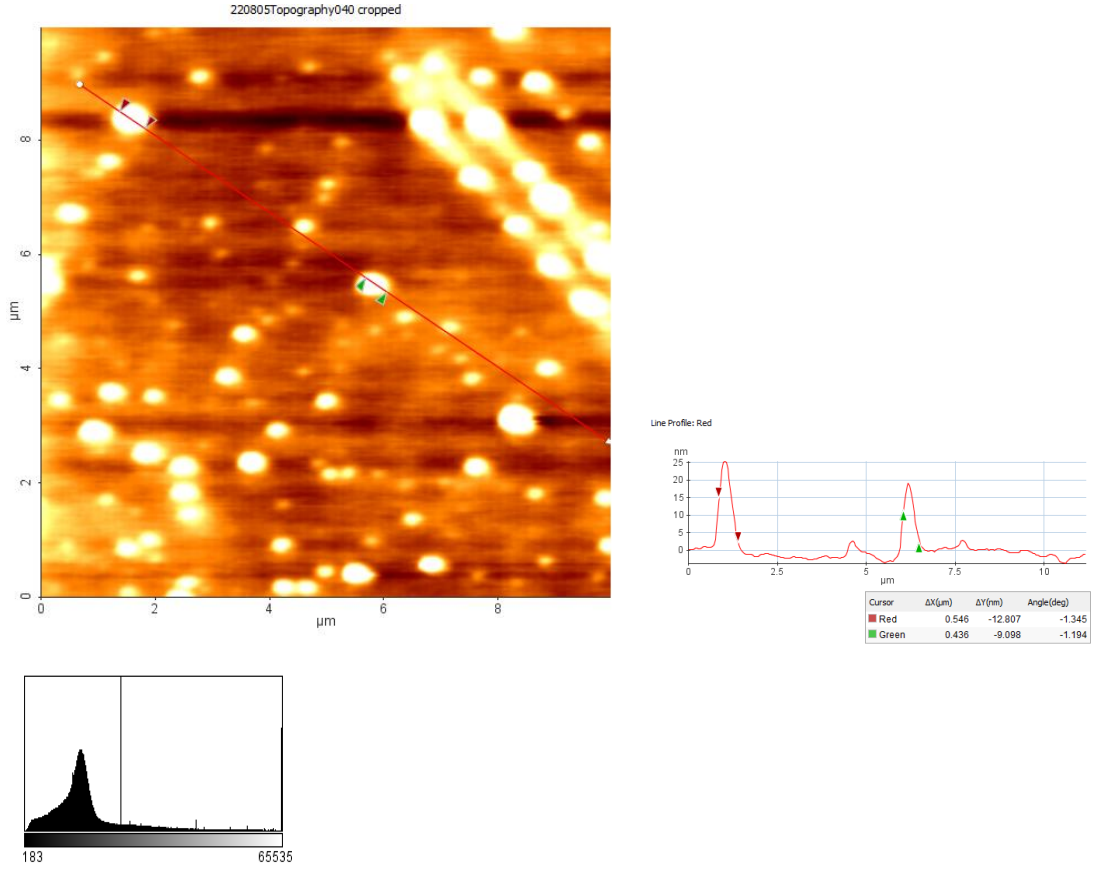
4.2.3.1 PCL/Lesitin/Geleol Hibrit Partiküller

Su/yağ/su çift emülsiyon çözücü buharlaştırma yöntemi ile hazırlanan partiküllerin AFM, DLS ve SEM görüntüleri aşağıdaki gibidir. DLS görüntülerinden boyutları incelenmiştir. AFM ve SEM görüntülerinden partiküllerin boyut ve morfolojileri incelenmiştir.

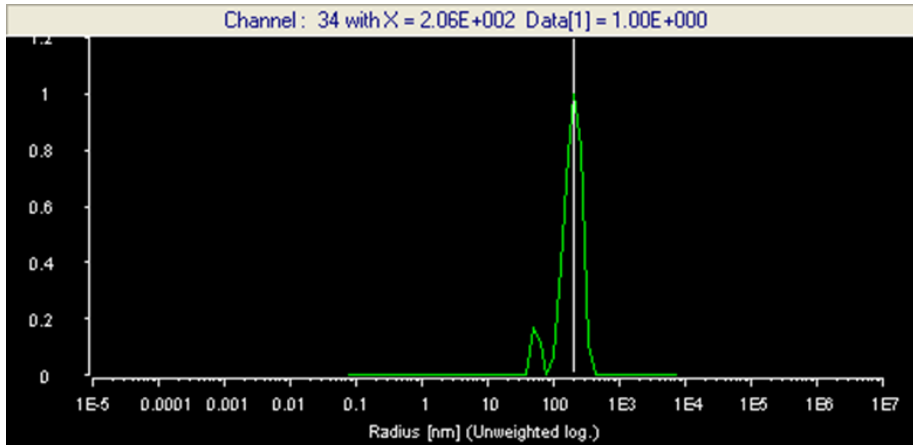
Şekil 4.13 de sunulan sem görüntülerinden, PCL/Lesitin/Geleol hibrit partiküllerin küresel bir şekle sahip olduğu görülmüştür. SEM ölçümünde (Şekil 4.13), partiküllerin boyutların yaklaşık 375 ± 40 nm'lik ortalama bir çapa sahip olduğu görülmüştür. AFM ölçümünde (Şekil 4.14), boyutların yaklaşık 368 ± 74 nm'lik ortalama boyuta sahip olduğu görülmüştür. DLS ölçümünde (Şekil 4.15), partiküllerin bir polidispers boyut dağılımı (PDI: 0.2233 ± 0.07) ile yaklaşık $385,08 \pm 62$ nm'lik bir ortalama çapa sahip olduğu anlaşılmıştır.



Şekil 4-13 PCL/Lesitin/Geleol Hibrit partiküllerin SEM görüntüsü



Şekil 4-14 PCL/Lesitin/ Geleol Hibrit partiküllerin AFM görüntüsü



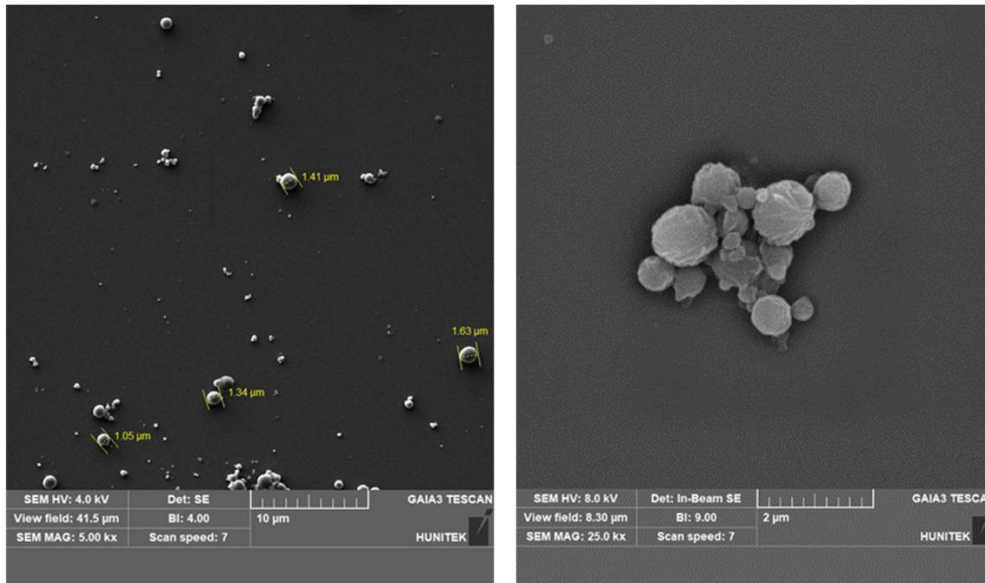
Şekil 4-15 PCL/Lesitin/Geleol Hibrit Partiküllerin DLS ile elde edilen boyut dağılımları

LPN'lerin yüzey yükü $-23,5 \pm 0,274$ Mv'dir. PCL tabanlı partiküllerde negatif yüzey yükü, PCL polimerlerinin kimyasal yapısında bulunan serbest karboksilik asit grubunun varlığından kaynaklanmaktadır [214].

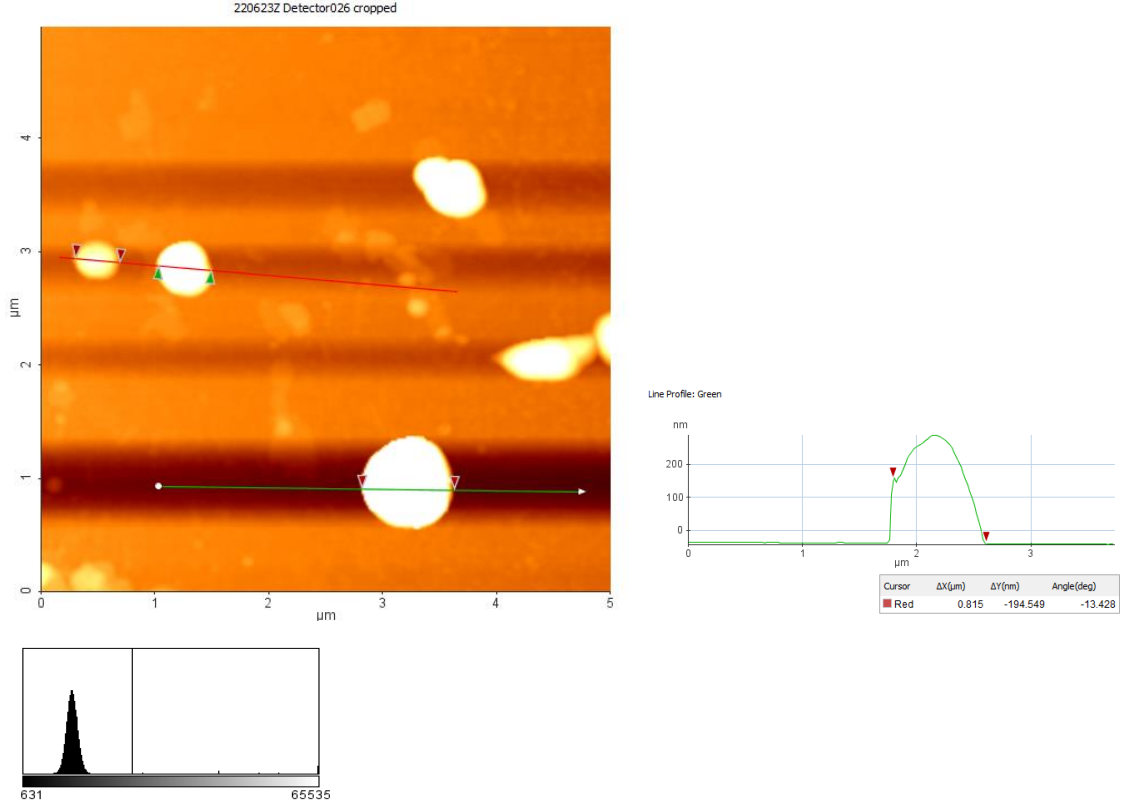
4.2.3.2 BSA yüklü PCL/Lesitin/Geleol Hibrit Partiküller

Su/yağ/su çift emülsiyon çözücü buharlaştırma yöntemi ile hazırlanan BSA yüklü PCL/Lesitin/Geleol hibrit partiküllerin AFM, DLS ve SEM görüntüleri aşağıdaki gibidir. DLS görüntülerinden boyutları elde edilmiştir. AFM ve SEM görüntülerinde boyutları ve morfolojileri incelenmiştir. Ek olarak BSA yüklü PCL/Lesitin/Geleol hibrit partiküllerin zeta potansiyel değerleri partiküllerin sahip olduğu yükler belirlenmiştir.

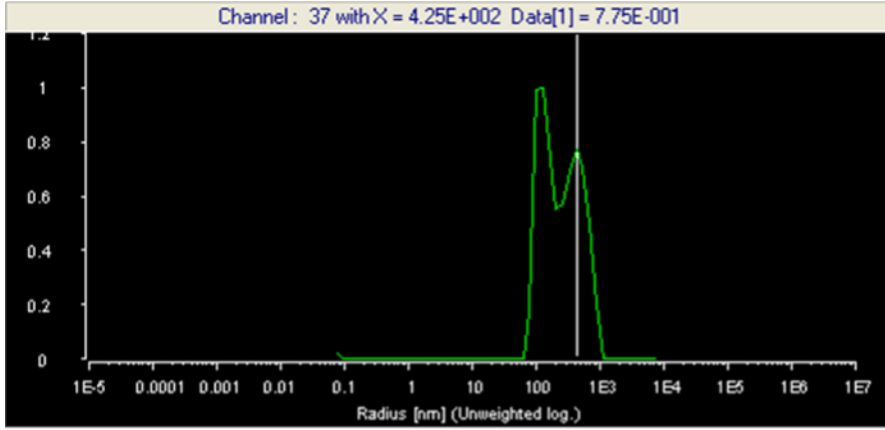
Sem görüntülerinden (Şekil 4.16), BSA yüklü PCL/Lesitin/Geleol hibrit partiküllerin küresel bir şekle sahip olduğu görülmüştür. Yüzeyleri polimerik partiküller gibi pürüzsüz değildir. Yapıdaki bileşenler nedeni ile çekirdek kabuk şeklinde bir yapı oluşturması beklenmektedir. SEM ölçümünde (Şekil 4.16), partiküllerin boyutların yaklaşık 870 ± 34 nm'lik bir ortalama çapa sahip olduğu görülmüştür. AFM ölçümünde (Şekil 4.17), boyutların yaklaşık 850 ± 27 nm'lik bir ortalama çapa sahip olduğu görülmüştür. DLS ölçümünde (Şekil 4.18), partiküllerin bir polidispers boyut dağılımı ($PDI: 0.3237 \pm 0.04$) ile yaklaşık 864 ± 194 nm'lik boyuta sahip olduğu hesaplanmıştır. Ayrıca LPNB'ler zeta potansiyel değeri $-22,5 \pm 0,3$ mV'dir.



Şekil 4-16 BSA yüklü PCL/Lesitin/ Geleol Hibrit partiküllerin SEM görüntüsü



Şekil 4-17 BSA yüklü PCL/Lesitin/ Geleol Hibrit partiküllerin AFM görüntüsü

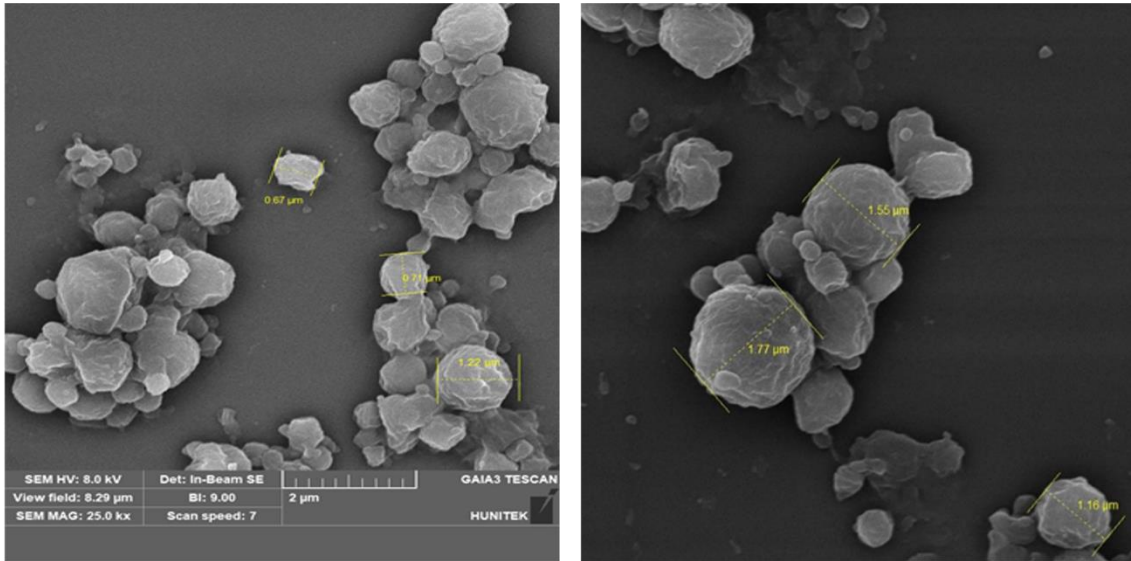


Şekil 4-18 BSA yüklü PCL/Lesitin/Geleol Hibrit Partiküllerin DLS ile elde edilen boyut dağılımları

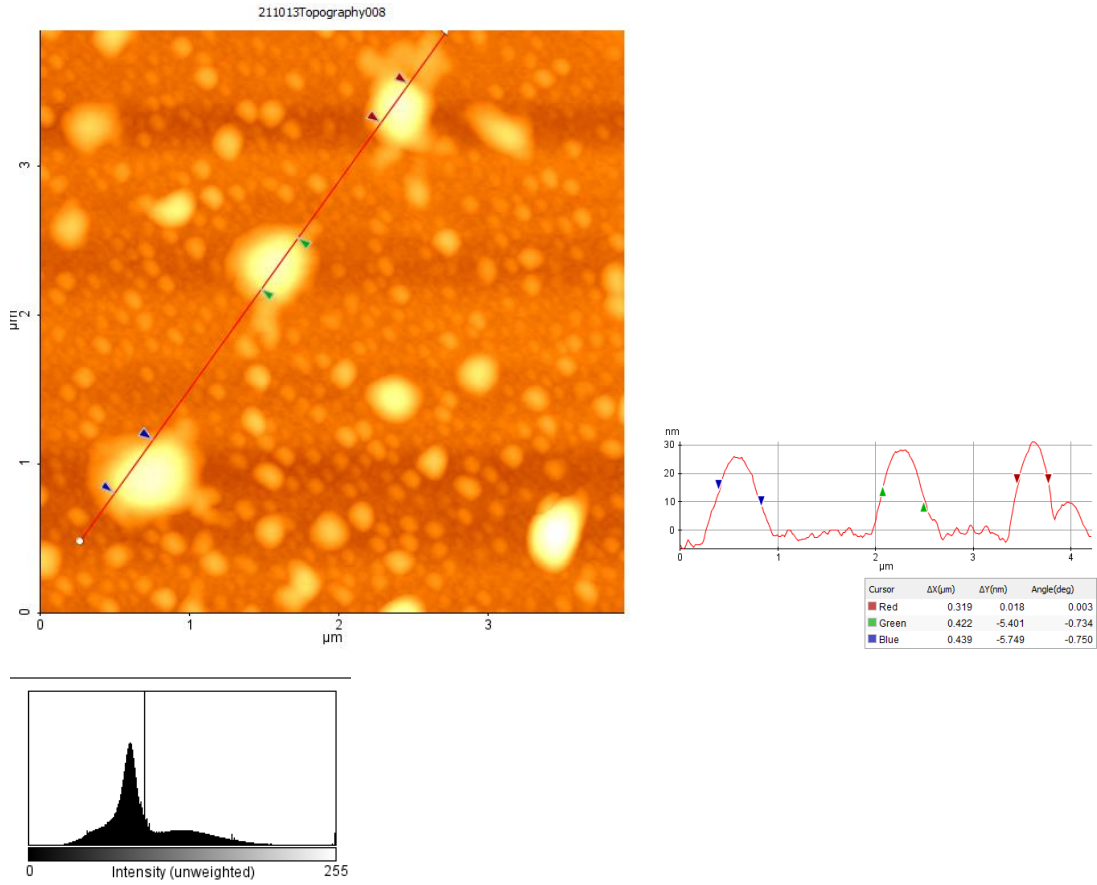
4.2.3.3 Lizozim yüklü PCL/Lesitin/Geleol Hibrit Partiküller

Su/yağ/su çift emülsiyon çözücü buharlaştırma yöntemi ile hazırlanan belirli bir miktar lizozim yüklü PCL/Lesitin/Geleol hibrit partiküllerin AFM, DLS ve SEM görüntüleri aşağıdaki gibidir. DLS görüntülerinden boyutları elde edilmiştir. AFM ve SEM görüntülerinde boyutları ve morfolojileri incelenmiştir.

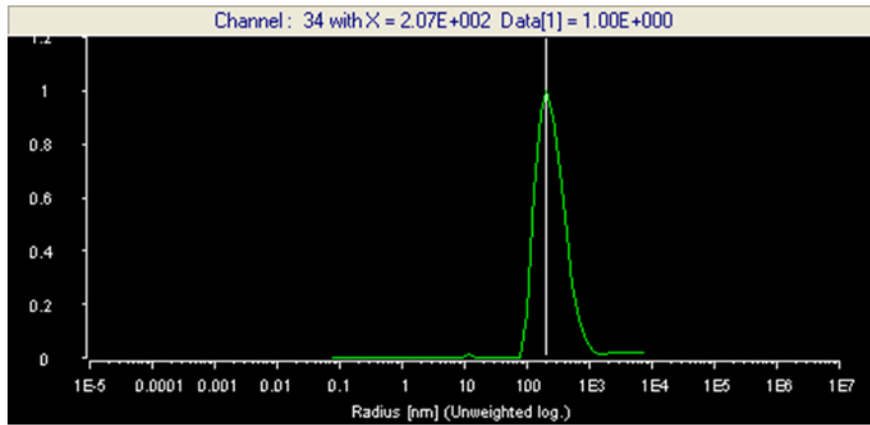
Sem görüntülerinden (Şekil 4.19), lizozim yüklü PCL/Lesitin/Geleol hibrit partiküllerin küresel bir şekle sahip olduğu görülmüştür. Yüzeyleri polimerik partiküller gibi pürüzsüz değildir. SEM ölçümünde (Şekil 4.19), partiküllerin boyutların yaklaşık 726 ± 23 nm'lik bir ortalama çapa sahip olduğu hesaplanmıştır. AFM ölçümünde (Şekil 4.20), boyutların yaklaşık 429 ± 35 nm'lik boyuta sahip olduğu görülmüştür. DLS ölçümünde (Şekil 4.21), partiküllerin bir polidispers boyut dağılımı (PDI: 0.2469 ± 0.028) ile yaklaşık $679,9 \pm 168$ nm'lik bir ortalama çapa sahip olduğu görülmüştür. LPNL'lerin yüzey yükü $+2,93 \pm 0,2$ olarak hesaplanmıştır.



Şekil 4-19 Lizozim yüklü PCL/Lesitin/ Geleol Hibrit partiküllerin SEM görüntüsü



Şekil 4-20 Lizozim yüklü PCL/Lesitin/ Geleol Hibrit partiküllerin AFM görüntüsü



Şekil 4-21 Lizozim yüklü PCL/Lesitin/ Geleol Hibrit partiküllerin DLS ile elde edilen boyut dağılımları

PCL/Lesitin/Geleol hibrit partiküllerin her birinin boyutları incelendiğinde hibrit partiküllerin boyut dağılımının geniş olduğu görülmektedir. Boyutlar 385 nm ve 850 nm arasında değişmektedir. Model protein bulunmayan PCL/Lesitin/Geleol hibrit partiküllerin boyutları yaklaşık olarak 385 nm'dir. Lizozim yüklü PCL/Lesitin/Geleol hibrit partiküllerin boyutları yaklaşık olarak 670 nm'dir. BSA yüklü PCL/Lesitin/Geleol

hibrit partiküllerin boyutları yaklaşık olarak 850 nm'dir. Model protein yüklenmeyen hibrit partiküllerin en küçük boyutta olması beklenen bir sonuçtur. Çünkü içerisinde protein bulunmamaktadır. Model protein yüklü partikül boyutlarının farklı olmasının nedeni ise farklı molekül ağırlıklarına model proteinlerden kaynaklandığı düşünülmektedir. Lizozimin molekül ağırlığı 14 kDa iken BSA'nın molekül ağırlığı 60 kDa'dır. Literatürde bu model proteinlerle ayrı ayrı gerçekleştirilen çalışmalar mevcuttur. Örnek verilen çalışmada lizozim yüklü polimer-lipit partiküllerin boyutları 90 nm ve 470 nm arasında değişmektedir. Farklı boyutlarda partiküller elde edilmesinin nedeni ise farklı oranlarda surfaktan/lipit çalışmış olmalarıdır [128]. Fakat tez çalışmamızda literatürdeki çalışmadan farklı surfaktan ve lipitlerle çalışılmıştır. Bu nedenle tez kapsamında çalışılan lizozim yüklü hibrit partiküllerin boyutları farklı olmaktadır. BSA yüklü partiküller ile ilgili örnek çalışmalarda polimer-lipit hibrit partiküllere rastlanılmamıştır. BSA yüklü PLGA partiküllerin boyutları araştırıldığında boyutların farklı oranlar farklı emülsiyeye edici ajanlar kullanılarak değiştiği gösterilmiştir. Boyutlar 331 nm ve 1307 nm arasında değişmektedir [126]. Literatürdeki boyutlar karşılaştırıldığında tasarladığımız nanometre boyutundaki polimer-lipit hibrit partiküllerin model proteinleri içine aldığı ve literatür ile uygun olduğu görülmüştür.

4.3 Partiküllerin Alım-Salım Çalışmaları

Tez çalışmasında farklı yapılarda PCL partiküllerde model protein olarak kullanılan BSA ve Lizozim'in kapsüllenme verimi ve salım davranışları incelenmiştir. Alım çalışmaları, partiküllerin elde edilmesi için santrifülden sonra gerçekleştirilmiştir. Partiküllerin elde edilmesi için çözücü buharlaştıktan sonra örnekler eppendorf tüplerine aktararak santrifüjlenmiştir. Santrifüj sonunda tüpün dibine malzeme çökerek partiküller, üst kısım süpernatanda ise partikül içinde tutunmayan proteinler elde edilmiştir. Belirli derişimlerde hazırlanan BSA ve Lizozim çözeltileri kullanılarak 280 nm dalga boyunda ölçülen absorbans değerleri ile elde edilen kalibrasyon doğrusundan elde edilen kalibrasyon doğruları kullanılarak kapsüllenme verimlilikleri hem de salım ortamından belirli zaman aralıklarda alınan örneklerin absorbans değerlerinden ortamda var olan BSA ve lizozim konsantrasyon değerleri hesaplanmıştır. 280 nm dalga boyunda BSA için kalibrasyon denkliği $y=1,019x$, lizozim için kalibrasyon denkliği $y=2,569x$ 'tır. Absorbans-konsantrasyon gösteren kalibrasyon doğruları EK-1'de gösterilmiştir.

Tez çalışma kapsamında sırasıyla polimerik partiküllerin, PCL/Lesitin partiküllerin ve PCL/Lesitin/Geleol hibrit partiküllerin model proteinlerini kapsülleme ve salım yetenekleri araştırılmıştır. Salım çalışmaları diyaliz bag içerisinde 37°C 'de pH 7.4 de gerçekleştirilmiştir. Salım ortamı olarak insan vücut sıvısını taklit etmek amacı ile fosfat tampon çözeltisi (pH 7.4) kullanılmıştır.

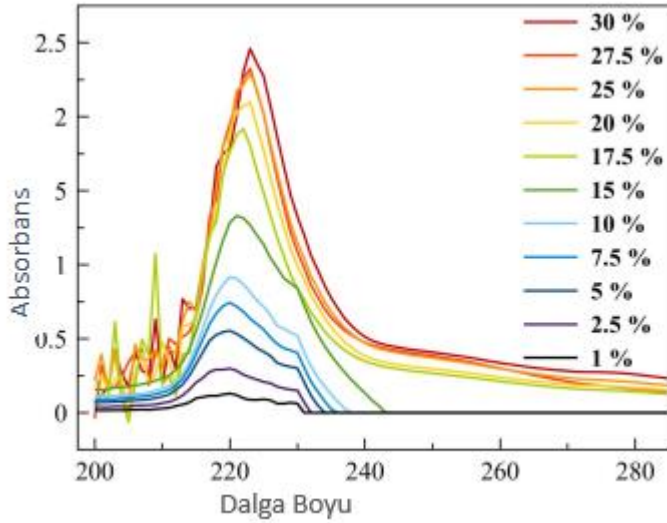
4.3.1 PCL partiküllerin Alım-Salım Çalışmaları

PCL partiküllerin alım salım çalışmaları model protein olan BSA ile çalışılmıştır. BSA molekül ağırlığı 60 kDa olan sudaki çözünürlüğü yüksek olan bir proteindir. Tez çalışması kapsamında çalışılan 44 kDa moleküler ağırlığına sahip ve sudaki çözünürlüğü yüksek olan VEGF 'e model olarak seçilmiştir. PCL partiküllerin büyük molekül ağırlıklı proteinin alım-salım çalışması BSA proteini ile karakterize edilmiştir. Çünkü çözeltideki protein özelliklerini analiz etmek ve protein saflığını ölçmek için en yaygın yöntem UV dalga boylarındaki ışığın absorpsiyonuna bakmaktır. Aminoasitlerden oluşan proteinler UV spektrumdaki ışığı 280 nanometre (nm) dalga boyunda ışığı absorbe etmektedir. En tepe absorbansı bu dalga boyunda vermektedir [215]. Böylelikle santrifüj sonunda elde edilen süpernatant belirli hacimde kuvars spektrofotometrik küvete eklenerek 280 nm 'de BSA absorbansı gözlemlenmiştir. Elde edilen absorbans daha önce hazırlanan kalibrasyon doğrusunda ($y= 1,019x$) yerine koyularak protein konsantrasyonu elde edilmiştir. (EK-1.c.) Elde edilen bu konsantrasyon partiküllerin içerisine girmeyen yani tutunmayan BSA konsantrasyonu olarak kaydedilmiştir. Tutunmayan protein konsantrasyonu kaydedildikten sonra eşitlik II ile % kapsüllenme verimi hesaplanılmıştır. Fakat doğru sonuçlar elde edilmemiştir. Süpernatanttan elde edilen BSA konsantrasyonu ile partiküllerin hazırlanması sırasında konulan BSA konsantrasyonu birbirine yakın değerler hesaplanmıştır. Böylelikle BSA'nın partiküller içerisine girmediği anlaşılmıştır BSA partikül içerisine girmediği için salım çalışmaları başlatılamamıştır. PCL'in hidrofobik doğasından dolayı BSA'nın PCL partiküllerin içerisine girmek girmeyeceği ya da düşük miktarda içerisine girebileceği literatürde görülmüştür [126]. İstenilmeyen sonuçlar elde edilince partiküllerin hazırlanma reçetesinde değişiklikler yapılarak çalışmalara devam edilmiştir

4.3.2 PCL/Lesitin Partiküllerin Alım-Salım Çalışmaları

PCL/lesitin partiküllerde BSA'yı kapsülleme ve salım yeteneği araştırılmıştır. İlk önce 100 mg lesitin içeren PCL/lesitin partikülleri hazırlanmıştır. Partiküllerin boyut ve

morfolojileri analiz edildikten sonra alım-salım çalışmaları gerçekleştirilmiştir. İlk önce kapsülleme verimini hesaplamak için partiküllerin hazırlanmasından elde edilen süpernatantta yapının içerisine girmeyen protein konsantrasyonu elde edilmiştir. Bunun için UV-spektrometre de proteinler için spesifik olan dalga boyunda (280 nm) analizler gerçekleştirilmiştir. 280 nm de BSA konsantrasyonu öğrenbilmek için daha önceden hazırlanan kalibrasyon doğrusundan yardım alınmıştır. ($y=1,019x$) EK-1. Fakat 100 mg içeren PCL partiküllerin süpernatantında yapının içerisine girmeyen sadece BSA konsantrasyonu elde edilememiştir. Süpernantta 280 nm da kalibrasyon doğrusuna ($y=1,019x$) göre elde edilen konsantrasyon partiküllerin içerisine konulan BSA konsantrasyonun yüksek hesaplanmıştır. O yüzden 280 nm dalga boyunda bakılan bölgede yapıya dahil olmayan lipidlerin veya surfaktanın etkisi olabileceği düşünülmüştür. Çünkü dış su fazında emülgatör olarak kullanılan F127 o bölgelerden absorbands tepe noktası vermektedir [216]. F127 çözeltisinin 280 nm yakın bölgelerde elde edilen dalga boyu -absorbans spektrumu şekil 4.22 'de gösterilmiştir.



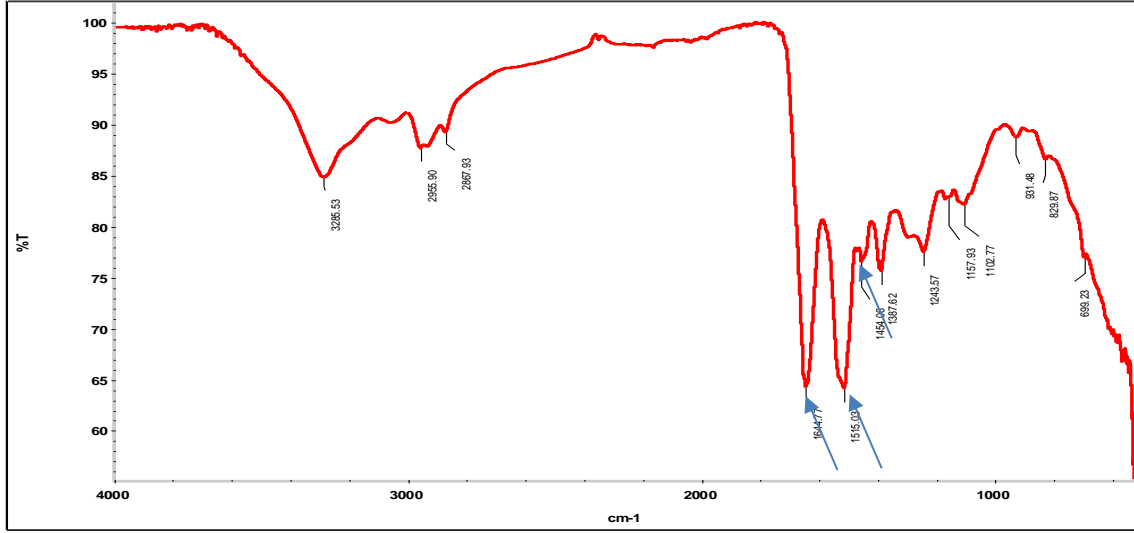
Şekil 4-22 Pluronik F127 280 nm dalga boyundaki absorbands piki

F127'nin 280 nm yakın bölgelerde absorbands tepe noktasını gördükten sonra tutunmayan BSA konsantrasyonunu etkilediği kanıtlanmıştır. Proteinler için özel analiz yöntemleri araştırılmıştır. Toplam protein tayinini için birçok yöntem mevcuttur. Bu yöntemler, biüret yöntemi, lowry yöntemi, BCA yöntemi, bradford yöntemidir. Bu yöntemi optimize etmek için sığır veya insan serum albumini kullanımının iyi olduğu bilinmektedir [217]. Biüret yöntemi proteinler ve peptitlere özel kolorimetrik bir tekniktir. Yöntemin temeli alkali çözeltideki bakır tuzları, iki veya daha fazla peptit bağı içeren maddelerle mor-

menekşe rengi oluşturmaktadır. Elde edilen absorbands reaksiyona giren peptit bağlarının sayısı ve dolayısıyla reaksiyonda bulunana protein moleküllerinin sayısı ile orantılıdır. Bu yöntemle toplam protein miktarının spektrofotometre ile belirlenmesinde 540-560 nm dalga boyunda elde edilen absorbands kaydedilmektedir [218]. Fakat bu yöntem çok duyarlı değildir. 0,1-0,15 g/L-1 protein konsantrasyonlarında çalışılmalıdır.

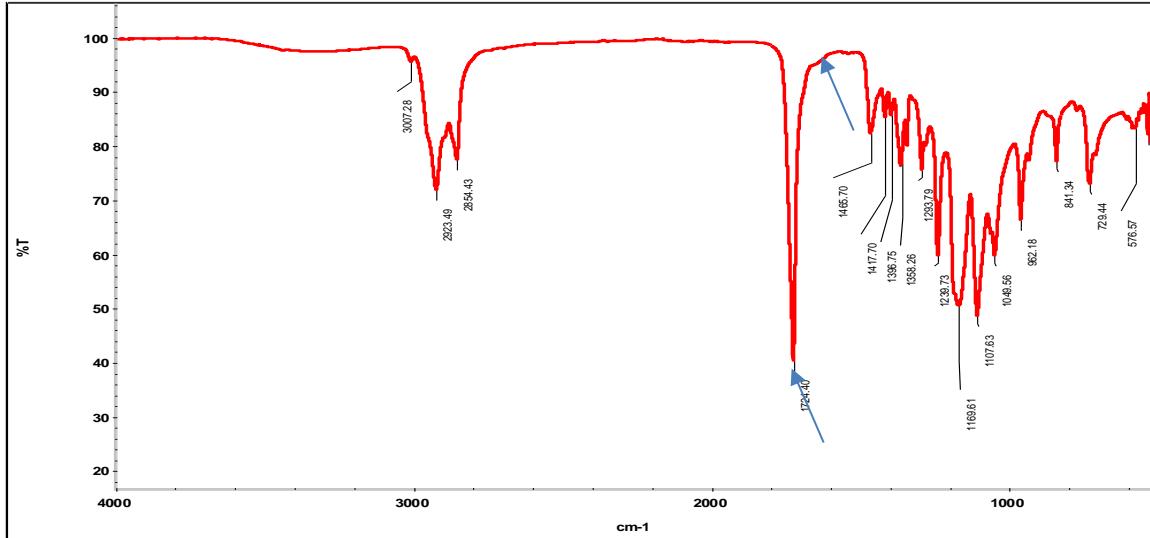
100 mg lesitin içeren PCL partiküllerin BSA tutma kapasitesini ve salım yeteneği araştırmak için ilk biüret yöntemi denenmiştir. Farklı konsantrasyonlarda hazırlanan BSA çözeltilerine Biüret çözeltisi, belirli eşit hacimde eklenerek bilinen konsantrasyonlardaki BSA miktarını belirlemek için kalibrasyonu doğrusu elde edilmiştir. Uv-vis spektrofotometrede analizi yapmak için BSA içeren örnekler Biüret çözeltisiyle 30-40 dk etkileştirildikten sonra ölçümler gerçekleştirilmiştir. Farklı yoğunlukta mor-menekşe renkli çözeltiler elde edilmiştir. 540 nm dalga boyunda elde edilen absorbands değerleri kaydedilmiştir. Hazırlanan kalibrasyon doğrusu EK-1.a. 'da gösterilmiştir. Kalibrasyon doğrusu hazırlandıktan sonra polimer/lesitin partiküllerin BSA'yı kapsülleme yeteneği araştırılmıştır. Bunun için sentez sonunda partiküller 14000 rpm de 15 dk santrifüjle çöktürüldükten sonra elde edilen süpernatant biüret çözeltisi ile etkileştirerek 540 nm dalga boyundaki absorbands değeri kaydedilmiştir. Kaydedilen absorbands değeri kalibrasyon doğrusunda ($y=0.0127x$) yerine yazılarak partikül içerisine girmeyen BSA miktarı belirlenmeye çalışılmıştır. Fakat elde edilen sonuçlarla partikülde tutulamayan BSA miktarı belirlenememiştir. Çünkü elde edilen süpernatantta berrak bir çözelti elde edilememiştir.

100 mg lesitin içeren PCL partiküllerin kapsüllenen BSA'nın varlığını ispatlamak ve miktarını öğrenmek amacıyla partiküllerin Çalışmada sığır serum albumin'in, protein bulunmayan 100 mg lesitin içeren PCL partiküllerin ve BSA yüklü PCL/lesitin partiküllerin FTIR analizleri gerçekleştirilmiştir. Elde edilen FTIR spektrumlar aşağıda gösterilmiştir. Literatüre göre C=O gerilmesine bağlı olarak BSA amid I bandı 1600-1700 cm^{-1} , C=N gerilmesine bağlı amid II bandı ise 1540 cm^{-1} civarındadır. Saf BSA'nın Amid I ve II bantları sırasıyla 1643 cm^{-1} ve 1532 cm^{-1} 'de spektrumlarında belirtilmektedir [219].



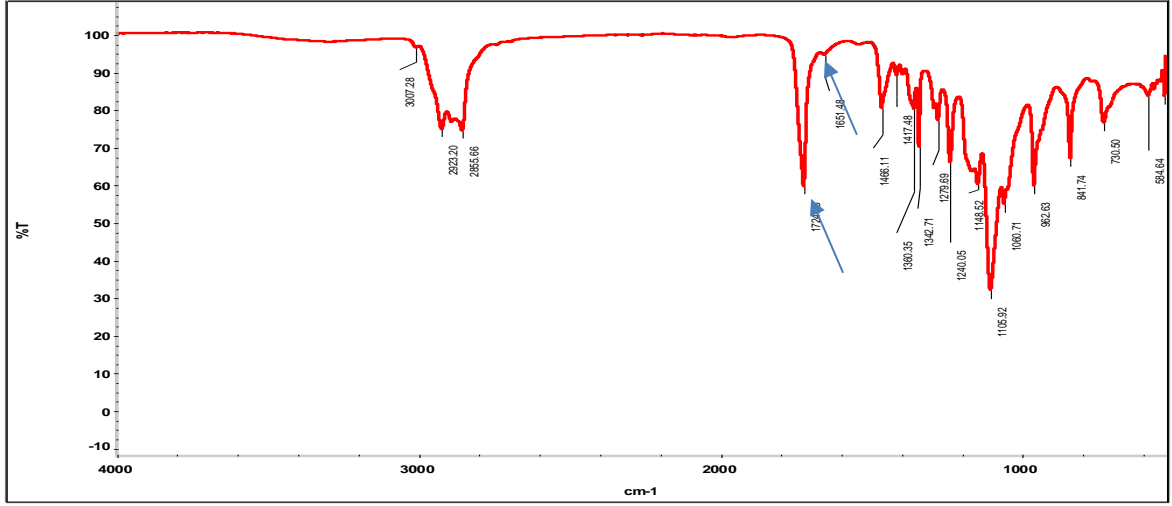
Şekil 4-23 Saf BSA FTIR spektrumu

Şekil 4.23'de görüldüğü gibi BSA ait olan 1500 ve 1700 cm^{-1} civarında amid I -amid II bantları görülmektedir. Aşağıdaki spektrumda ise BSA ve lesitin içermeyen PCL partiküllerin FTIR spektrumu yer almaktadır.



Şekil 4-24 BSA ve Lesitin içermeyen PCL partiküllerin FTIR spektrumu

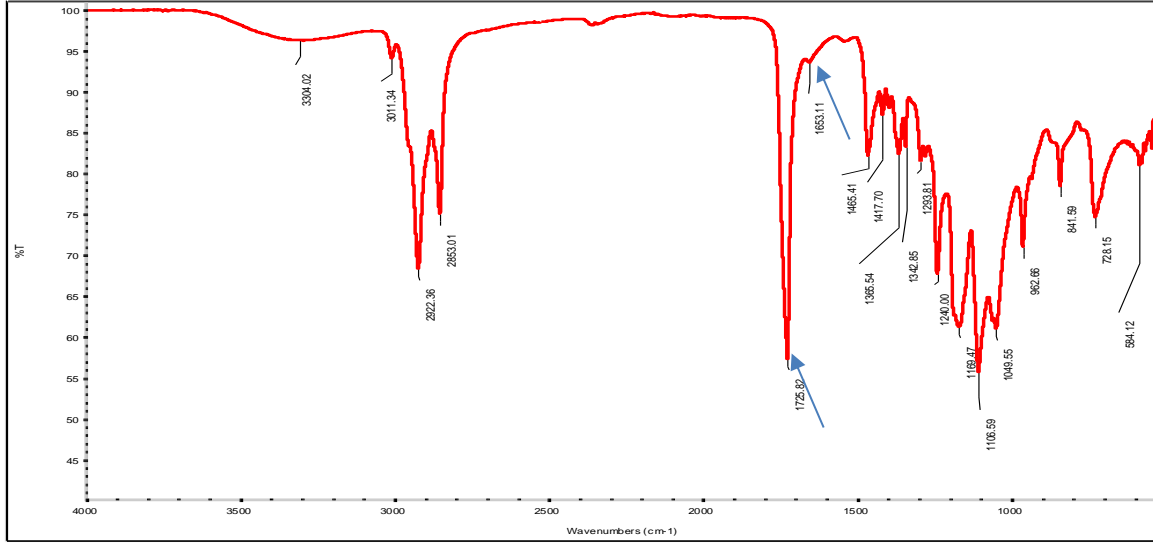
Şekil 4.24'de görüldüğü üzere BSA amid II bandında herhangi bir sinyal görülmemiştir. Saf BSA ve PCL partiküllerin FTIR sonuçları incelendikten sonra BSA yüklü 100 mg lesitin içeren PCL partiküllerin FTIR analizleri yapılmıştır. Şekil 4.25 'de gösterilmiştir. Spektrum incelendiğinde BSA spektrumları amid I için 1724 cm^{-1} ve amid II için 1651 cm^{-1} 'de partiküllerde BSA'nın varlığını gösteren bir sinyal tepe noktası göstermiştir.



Şekil 4-25 BSA yüklü 100 mg lesitin içeren PCL partiküllerin FTIR spektrumu

Lesitin varlığında partiküllerin BSA'yı içine aldıkları görülmüştür. Görülen sinyal çok küçük olduğu için partiküllerin hazırlanması sırasında kullanılan belirli miktar BSA'nın çok az bir kısmını içlerine aldığını düşünülmüştür.

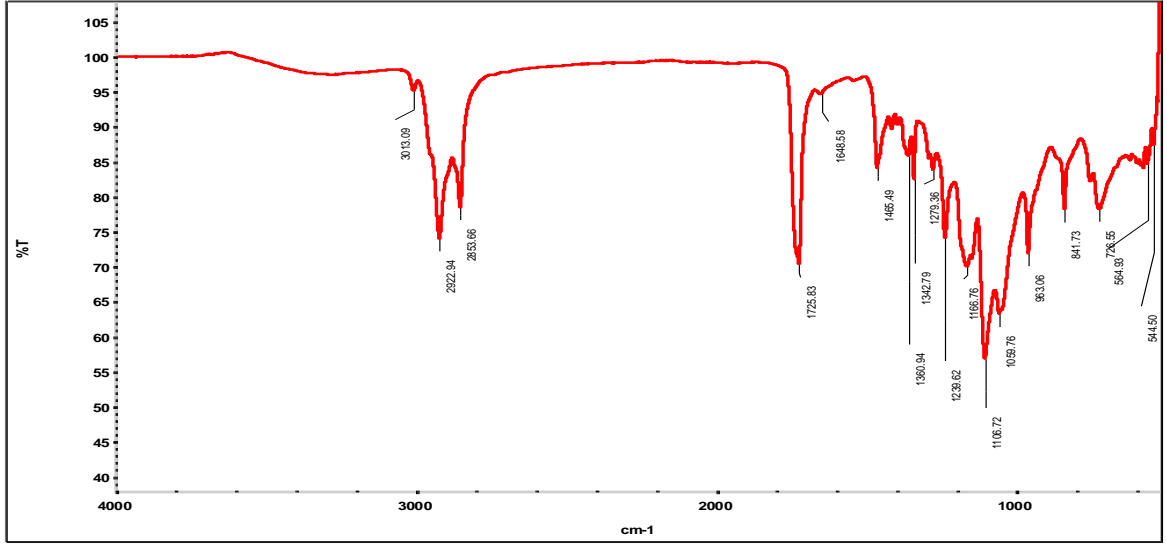
Sonuçlar böyle olunca ortamdaki lesitin miktarı arttırıldığında daha yüksek oranda hidrofilik bir çevre oluşturulduğu için BSA'yı daha fazla içine alabileceği düşünüldüğünden lesitin miktarı arttırılarak yeni partiküller hazırlanmış ve BSA'yı alım yetenekleri aynı yöntemler ile incelenmiştir. Bu amaçla 200 mg lesitin yüklü PCL partiküller hazırlanmıştır. İlk yöntem olarak partiküllerin süpernatantından tutunmayan BSA miktarı elde edilmeye çalışılmıştır. Süpernatant'ın UV-vis spektrofotometre cihazında 280 nm dalga boyunda absorbansına bakılmıştır. Kalibrasyon doğrusu ($y=1,019x$) EK-1 ile tutunmayan BSA konsantrasyonu hesaplanmıştır. Fakat yüksek absorbans elde edildiğinden tutunmayan BSA konsantrasyonu doğru hesaplanamamıştır. 200 mg lesitin içeren PCL partiküllerde BSA sinyalini görebilmek amacıyla partiküllerin FTIR analizleri yapılmıştır. FTIR spektrumu aşağıda şekil 4.26'da gösterilmiştir.



Şekil 4-26 BSA yüklü 200 mg lesitin içeren PCL partiküllerin FTIR spektrumu

FTIR spektrumu incelendiğinde ve şekil 24 ile BSA ve lesitin içermeyen PCL partiküllerin FTIR spektrumu ile karşılaştırıldığında BSA amid II bölgesinde sinyal görülmüştür. Sinyal görüldüğü için partikül içerisinde BSA varlığı ispat edilmiştir. Fakat sinyal çok düşük olduğu için kapsülleme yüzdesinin düşük olduğu düşünülmüştür. FTIR spektrumu üzerinden kapsülleme verimliliği hesaplanamamıştır.

BSA'nın PCL partiküllerde kapsülleme miktarının artırılması için lesitin miktarı 500 mg'a çıkarılmıştır. 500 mg lesitin kullanılarak partiküller yeniden hazırlanmıştır. BSA'yı içine alma yeteneği aynı yöntemler ile araştırılmıştır. İlk önce partiküller hazırlandıktan sonra elde edilen süpernatantta tutunmayan BSA miktarı belirlenmeye çalışılmıştır. Partiküller 14000 rpm'de 20 dk santrifüjlendikten sonra elde edilen süpernatant çok yoğun sarı renkli bir çözelti haline gelmiştir. O yüzden süpernatant tekrardan 18000 rpm'de 30 dk santrifüjlenmiştir. Fakat santrifüj sonunda UV spektrofotometre de 280 nm dalga boyunda analiz edilebilecek berrak bir çözelti elde edilememiştir. Uv'de analiz edilince de çok yüksek absorbans elde edilmekteydi. Elde edilen absorbans değeri, kalibrasyon doğrusu ($y=1,019x$) denkleminde yerine konulduğunda tutunmayan BSA konsantrasyonu çok yüksek çıkmaktaydı. Partiküllerin BSA içine almadığı düşünülmüştür. Fakat bu sonuç beklenilmeyen bir sonucu o yüzden 500 mg lesitin içeren PCL partiküllerin içerisinde BSA varlığının ispatı için bu partiküllerinde FTIR analizleri yapıldı. Şekil 4.27'de BSA yüklü 500 mg lesitin içeren PCL partiküllerin FTIR spektrumu gösterilmiştir.



Şekil 4-27 BSA yüklü 500 mg lesitin içeren PCL partiküllerin FTIR spektrumu

500 mg lesitin içeren PCL partiküllerde BSA varlığının ispatı için FTIR spektrumu incelendiğinde BSA amid I ve amid II bandında sinyaller görülmüştür. Fakat elde edilen sinyal çok düşüktür. Partiküllerin BSA'nın çok az bir miktarını içine aldığı düşünülmüştür. Kesin bir sonuç elde edilememiştir.

100-200 ve 500 mg lesitin içeren partiküllerin FTIR analizlerinde partiküllerin içerisinde BSA varlığı ispat edilmiştir. Fakat partiküller içerisinde eklenen BSA'nın ne kadarını kapsülediği hesaplanamamıştır.

Polimer/Lesitin partiküllerde model protein olarak sadece sığır serum albümin ile çalışılmıştır. Çalışmalar sonunda tutunmayan BSA konsantrasyonun belirlenmesinden yaşanan problemler nedeni ile kullanılacak makromoleküllerin terapötik dozlarında düşünülerek çalışmanın diğer bir aşaması olan hibrit partiküller ile çalışmaya devam edilmiştir.

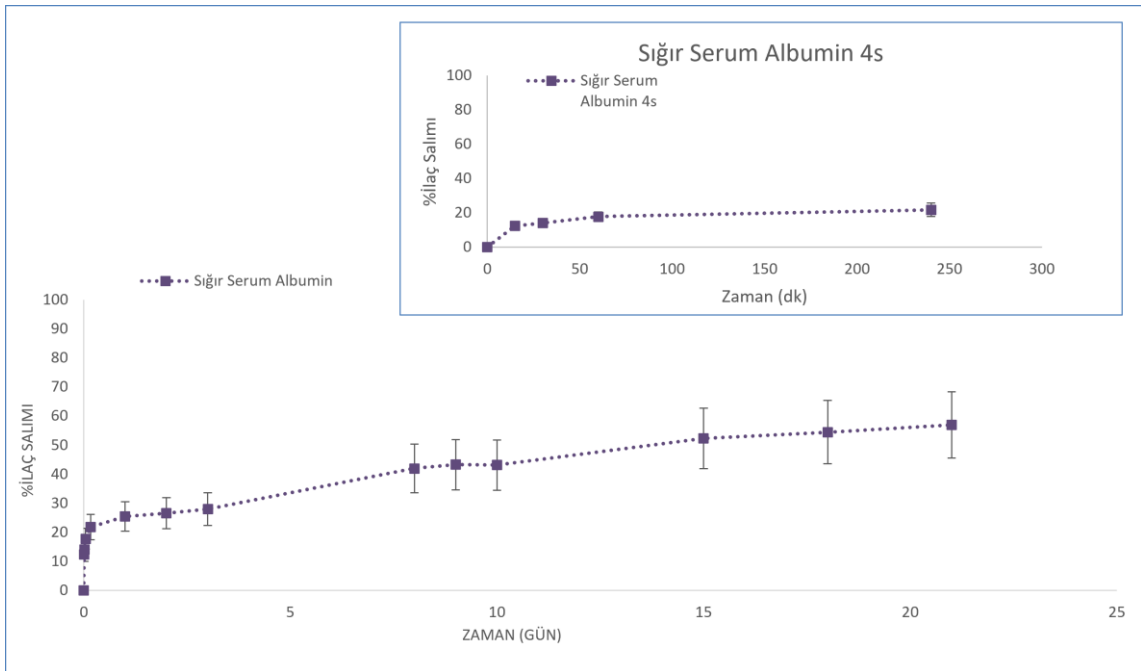
4.3.3 PCL/Lesitin/Geleol Hibrit Partiküllerin Alım-Salım Çalışmaları

Tez çalışmasının ilk kısmı olan PCL partiküller ve PCL/Lesitin içeren partiküllerde istenilen kapsüllenme verimi edilememiştir. PCL ve PLGA partiküllerin hidrofobik doğası gereği suda çözünürlüğü yüksek olan sığır serum albumin ve lizozim partiküllerin içerisinde kalmak istememiş ve partikül içine yüksek oranda kapsüllenmemişlerdir. O yüzden kapsüllenme veriminin artırılması ve protein salımlarının kontrollü olabilmesi için partiküllerin hazırlanması aşamasında polimer-lipit hibrit partiküller hazırlanmıştır. PCL/Lesitin/Geleol polimer- lipit hibrit partiküllerin boyut ve morfolojileri karakterize edildikten sonra bu hibrit partiküllerin VEGF'e model protein olan 66 kDa molekül

ağırlığına sahip BSA'yı kapsülleme ve salım yeteneği araştırılmıştır. Kapsülleme verimliliği bir diğer anlamıyla toplam BSA'yı içine alma yüzdesi yaklaşık olarak 65 ± 5 ' idi. Böylelikle elde edilen polimer-lipit hibrit partiküllerin BSA'yı ve Lizozim'i içine daha fazla alınması sağlanmıştır. Bu hibrit partiküllerde BSA, polimer-lipit hibrit partiküllerin hazırlanması sırasında kullanılan surfaktanın ve lipitin karbonil kuyrukları arasında hidrofobik etkileşim oluşturarak sulu faz ile yağ fazı arasındaki ara yüzeye yerleştiği ve içerisinde kalmak istediğini literatürde gösterilmektedir [126]. Partiküllerin hazırlanması sırasında gerçekleştirilen bir başka değişken ise dış su fazı olarak PVA yerine bir poloxamer çeşidi olan F127 kullanmaktır. Çünkü poloxamerler PVA'nın oluşturduğu hidrofobik ortamı daha hidrofilik hale getirmektedir. Bu sayede BSA'nın partikül içinde daha çok tutulması sağlanarak yüksek bir kapsülleme yüzdesi elde edilmektedir. Literatürdeki çalışmalarda bu sonuçları destekleyici niteliktedir. Martinez ve arkadaşlarının yaptığı çalışmada ikinci emülsiyonda PVA kullanılmasıyla BSA kapsülleme veriminin yaklaşık olarak $49,1 \pm 7,6$ olduğunu, PVA yerine pluronic F68 kullanarak kapsülleme verimini $76,0 \pm 1,7$ 'a kadar çıkardığını göstermişlerdir. Nedenini Pluronic F68'nin amfifilik nedeniyle, hidrofobik PPO (polipropilenoksit) zincirleri hidrofobik çevre ile etkileşime girerken hidrofilik PEO (polietilen oksit) zincirleri sulu dış faz ile etkileşime girmektedir. Dış su fazda su ile etkileşime girdiği için ikinci emülsiyon daha kararlı olmaktadır ve BSA'nın kapsüllemesi artmaktadır.

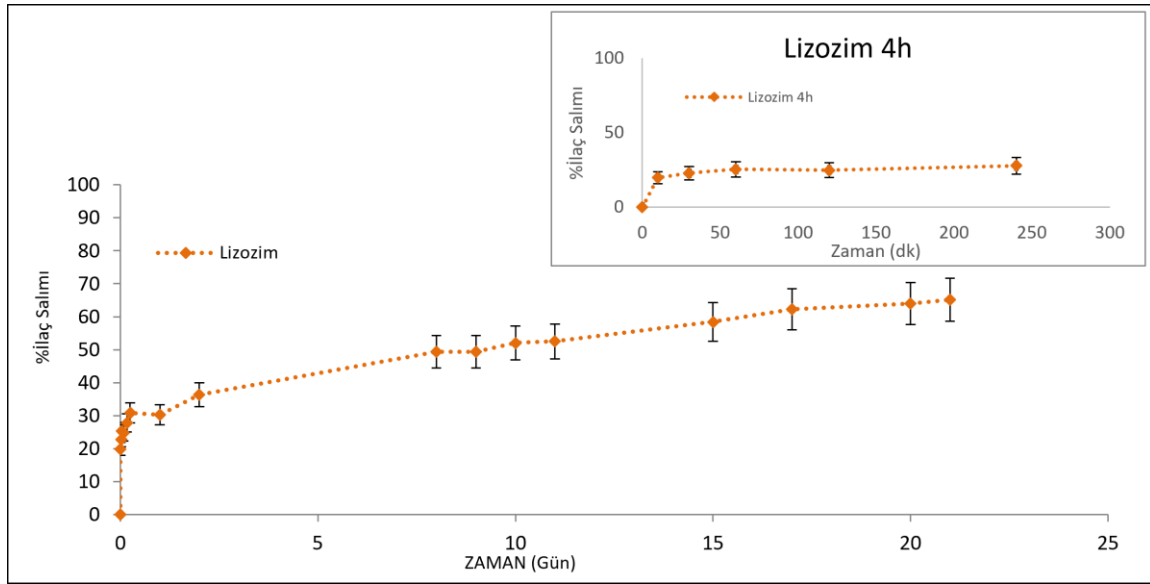
Tez çalışma kapsamında BSA'nın PCL/Lesitin/Geleol hibrit partiküllerde kapsülleme verimi arttırıldığı için aynı formülasyon ile elde edilen hibrit partiküllere lizozim yüklenerek kapsülleme verimi araştırılmıştır. 14 kDa olan lizozim aynı molekül ağırlığına sahip GM-CSF'ye model olarak seçilen proteindir. Çalışma sırasında belirli bir lizozim, PCL/Lesitin/Geleol polimer-lipit hibrit partiküllerin hazırlanması sırasında aynı şekilde sulu çözelti halinde ilk emülsiyon sırasında eklenmiştir. Ve kapsülleme verimliliği yaklaşık olarak 77 ± 10 ' idi. Literatür ile karşılaştırıldığında PCL mikropartiküllerin lizozimin yaklaşık olarak 65 'ini kapsüllediği bulunmuştur [220]. Literatürde kapsamlı araştırma yapıldığında lizozimin çalışıldığı polimer-lipit hibrit partiküller ile ilgili çalışmaların mevcut olduğu bulunmuştur.. Söz konusu çalışmada PCL ve PC:gliseril tripalmitat ile hazırlanan lipit-polimer hibrit partiküllerde lizozimi kapsülleme verimliliği $11,69 \pm 0,05$ ' dir. Sodyum dodesil sülfat ile iyon çifti kompleksleşmesini sağlayarak lizozimin daha fazla kapsüllemesini sağlamışlardır. Sonuçlara göre en son formülasyondaki hibrit partiküller lizozimi $42,85 \pm 0,08$ kapsüllemişlerdir. Aynı grubun bir başka çalışmasında lipit-polimer hibrit partiküllerin hazırlanması sırasında

lipidi değiştirerek lizozim kapsllenmesi araştırılmıştır. Çalışmada en yksek %kapsllleme verimi yaklaşık olarak %60 olduğunu gstermişlerdir[14]. Literatrdaki benzer çalışmalar ile tez çalışmamızdaki sonuçlar karşılaştırıldığında lizozimin kapsllenmesini arttırdığımız grrlmektedir. Bylece partikllerde BSA ve Lizozim'in kapsllenme verimliliği arttırıldıktan sonra salım çalışmalarına başlanmıştır. Normal bir yara iyileşme sreci 21 gnde tamamlandığı için partikllerin 21.gn boyunca salım yeteneği araştırılmıştır. PCL/Lesitin/Geleol lipit-polimer hibrit partikllerin PBS (pH 7.4) içinde 37°C de sırasıyla 21 gn boyunca BSA ve Lizozim salımının in vitro davranışı Şekil 4.28 ve Şekil 4.29'de gsterilmiştir.



Şekil 4-28 PCL/Lesitin/Geleol lipit-polimer hibrit partiklnden Siğir Serum Albumin salımının zamana bağlı değişimi

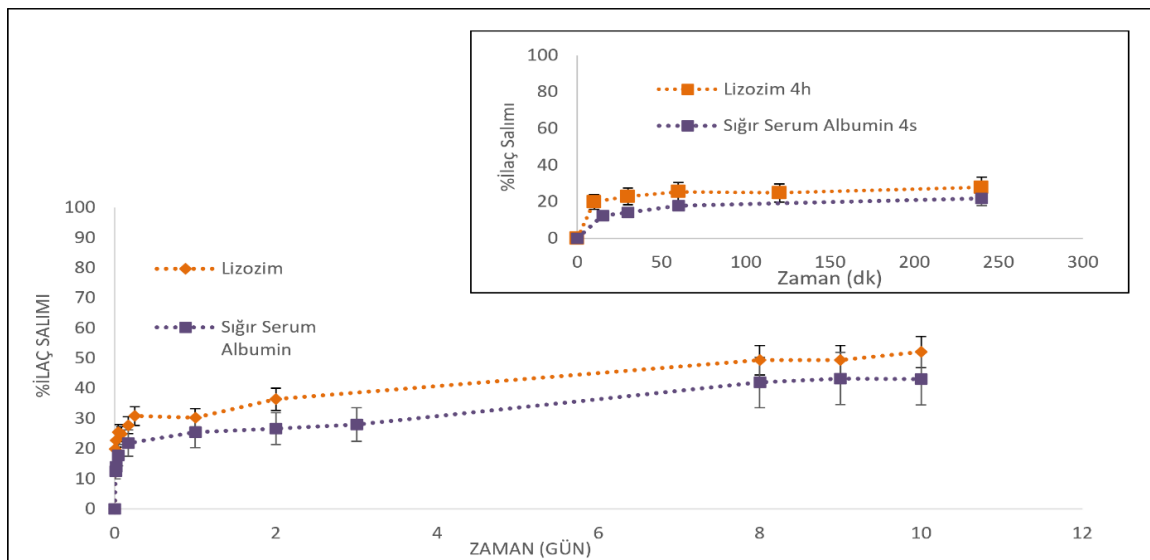
Elde edilen zamana karşı %ila salımlarına bakıldığında lipit-polimer hibrit partikllerinden BSA miktarının neredeyse %21'lik kısmını ilk 4 saatte saldığı ve 21.gn n sonunda yaklaşık olarak %59'u ile eksik bir salım grrlmüştür.



Şekil 4-29 PCL/Lesitin/Geleol lipit-polimer hibrit partikülden Lizozim salımının zamana bağlı değişimi

Elde edilen zamana karşı %ilaç salımlarına bakıldığında lipit-polimer hibrit partiküllerinden lizozim miktarının neredeyse %30'lik kısmını ilk 4 saatte saldı ve 21.günün sonunda yaklaşık olarak %65'lik bir salım gerçekleştirildiği görülmüştür.

Ek olarak her iki proteininde salımları karşılaştırıldığında lizozim salımının BSA salımından daha hızlı olduğu görülmüştür. İki proteinin birlikte verildiği zamana karşı %ilaç salım grafiği şekil 4.30'da belirtilmiştir.



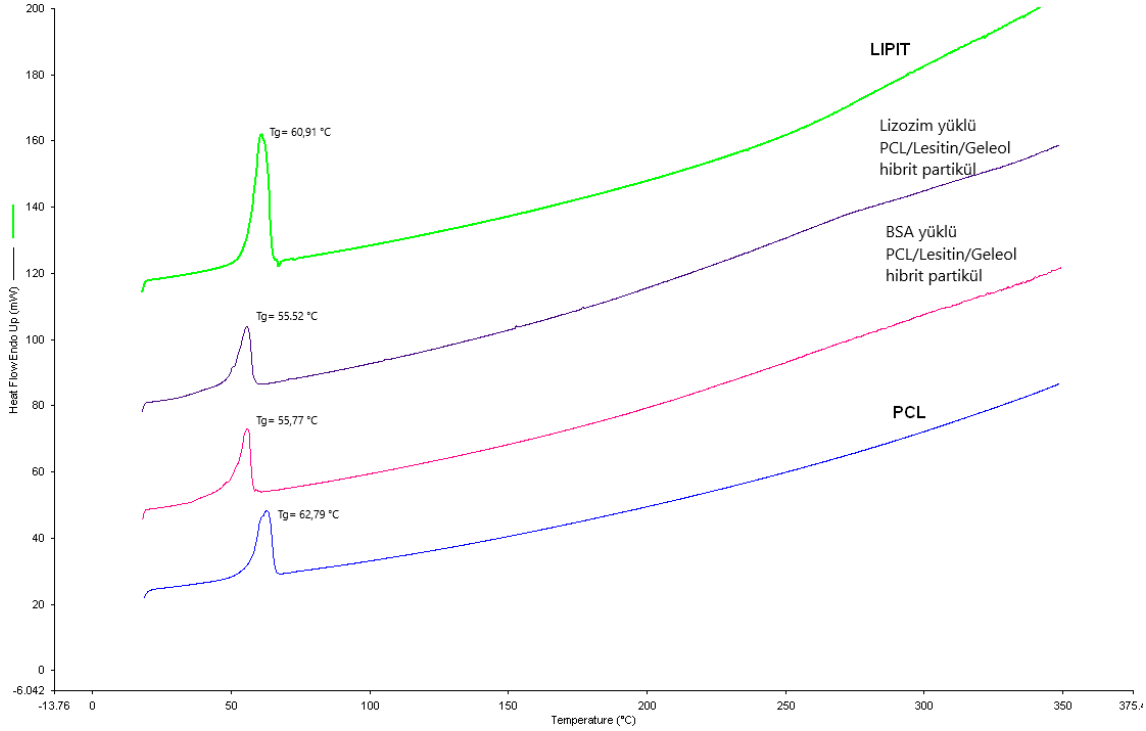
Şekil 4-30 PCL/Lesitin/Geleol lipit-polimer hibrit partikülden BSA'nın ve Lizozim salımının zamana bağlı değişimi

Tez çalışma kapsamında kronik yara tedavisi için farklı molekül ağırlıklarında proteinlerle çalışıldığı için proteinlerin partiküllerden karşılaştırmalı salım davranışları önem arz etmektedir. Grafikten elde edilen sonuçlara göre yara iyileşme basamaklarında ilk önce orijinal proteinlerden hangisinin etkili olacağı öngörülmektedir. Sonuçlara göre ilk önce %30'lik bir patlama salımı ile lizozim etkili olmaktadır. Bu durumda partiküller lizozimi daha hızlı salmaktadır. Hızlı olmasının nedeni lizozimin partikülün yüzeyinde tutunmuş olabileceği düşünülebilir. Ayrıca mikrokürelerden molekül ağırlığı daha küçük proteinin salımının hızlı gerçekleştiğini gösteren çalışmalar mevcuttur [221]. Örneğin bir çalışmada farklı molekül ağırlıklı polimerlerin ve farklı molekül ağırlıklı ilaçların PLGA-mPEG mikrokülerinden salım kinetiği üzerindeki etkileri araştırılmıştır. Sığır serum albumin (BSA, 66 kDa), lizozim (LZ, 13.4 kDa) ve vankomsin (VM, 1.45 kDa) gibi model ilaçlar kullanılmış ve farklı molekül ağırlıktaki PLGA-mPEG mikrokülerinde kapsüllenmiş. Sonuçlara göre en küçük molekül ağırlıklı vankomisin, sığır serum albumini ve lizozimden daha çok hızlı olduğu göstermişlerdir. Molekül ağırlığı küçük olan ilaçların partiküllerin iç kanallarından daha hızlı geçebildiği için salımları daha hızlı gerçekleşmektedir. Tez çalışmasında çalışılan model proteinlerden BSA'nın molekül ağırlığı büyük olduğu için polimer-lipit partiküllerden düşük bir patlama salımı daha sonrasında daha yavaş bir salım olmaktadır. Bir başka destekleyici çalışmada ise katı lipit nanopartiküllerde farklı molekül ağırlıkta proteinlerle çalışarak kapsüllenme ve salım kinetiklerini araştırmışlardır. SLN'lerde proteinlerin kapsüllenmesini arttırmak için lipofilik polimerik emülgatör olarak poli (laktik-ko-glikolik asit) kullanmışlardır. Lizozim yüklü ve BSA yüklü SLN 'lerin in vitro salım sonuçları, ilk bir patlama salımının ardından sürekli ve yavaş bir salım olduğunu gösterilmiştir. Salım davranışlarını incelendiğinde emülgatör olarak PLGA miktarını arttırıldığında BSA'nın salımının daha yavaş olduğu görülmüştür [206]. Ayrıca uzun süreli ve yavaş salımlar, partikül çekirdeğine dahil edilen proteinden dolayı gerçekleştiği göstermişlerdir [222].

4.3.4 PCL/Lesitin/Geleol Hibrit Partiküllerin DSC Analizi

PCL/Lesitin/Geleol hibrit partiküllerin model proteinleri yüksek oranda kapsüllediğini ve kontrollü bir şekilde salım davranışı sergilediği deneylerle ispatlandığı için bu partiküllerin farklı sıcaklıklardaki termal davranışı merak edilmiştir. Çünkü PCL/Lesitin/Geleol hibrit partiküllerinin proteienleri bir yara içinde karşılaçağı dış etkenlerden örneğin pH,sıcaklık ve proteaz gibi enzimlerden koruması gerekmektedir. Hibrit partiküllerin koruma yeteneğinin doğrulanmasının bir yolu termal davranışının

değerlendirilmesidir [173, 223]. Bu amaçla PCL/Lesitin/Geleol hibrit partiküllerin model proteinler varlığındaki termal davranışı diferansiyel taramalı kalorimetre ile analiz edilmiştir. DSC analizi ile elde edilen sonuçlar aşağıdaki gibidir. Şekil 4.31 'de lipit olan geleol, PCL, BSA yüklü hibrit partiküllerin ve lizozim yüklü hibrit partiküllerin termal davranışları gösterilmiştir.



Şekil 4-31 Lipit,PCL ve partiküllerin ile elde edilen Termogramları.

Termogram incelendiğinde saf PCL için tek bir pik elde edilmiştir. Bu pikin PCL'nin amorf fazından dolayı Tg'yi takip eden erime sıcaklığını gösteren bir endotermik olayı (62,79 °C) ifade etmektedir. [14] [224]. Bununla birlikte geleol DCS eğrisi, lipidin erime sıcaklığına karşılık gelen 60,91 °C'de sinyal göstermiştir. Bu sonuçları literatür ile karşılaştırıldığında uygun olduğu görülmüştür[225]. Literatür araştırıldığında aynı koşullar altında DSC analizinde lizozim 202,42 °C 'lik bir camsı geçiş sıcaklığı (tg) ile termal özellik gösterdiği bildirilmiştir [14]. BSA'nın ise yaklaşık olarak 60-77°C'de endotermik bir sinyal gösterdiği bildirilmiştir. [226].Tez kapsamında DSC analizi gerçekleştirilen BSA ve lizozim yüklü hibrit partiküllerin sinyallerinde proteinlere ait sinyallere rastlanmamıştır. Aynı sonuç, protein yüklü PLGA nanopartiküllerine protein dahil edildiğinde de rapor edilmiştir [227]. Polimer-lipit hibrit partiküllerde de lizozimin dahil edildiğinde benzer sonuçlar elde edilmiştir. Lizozim yüklü polimer-lipit hibrit partiküllerin DSC analizinde lipitlere ve lizozime ait bir sinyale rastlanılmadığı rapor

edilmiştir [14]. Böylelikle tez çalışma kapsamında tasarlanan PCL/Lesitin/Geleol hibrit partiküllerin model proteinlerin içerisine dahil edildiğinde termal özelliklerini koruduğu ispatlanmıştır.

Tez çalışma bir sonraki kısmında yara bölgesine uygun boyutta ve model proteinlerde en yüksek kapsülleme yeteneğine sahip, kontrollü salım özelliğinde olan partiküllerin yara bölgesine taşınması için ve yara bölgesinde nemli bir ortam oluşturarak yara iyileşmesine yardımcı olabilecek bir jel sistemi tasarlanmıştır ve karakterizasyon çalışmaları gerçekleştirilmiştir. Aşağıda yer alan başlıkta sıcaklığa duyarlı hidrojel sisteminin hazırlanması ve karakterizasyon çalışmalarının sonuçları yer almaktadır.

4.4 Sıcaklığa Duyarlı Hidrojel Sisteminin Hazırlanması ve Karakterizasyonu

Akıllı polimerlere dayalı hidrojel sistemler etken malzemelerin cilde uygulanması ve tutulması için ideal ilaç taşıma sistemi olabilmektedir. Tez kapsamında tasarladığımız yara iyileştirme ajanların yüklü olduğu polimer-lipit hibrit partiküllerin yaraya uygulanması ve tutulması için pluronik F127 tabanlı sıcaklığı duyarlı hidrojel tercih edilmiştir. Çalıştığımız sıcaklığa duyarlı hidrojin çeşitli avantajları bulunmaktadır [93, 228]. Avantajlar şu şekilde sıralanabilir. 1) Çözelti halindeyken kolayca uygulanabilmekte ve fizyolojik sıcaklıklarda istenilen bölgede jel haline gelmektedir, 2) Yara yakın temasa geçerek o bölgeyi örterek ve dış etkilerden koruyarak yaranın tam şeklini alabilmektedir, 3) Kullanımları kolaydır yapıştırıcı ve dikiş malzemesi kullanımı gerekli değildir, 4) yaranın iyileşmesi için gerekli nem koşullarını sağlayabilmektedir, 5) etken malzemelerin kontrollü salınımına katkıda bulunabilmekte ve etken malzemeyi korumaktadır [173]. Bu sayılan avantajların yanı sıra yara sıvıları ile seyreltme ile düşük mekanik direnç ve etken malzemelerin hızlı salınması gibi dezavantajları da mevcuttur. Sıcaklığa duyarlı hidrojellerin avantajları ve dezavantajları doğrultusunda tez çalışmasında PCL/ Lesitin/Geleol dayalı polimer-lipit hibrit partiküllerin özellikleri ve sıcaklığa duyarlı pluronik F127 hidrojin özellikleri birleştirilerek yeni bir taşıyıcı sistem hazırlanmış ve karakterizasyonu gerçekleştirilmiştir.

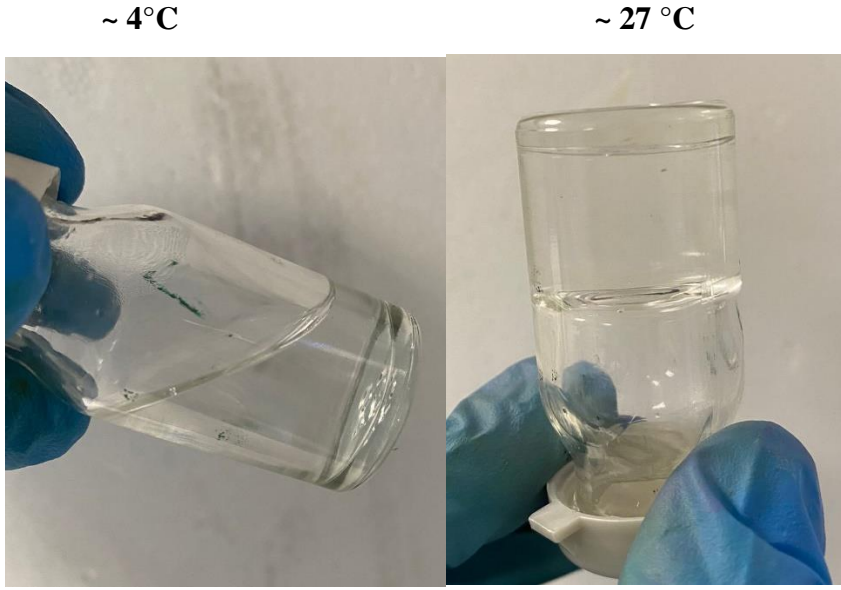
Literatürdeki çalışmalarda farklı konsantrasyonlarda pluronik F127 hidrojel ile çalışılmıştır. Fakat %25 (w/v) konsantrasyonunda pluronik F127 hidrojel fizyolojik koşullarda 1.5 mL çözeltisi 5 dk gibi kısa sürede hızlı jelleşmesi, uygun viskoelastik özellikleri ve hızlı geri kazanımı gibi özellikleri nedeniyle jel çalışmaları için uygun bir formülasyon olarak seçilmiştir [180]. Literatürde elde edilen bilgilerle tez çalışması

kapsamında %25 (w/v) konsantrasyonunda Pluronik F127 hidrojel tercih edilmiştir. Konsantrasyonu belirlenen pluronik F127 hidrojel soğuk metot ile hazırlanmıştır. Belirli miktar F127 ile ultra saf su karıştırılarak 1 gece boyunca +4 °C 'de dolapta bekletilerek berrak bir çözelti elde edilmiştir. Elde edilen çözelti Şekil 4.32 'de gösterilmiştir. Karakterizasyon çalışmalarını gerçekleştirmek için +4 °C'de 1-2 gün saklanmıştır.



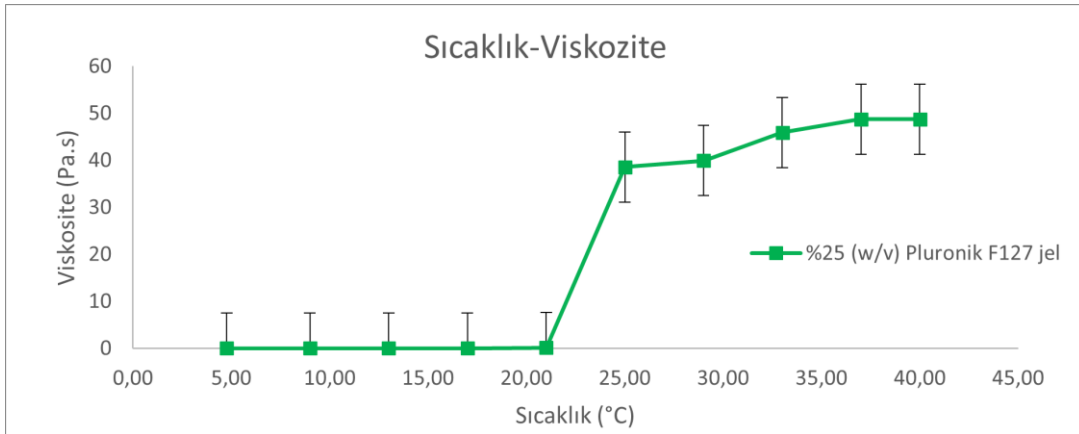
Şekil 4-32 %25 (w/v) Pluronik F127 Çözeltisi

Hidrojin jelleşme sıcaklığı ve jelleşmenin meydana geldiği an, sıcaklık arttıkça değişen viskozitesi dahil olmak üzere karakterizasyon çalışmaları farklı tekniklerle belirlenmiştir. İlk önce tüp ters çevirme yöntemi ile çözeltinin jelleşme sıcaklığı belirlenmiştir. Tüp çevirme yöntemi jelleşme sıcaklığının belirlenmesinde daha önce birkaç grup tarafından çalışılmıştır [229, 230]. Literatür doğrultusunda jelleşme sıcaklığının belirlenmesinde bu yöntem tercih edilmiştir. Çalışma sırasında çözelti +4 °C'de cam şişe içerisinde ters çevrilince akışkan halindedir. Sıcaklığı arttırdıkça çözeltinin viskozitesi artarak akışkanlığı zorlaşmıştır. Sıcaklık yaklaşık 27 °C ulaştığında çözelti cam şişe içerisinde hareket etmemiş akışkanlığı durmuştur. Ve o sıcaklık jelleşme sıcaklığı olarak kaydedilmiştir. Jelleşme süreci 5 dk gibi kısa bir sürede gerçekleşmiştir. Şekil 4.33'de %25 (w/v) F127 çözeltisinin farklı sıcaklıklarda cam şişe içerisindeki jelleşme durumu gösterilmiştir



Şekil 4-33 %25 (w/v) pluronik F127 çözeltisinin Jelleşme Durumu

Elden edilen jelleşme sıcaklığı literatür ile karşılaştırıldığında benzer sonuç göstermiştir. Örnek çalışmada %15 (w/v) konsantrasyonda F127 jel sıcaklık artmasına rağmen jelleşmeyip, %25 (w/v) konsantrasyonda F127 jel yaklaşık 20 °C’de jelleşmiştir [230]. Tüp ters çevirme yöntemi ile jelleşme sıcaklığı elde edilen jel boş jeldir. İçerisinde herhangi farklı malzeme bulunmamaktadır. Tüp ters çevirme yöntemi ile jelleşme sıcaklığı belirlendikten sonra aynı konsantrasyondaki %25 (w/v) pluronik F127 jelin reometre cihazında dinamik viskozite ölçümü yapılmıştır. Analiz üniversitemizde ileri teknolojiler uygulama ve araştırma merkezi’nde (hünitek) gerçekleştirilmiştir. Jelin viskozitesi kesme hızı sabit tutularak farklı sıcaklık aralıklarında (4 °C/dk) ölçülmüştür. Elde edilen sonuçlara göre sıcaklığa karşı viskozite grafiği çizilmiştir. Grafik şekil 4.34’de gösterilmiştir.

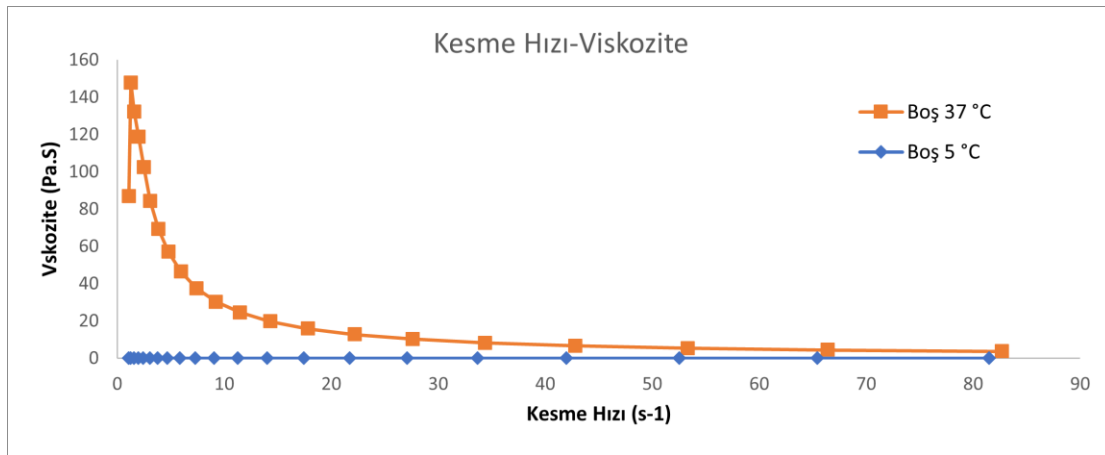


Şekil 4-34 Boş Pluronic F127 Jelin sıcaklığa karşı viskozite değişimi

Jel viskozitenin sıcaklığa karşı davranışı ısıtma sırasında analiz edilmiştir. Sonuçlar incelendiğinde başlangıçta yani 5 ° C’de jelin viskozitesi tipik sıvı çözeltilerindeki gibi düşük değer elde edilmiştir. Sıcaklık 25 °C yükseltildiğinde viskozitesinde artış belirgin bir şekilde görülmüştür. İlk sıcaklıkta viskozite değeri 0,046 Pa.s iken 25 °C ‘de viskozite değeri 38,56 Pa.s olmuştur. Sıcaklık 37 °C’de çıkartıldığında jelin viskozitesi de 48,75 Pa.s değerine ulaşmaktadır. Her iki yöntemle de elde edilen sonuçlarla %25 (w/v) pluronik F127 çözeltisinin sıcaklığa duyarlı bir hidrojel olduğu gösterilmiştir. Literatür ile karşılaştırıldığında benzer değerler elde edilmiştir [172, 231].

Boş jelin sıcaklığa karşı viskozitesi ölçümüne ek olarak jele uygulanan farklı kesme hızındaki viskozitedeki değişimi incelenmiştir. Kesme hızı çeşitli malzemelerin viskozitesini etkilediği dolayısıyla malzemelerin işlenebilirliğini, uygulanabilirliğini önemli ölçüde etkilediği için önemli bir parametredir. Farmasötik kremlerde, merhemler gibi malzemelerin tasarlanmasında farklı kesme hızlarında viskozitedeki değişim önemlidir[232]. Yüksek viskozite uygulandığında merhem istenilen bölgesinde kalmasında yardımcı olabilirken, daha küçük viskozite merhem daha kolay yayılmasına yardımcı olabilmektedir. Bundan dolayı tez kapsamında tasarladığımız sıcaklığa duyarlı hidrojelimizin farklı kesme hızlarında viskozitedeki değişimi karakterize edilmiştir.

Ölçüm hem çözelti fazında yani düşük sıcaklıkta hem de jel fazındaki sıcaklıkta yani 37 °C’de gerçekleştirilmiştir. Aşağıdaki şekil 4.35’de jelin farklı kesme hızındaki viskozite değişimini gösteren grafik gösterilmiştir.



Şekil 4-35 Pluronic F127 jelin farklı kesme hızındaki viskozite değişimi (5°C – 37 °C)

Grafikte sonuçlar incelendiğinde düşük sıcaklıkta çözelti haline olan pluronik F127 hidrojel kayma gerilmesi arttırıldıkça düşük olan viskozitesinde herhangi bir değişiklik olmamaktadır. Kayma gerilmesi arttığında viskozitesi düşmektedir. Bu sonuçlar

tasarladığımız sıcaklığa duyarlı jelimizin yara bölgesinde sürülebilir olduğunu göstermektedir. Çünkü kesme hızının artmasıyla viskozitenin azalması merhemlerde kullanıcı tarafından daha kolay yayılmasını sağlamaktadır [232]. Sonuçlara göre tasarladığımız jel sistemi Newton olmayan akışkan özelliği göstermiştir. Newton olmayan akışkanlarda kesme hızı arttıkça viskozite azalmaktadır [233].

Boş jelimizin karakterizasyon çalışmalarını gerçekleştirdikten sonra yara bölgesine taşımak istediğimiz taşıyıcı sistemimizi sıcaklığa duyarlı jel içerisine yükleyerek dolu olan jellerinde karakterizasyon çalışmalarını gerçekleştirilmiştir. İlk önce yara bölgesinde tedavi amacıyla en uygun taşıyıcı sistemi belirlenmiştir. Taşıyıcı sistemi belirlerken model proteinlerimizi en yüksek kapsüllenme verimliliğine sahip olan ve in vitro koşullarda kontrollü salımı gerçekleştirebilen özelliklerine dikkat edilmiştir. Bu özellikler karşılaştırıldığında en uygun taşıyıcı sistemin PCL/Lesitin/Geleol polimer-lipit hibrit partiküller olduğuna karar verilmiştir. Böylece PCL/Lesitin/Geleol polimer-lipit hibrit partiküller jele yüklenerek karakterizasyon ve jelden salım çalışmaları gerçekleştirilmiştir. Çalışma kapsamında hibrit partiküller elde edildikten sonra jele yüklenmiştir. BSA yüklü hibrit partiküller ve Lizozim yüklü hibrit partiküller elde edilip santrifüj tüplerine alındıktan sonra üzerine +4 °C 'de saklanan %25 (w/v) Pluronik F127 jel eklenmiştir ve 30 dk boyunca soğuk su banyosunda karıştırarak partiküllerin jelin içerisine yüklenmesi sağlanmıştır [234].

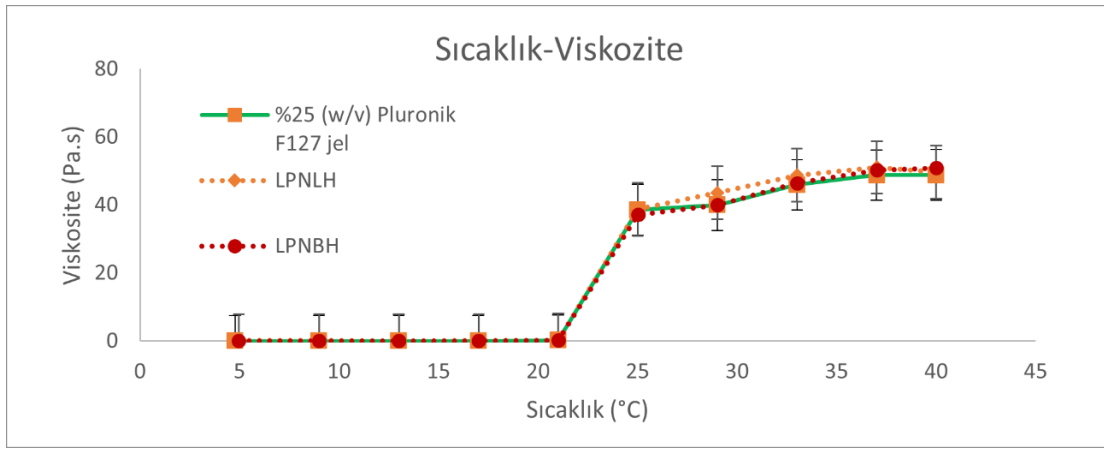
Taşıyıcı sistem yüklü jellerin karakterizasyonunda sıcaklığa karşı ve kesme hızlarına karşı viskozite ölçümleri gerçekleştirilmiştir. Ölçümler üniversitemizde yer alan ileri teknolojiler uygulama ve araştırma merkezi tarafından yapılmıştır. Çizelge 4.1 ve Şekil 4.36'da BSA yüklü hibrit partiküller ve Lizozim yüklü hibrit partiküller yüklü jellerin jelleşme sıcaklıkları ve viskozite değerleri gösterilmiştir.

Çizelge 4-1 %25 (w/v) Pluronik F127 hidrojel, BSA yüklü hibrit partikül yüklü jelin ve Lizozim yüklü hibrit partikül yüklü jelin Jelleşme sıcaklığı (Tg) ve Viskozitesi

Örnek	Jelleşme Sıcaklığı (Tg): °C	Viskozite (Pa.s)					
		9 °C	13 °C	21 °C	25 °C	37 °C	40 °C
Boş Hidrojel	25,01	0,038	0,032	0,155	38,6	48,8	48,8
LPNBH	25,02	0,046	0,034	0,155	37,1	50,2	50,9
LPNLH	25,01	0,066	0,054	0,223	38,7	51,0	49,6

LPNBH- BSA yüklü PCL/Lesitin/Geleol polimer-lipit hibrit partikül içeren jel

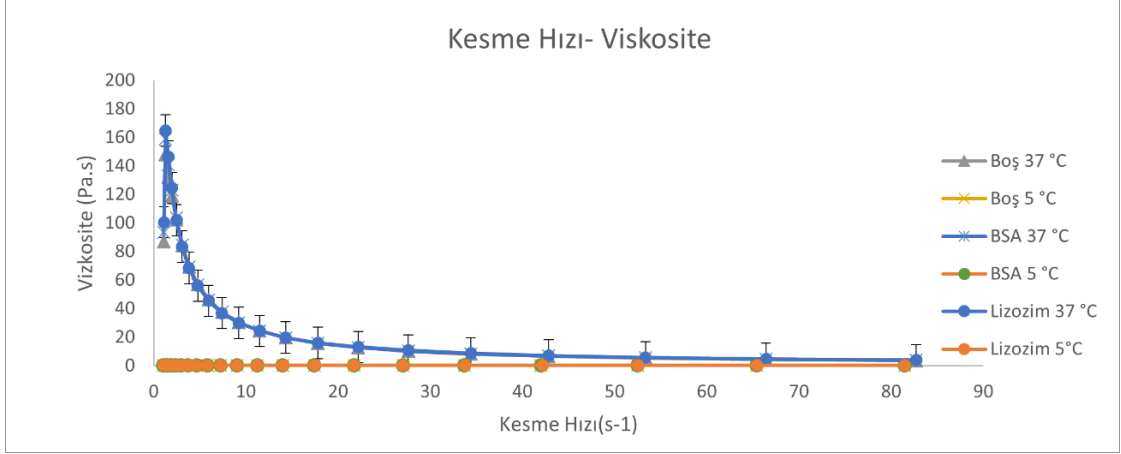
LPNLH- Lizozim yüklü PCL/Lesitin/Geleol polimer-lipit hibrit partikül içeren jel



Şekil 4-36 %25 (w/v) Pluronik F127 hidrojel, BSA yüklü hibrit partikül yüklü jelin ve Lizozim yüklü hibrit partikül yüklü jelin sıcaklığa karşı viskozite değerleri

Çizelge 4.1 ve Şekil 4.36'da üç profilden de görülebileceği gibi, sıcaklık yükseldikçe viskozite artmıştır en yüksek viskozite değeri 37°C'nin üzerindedir. Üç farklı formülasyon da yaklaşık olarak aynı sıcaklıkta jelleşmektedir. Üç profil karşılaştırıldığında taşıyıcı sistemin jelle yüklenmesinin jelin reolojik karakterine herhangi bir etkisi olmadığı anlaşılmıştır.

Taşıyıcı sistem yüklü jellerin jelleşme sıcaklığı ve sıcaklığa karşı viskozite değerleri elde edildikten sonra farklı kesme hızlarına bağlı olarak viskozite değerleri elde edilmiştir. Elde edilen viskozite değerleri boş jel yani içerisinde taşıyıcı sistem bulunmayan jelin viskozite değerleri ile karşılaştırarak tek bir grafik üzerinde incelenmiştir. Şekil 4.37'de kesme hızı ve viskozite grafiği gösterilmiştir.



Şekil 4-37 %25 (w/v) Pluronic F127 hidrojel, BSA yüklü hibrit partikül yüklü jelin ve Lizozim yüklü hibrit partikül yüklü jelin kesme hızına karşı viskozite değerleri (5°C – 37 °C)

Grafik incelendiğinde sonuçların oldukça benzer olduğu görülmektedir. Tez çalışması kapsamında kullanılması planlanan sıcaklığa duyarlı pluronic F127 jel içerisinde taşıyıcı sistem bulundurmasına rağmen kesme hızı arttıkça viskozitesi düşmektedir.

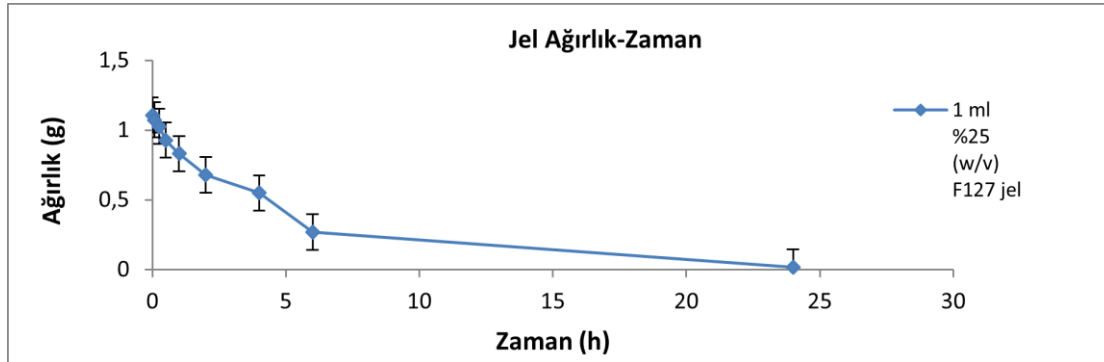
İçerisinde bulunan polimer-lipit hibrit partiküller jelin viskozite değerleri etkilememektedir. Jel içerisine taşıyıcı sistem yüklense bile istenilen bölgeye yara bölgesine sürülebilir özelliğinin değişmediği görülmüştür.

%25 (w/v) konsantrasyonunda pluronic F127 hidrojel ve model proteinleri taşıyan polimer-lipit hibrit partikül yüklü pluronic F127 jelin belirli karakterizasyon testleri ile 5 dk gibi kısa sürede 25-27 °C’de jelleştiği ve vücut sıcaklığı olan 37°C’de jel durumunun devam ettiği kanıtlanmıştır. Karakterizasyon çalışmalarından sonra aynı konsantrasyondaki jelin zamana bağlı tükenme hızının belirlenmiş ve salım çalışmaları yapılmıştır.

Jeli hazırlarken kullandığımız poloksamer suda çözünen bir surfaktan olduğu için zamanla çözünmektedir ve cam şişe içerisinde tükenmektedir. Yara bölgesine taşıyıcı sistem yüklü sıcaklığa duyarlı jelimizi ekleyince zamana bağlı olarak o bölgede tükenecektir. Bu nedenle tez kapsamında tasarlanan sıcaklığa duyarlı hidrojel zamana bağlı tükenme hızı araştırılmıştır. Bu amaçla belirli miktarda jeller hazırlanıp cam şişe içinde zamana bağlı olarak ağırlık değişimine bakılmıştır. Yöntem olarak membransız yöntem tercih edilmiştir. Membransız yöntemde jelin üzerine aynı hacimde aynı sıcaklıkla salım ortamı eklenmiştir. Jel üzerine eklenen salım ortamının aynı sıcaklıkta

olmasına dikkat edilmiştir. Çünkü jel sıcaklığından düşük olduğu durumda jelin tükenme hızını etkileyebilmektedir. Jel daha hızlı çözünüp, tükenmektedir.

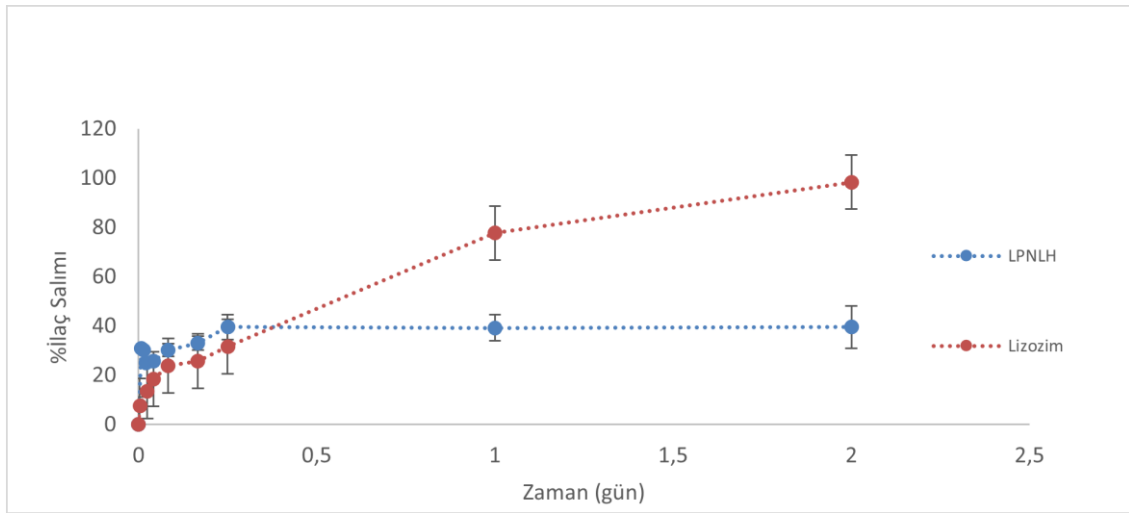
Jelin tükenme hızı, jele konulacak boş cam şişenin ağırlığı ile jel ile dolu cam şişenin ağırlığının arasındaki fark alınarak jelin ağırlığındaki değişime bakılmıştır. Deneye başlarken ilk önce içerisine %25 (w/v) pluronik F127 hidrojel hazırlanan cam şişenin boş iken ağırlığı ölçülmüştür. Boş şişenin ağırlığı 16,31 g ölçülmüştür. Cam şişe içerisine 1 ml jel koyunca jel + cam şişenin ağırlığı 17,42 g olmaktadır. Jel + cam şişenin ağırlığı ile boş cam şişenin ağırlığındaki fark 1 ml'lik jelin ağırlığı olarak kaydedilmiştir. Bu durumda 1 ml'lik jelin ağırlığı 1,1 g'dır. Daha sonraki aşamada belirli zaman aralıklarında jelin üzerine eklenen pbs'in tamamı alınarak cam şişede kalan jelin ağırlığı ölçülmüştür. Tamamı alınan pbs yerine taze pbs eklenmiştir. Her bir tartımda alınan ağırlıklardan boş cam şişe ağırlığının farkı alınarak jelin ağırlığı hesaplanmıştır. Zaman geçtikçe jelin tükendiği gözlemlenmiştir. Jelin zamana karşı ağırlığındaki değişim şekil 4.38 'de ağırlık-zaman grafiği olarak gösterilmiştir. 1 ml'lik jelin çalışılan koşullarda 1 gün içerisinde tükendiği görülmüştür. 3 ml jel örnekleri ile çalışınca jelin tükenmesi 2 güne kadar çıkmaktadır. 3 ml örneklerde farklı zaman aralıklarında jelin ağırlığı kaydedilmediği için ağırlık ve zaman grafiği oluşturulmamıştır.



Şekil 4-38 1 ml %25 (w/v) F127 Jelin Zamana Bağlı Ağırlığındaki Değişim

Daha sonra %25 (w/v) pluronik F127 hidrojelinin salım yeteneği araştırılmıştır. Çalışma kapsamında sıcaklığa duyarlı enjekte edilebilir çözeltiye tasarlanan partiküllerde içine eklenerek bu yeni sistemden seçilen model moleküllerin salım davranışı incelenmiştir. Salım çalışmalarında partikül sistemi olarak PCL/Lesitin/Geleol hibrit partiküller tercih edilmiştir. Salım çalışmaları farklı yöntemler ile gerçekleştirilmiştir. İn vitro olarak Franz difüzyon hücre yöntemi ile membransız metot olarak iki yöntem ile çalışılmıştır.

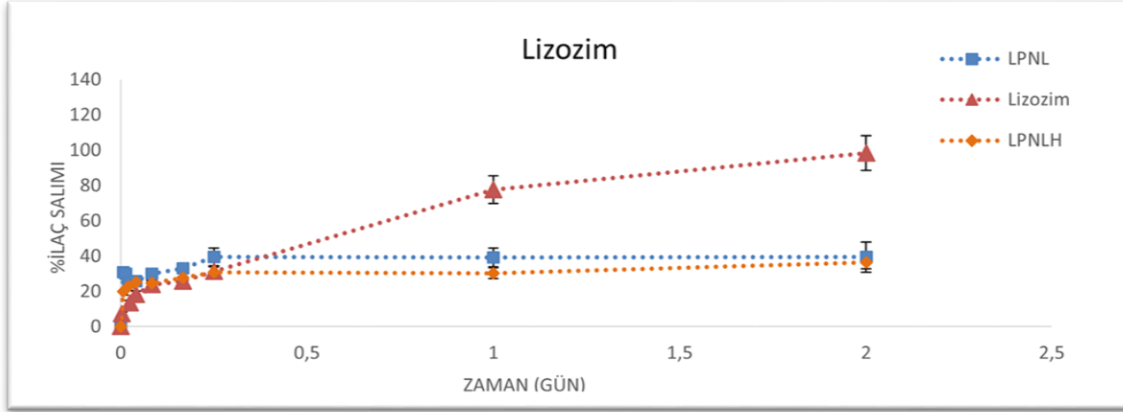
Franz difüzyon yöntemi ile diyaliz membrandan geçen lizozim konsantrasyonuna bakılmıştır. Franz difüzyon hücresinde donör bölmeye tek kat malzeme konulmuş 37 °C’de jelleşmesi sağlanmıştır. Reseptör bölmeye ise salım ortamı olan fosfat tamponu (PBS) eklenmiştir manyetik karıştırıcı (balık) eklenerek 150 rpm’de salım başlatılmıştır. Donör bölme ile reseptör bölme arasına diyaliz membran konulmuştur. Diyaliz membran sayesinde jele yüklenen lizozim yüklü polimer-lipit hibrit partiküllerin salım ortamına yani reseptör bölmeye geçmesi engellenmiştir. Salım çalışması 2 gün boyunca devam etmiştir. Belirli zaman aralıklarında elde edilen sonuçlar ile lizozim’in zamana bağlı %ilaç salımları hesaplanmış ve zamana karşı %ilaç salım grafikleri çizilmiştir. Lizozim’in hidrojel içerisinde ve hibrit partikül yüklü jel içerisindeki %ilaç salımı şekil 4.39’da gösterilmiştir.



Şekil 4-39 Lizozim’in jel içerisinde ve %25 (w/v) pluronik F127 Jel içinde polimer-lipit hibrit partiküllerden salımının zamana bağlı değişimi

Hidrojin salım deneylerinde 3 ml jel örnekleri ile çalışılmıştır. 3 ml jel örneklerinde salımlar 2 gün sürmektedir. Jel 2 gün içerisinde tükenmektedir. Elde edilen zamana karşı %ilaç salımlarına bakıldığında jel içerisinde olan lipit-polimer hibrit partiküllerden lizozim miktarının neredeyse %30’luk kısmını ilk 6 saatte saldı ve 2.günün sonunda yaklaşık olarak %39’unu salarak jelin tükendiği görülmüştür. Hibrit partiküllerin patlama salımının yaklaşık olarak %30’luk bir değer olduğu düşünülürse grafikte görülen kırmızı renk olan profilde lizozimin tek başına jelden salımı göstermektedir. Kırmızı renkteki profil incelendiğinde salımın ilk 6 saatinde yaklaşık olarak lizozimin %35’i salınmış ve 2. gün sonunda %100’e ulaşmıştır. Sonuç olarak iki farklı profil incelendiğinde lizozimi tek başına jele yüklendiğinde daha hızlı bir salım profili gözlemlenirken jel çözüldükçe

salımın hızlı ve kontrolsüz olarak gerçekleştiği görülmüştür. Aşağıdaki şekil 4.40'da gösterilen grafikte 3 profil yer almaktadır. 3 farklı sistemde lizozimi salım özellikleri karşılaştırmalı olarak incelenmiştir.



Şekil 4-40 Lizozim'in Hidrojelde (yeşil), Hibrit partiküllerde (kırmızı) ve Hibrit Partikül yüklü Hidrojelden (mavi) zamana bağlı olarak %ilaç salım değişimi

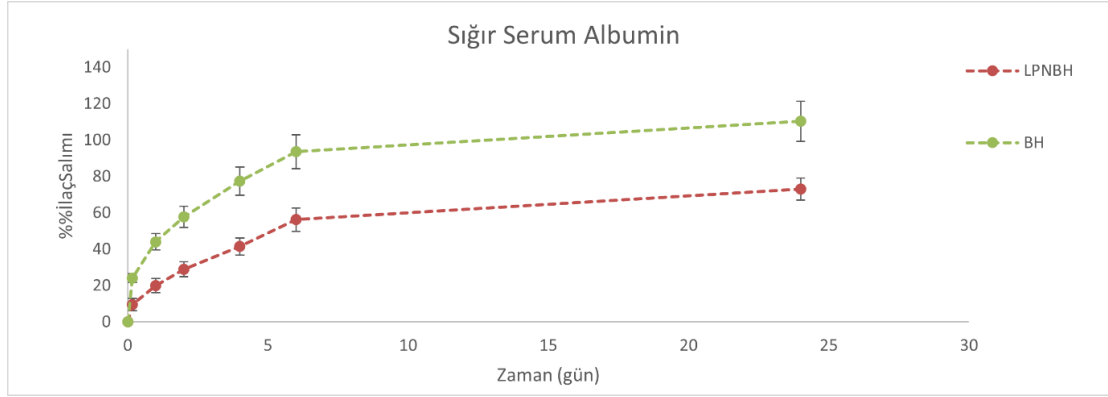
Üç farklı profili oluşturmak için lizozim yüklü polimer-lipit partiküller çift emülsiyon buharlaşma yöntemi ile hazırlanmıştır. Partiküller elde edildikten sonra kapsülleme verimlilikleri hesaplanarak kaydedilmiştir. Elde edilen partikül örneklerinden ilk önce polimer-lipit hibrit partiküllerin salımı başlatılmış ve %ilaç salım grafiği oluşturulmuştur. Daha sonra aynı partiküller sıcaklığa duyarlı hidrojele yüklenerek Franz difüzyon hücre ile jel içinde partikül salımı başlatılmıştır. Amaç lizozimin hem partikülden hem de partikül yüklü hidrojelden salımını karşılaştırmaktır. Üçüncü profil oluşturmak amacıyla ilk önce salım çalışmalarında kullanılan partiküllerin içerisindeki lizozim miktarı hesaplanmıştır. Elde edilen miktardaki lizozim %25 (w/v) F127 hidrojeline yüklenerek aynı koşullarda salım çalışması başlatılmıştır. Belirli zaman aralıklarından alınan örnekler %ilaç salım grafiği çizilmiştir. Her biri ayrı olarak şekilde %ilaç salım grafikleri edilmiştir daha sonra bir grafik üzerinde üç profil olacak şekilde yeniden düzenlenmiştir. Bu üç profil incelendiğinde lizozim yüklü hibrit partikülleri jele yüklendiğinde lizozim salımının etkilediği görülmüştür. Polimer-lipit hibrit partiküllerden lizozim salımı, pluronik F17 formülasyonlarından herhangi biri ile karşılaştırıldığında hızlı olduğu görülmüştür. Pluronic F127 ve partikül yüklü hidrojelleri 10 dk, 20 dk, 30 dk ve 6 saatte yavaşlamış bir lizozim salım hızı göstermişlerdir. Partikül yüklü hidrojelin salımı 2.güne kadar devam etmiştir. Lizozimin yaklaşık %39'u salınmıştır. İçerisinde yalnızca lizozim

bulunan hidrojel de lizozim salımı yavaş başlayarak jel çözüldükçe salımı da hızlanmıştır. 2 günde %100 'e ulaşmıştır.

Sonuçlara göre Pluronik F-127'deki polimer-lipit hibrit partiküllerden lizozim ilk 6 saatteki salım hızı, polimer-lipit hibrit partiküllerden daha yavaş olmaktadır. Polimer-lipit hibrit partikül lizozimin yaklaşık olarak %60'nı salarak ilk 6 saatte patlama salımı gerçekleşmiştir. Fakat aynı zaman aralıklarında polimer-lipit hibrit partiküller jele yüklenince lizozimin salımı ilk 6 saatte yaklaşık olarak %30'a düşmüştür. Böylece hidrojel sistemi ile birlikte hibrit partiküllerde lizozimin istenmeyen patlama salımı düşürülmüştür. Lizozim'in salımı kontrollü hale gelmiştir. Lizozim salımındaki bu düşüş partiküllerin üzerini kapladığı jel sisteminden kaynaklanmaktadır. Çünkü lizozim hem yüklü olduğu partiküllerden geçmektedir hem de en dışta bulunan jelden geçmektedir.

Membransız metot ile polimer-lipit hibrit partikül ve pluronik F127 ve polimer-lipit hibrit partikül yüklü hidrojellerinin salım ortamında bulunan BSA konsantrasyonuna bakılmıştır. Membransız metotta BSA'nın konsantrasyonunu ölçebilmek için bradford yöntemi kullanılmıştır ve bu çalışmada 1.5 ml hidrojel ile çalışılmıştır. Aynı anda hem BSA yüklü jelin hem de BSA içeren polimer-lipit hibrit partikül yüklü jelin salımları gerçekleştirilmiştir. Kullanmış olduğumuz yöntemde herhangi bir membran ya da zar olmadığı için cam şişe içerisine BSA yüklü %25 (w/v) pluronik F127 çözeltisi hazırlayıp 37°C 'de jelleşmesi sağlanmıştır. Çözelti jelleştikten sonra üzerine aynı sıcaklıkta ve hacimde salım ortamı olan PBS eklenmiştir. Salım başlatılmıştır. Belirli zaman aralıklarında salım ortamından örnekler alarak bradford reaktifi ile etkileştirerek 595 nm dalga boyunda BSA absorbansı kaydedilmiştir. Daha önceden oluşturulan kalibrasyon doğrusu ($y=0,6373x$) ile o zamandaki BSA konsantrasyonu elde edilmiştir. BSA yüklü hibrit partikül yüklü jelin salım çalışmalarında salım ortamından örnek alındıktan sonra örnekler santrifüj edilmiştir. Çünkü hibrit partikül yüklü jeli hazırlandıktan sonra üzerine aynı hacimde 37°C'de ısıtılmış PBS buffer eklenmiştir. Membransız yöntemde membran ya da zar kullanılmadığı için salım başladıktan bir süre sonra jel çözünüp partikülleri salım ortamına bırakmaktadır. Salım ortamından partikülleri uzaklaştırmak ve o zamandaki BSA konsantrasyonu daha doğru bir şekilde elde edebilmek için örnekler santrifüj edilmiştir. Santrifüj yapılırken partiküllere zarar vermemeye dikkat edilmiş ve 14000 rpm'de 5 dk santrifüj edilmişlerdir. Salım ortamından alınan örnekler santrifüj edildikten sonra santrifüj tüpüne hibrit partiküller çökmektedir. Çöken partiküllerden elde edilen süpernatant ile o zamandaki BSA konsantrasyonu elde etmek için süpernatant bradford reaktifi ile etkileştirilmiş ve 595 nm dalga boyunda BSA absorbasına bakılmıştır.

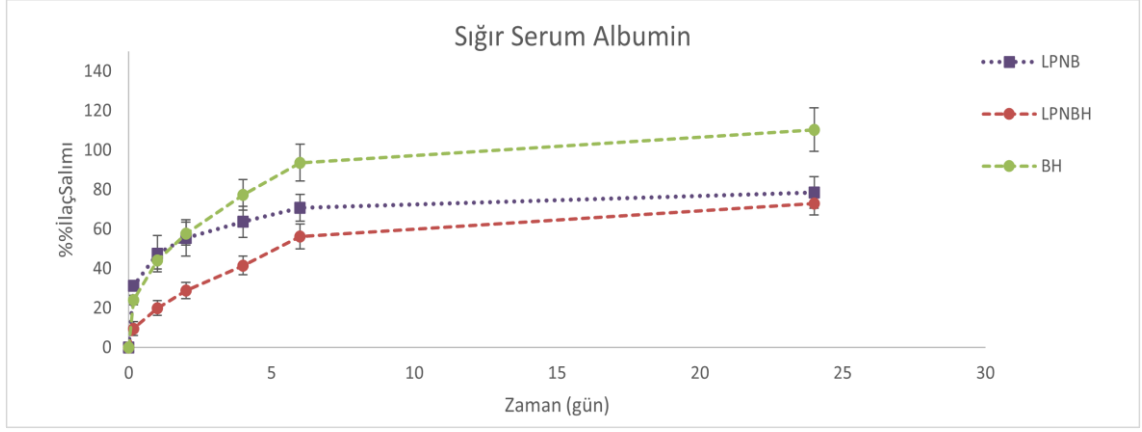
Kalibrasyon doğru ile ($y=0,6373x$) BSA konsantrasyonu elde edilmiş ve kaydedilmiştir. BSA'nın hidrojelde ve polimer-lipit hibrit partikül yüklü hidrojel içerisinde salım değişimleri gösteren grafik şekil 4.41 'de gösterilmiştir.



Şekil 4-41 BSA'nın jel içerisinde (yeşil renkte) ve %25 (w/v) pluronik F127 jel içinde polimer-lipit hibrit partiküllerden (kırmızı renkte) salımının zamana bağlı değişimi

1,5 ml jel örnekleri ile çalışıldığı için salımlar 1 gün sürmüştür. Jel 1 gün içerisinde tükenmektedir. Elde edilen zamana karşı %ilaç salımlarına bakıldığında jel içerisinde olan lipit polimer hibrit partiküllerden BSA'nın miktarının neredeyse %56'luk kısmını ilk 6 saatte saldı ve 1.günün sonunda yaklaşık olarak %73'ünü salarak jel tükenmiştir. Grafikte görülen yeşil renkte olan profilde BSA'nın jelden salımı gösterilmiştir. Yeşil renkteki profil incelendiğinde salımın ilk 6 saatinde yaklaşık olarak BSA'nın %90'ını salarak hızlı bir salım performansı sergilemiştir. 1.günün sonunda %100'ü salınmıştır ve jel tükenmiştir. Sonuç olarak iki farklı profil incelendiğinde BSA'nın jel içerisinde salımının hızlı ve kontrolsüz olduğu görülmüştür.

Membransız metot ile aynı zamanda BSA içeren polimer-lipit hibrit partiküllerin jeldeki BSA salımı çalışılmıştır. Elde edilen sonuçlarla hidrojelin hibrit partiküller üzerindeki etkisini araştırmak için bir önceki salımlar ile karşılaştırılmıştır. Bundan dolayı aşağıdaki şekil 4.42 'de gösterilen grafikte 3 profil yer almaktadır. 3 farklı formülasyonda BSA'nın salım özellikleri araştırılmıştır.



Şekil 4-42 BSA'nın Hidrojelde (yeşil), Hibrit partiküllerde (mavi) ve Hibrit Partikül yüklü Hidrojelden (kırmızı) zamana bağlı olarak %ilaç salım değişimi

Bu üç profil incelendiğinde BSA yüklü hibrit partikülleri jele yükleyince BSA salımının etkilediği görülmüştür. Polimer-lipit hibrit partiküllerden BSA salımı, partikül yüklü pluronik F127 hidrojeli ile karşılaştırıldığında hızlı olduğu görülmüştür. Partikül yüklü hidrojelleri 10 dk, 20 dk, 30 dk ve 6 saatte yavaşlamış bir BSA salım hızı göstermiştir. Partikül yüklü hidrojelin salımı 1.güne kadar devam etmiştir. BSA'nın yaklaşık %73'ünü salmıştır. Jel tükendiği için salım durdurulmuştur. İçerisinde yalnızca BSA olan hidrojeld de BSA salımı partikül salımı ile aynı profilde giderken jel çözüldükçe salımı da hızlanmıştır. 1 günde %100 ulaşarak BSA'nın hepsini salmıştır.

Pluronic F127 hidrojellerin farklı formülasyonlarında salım profilleri incelendiğinde partikülleri jel ile kapladığımızda salımı yavaşlattığımızı ve daha kontrollü bir salım gerçekleştiği elde edilmiştir. Aynı zamanda 37 °C'de jelleşen pluronic F127 'nin proteinlerin hibrit partiküllerden ilk patlama salımını etkili bir şekilde engellenmiştir.. Böylelikle jelin bu sistemde bir bariyer görevi gördüğü anlaşılmaktadır. Literatürde pluronic F127 içine alınmış polimerik partiküllerle ilgili çalışmalar ile karşılaştırıldığında benzer sonuçlar elde edilmiştir. Örneğin Sellers ve arkadaşlarının gerçekleştirdiği bir çalışmada demiyelizian lezyonların tedavisi için pluronic F127 içinde kapsüllenmiş poli(laktik-ko-glikolik) asit mikroküreler tasarlanmışlardır. Tedavi edici peptit olarak hirudin ile çalışmışlardır. Sonuç olarak hirudinin tek başına mikroküreler veya hidrojel ile karşılaştırıldığında hidrojelin neden olduğu uzun ve gecikmiş bir ilaç salımı olduğu göstermişlerdir [235]. Bir başka çalışmada Chen ve ark. cerrahi ağrıyı azaltmak için PLGA partikül yüklü pluronic F127 jelini tasarlamışlardır. Tasarladıkları taşıyıcı sistem bir anestezi ilacın sürekli salımı için pluronic F127 jel sistemine yüklenen biyolojik olarak parçalanabilen PLGA mikropartiküllere dayanmaktadır. %25 (w/v) F127 jeline

gömülü ilaç yüklü PLGA mikroküreleri in vivo belirli sinir bloke edilmiş sıçan modellerinde değerlendirilmiş ve 8,5 saat boyunca sıçanlarda duyuşal ve motor sinir bloğu sağladığı raporlamışlardır. PLGA mikropartiküllerine yüklenen anesteziik ilacın sinir bloğunu yarım saat içinde kontrol ettiğini, ameliyat sonrası hastalarda ağrıyı hızla azalttığını göstermişlerdir [236]. Örnek çalışmalarla pluronik F127 jeli içine gömülü partiküllerden etken malzemelerin salımları uzun süreli ve kontrollü olduğu kanıtlanmıştır. Tez çalışması kapsamında tasarladığımız sistemde elde edilen sonuçlarla model proteinlerin %25 (w/v) pluronik F127 hidrojel içine gömülü polimer-lipit hibrit partiküllerden gecikmeli salımları elde edilmiştir. Elde edilen jelleşme sıcaklığı değeri ve viskozite sonuçları ile yara bölgesine uygulanabileceği uygun bulunmuştur.

Model proteinler ile partiküllerin ve sıcaklığa duyarlı pluronik F127 hidrojin karakterizasyon ve salım çalışmaları tamamlandıktan sonra iki proteininde yüklü olduğu PCL/Lesitin/Geleol hibrit partiküllerin karakterizasyon ve salım çalışmalarına başlanmıştır. Tez çalışmasının özğün değeri olan bu kısım farklı molekül ağırlıklarına sahip iki farklı proteinin PCL/Lesitin/Geleol hibrit partikül içerisinde birlikte yüklenmesini içermektedir. Literatürde hibrit partiküller ile ilgili çalışmalar incelendiğinde GM-CSF ve/veya VEGF taşıyan sistemlere rastlanılmamıştır. Hatta tasarlamayı hedeflediğimiz PCL-lipit sırasıyla çekirdek-kabuk sistemin yaralar üzerine çalışmaları da mevcut değildir. Literatürde yara iyileşmesinde etkin rol oynayan etken malzemeyi ayrı ayrı taşıyan taşıyıcı sistem ile ilgili çalışmalar mevcuttur. Örneğin bir çalışmada VEGF ve BFGF yüklü PLGA partiküllerini fibrin iskelere hapsetmişlerdir diyabetik farelerde yara iyileştirme hızını araştırmışlardır [103]. Bir başka çalışmada yara iyileşmenin iki evresinde rol oynayan sıralı ilaç dağıtım sistemi tasarlamışlardır. Çalışmada gözenekli PLGA partiküllerine VEGF kapsüllenmiş, vansomisin içeren hidrojele entegre edilmiştir. Enfekte olmuş iyileşmesi zor olan yaralarda etkisi araştırılmıştır [11]. Tez kapsamında diyabetik yara iyileşmesinin birçok evresinde etkin rol oynayan iki etken maddeyi de taşıyan bir lipit-polimer hibrit partikül sistemi tasarlanmıştır. Literatür daha fazla araştırıldığında GM-CSF ve VEGF'in birlikte partikül içerisine yüklenip kronik yaralardaki etki mekanizmasını araştıran bir çalışmaya rastlanmamıştır. Literatürdeki bu eksiği giderilmesi amacıyla tasarlanan iki farklı protein birlikte bulunduğu PCL/Lesitin/Geleol polimer-lipit hibrit partiküllerin karakterizasyonu ve in vitro alım-salım çalışmalarının sonuçları aşığıdaki gibidir.

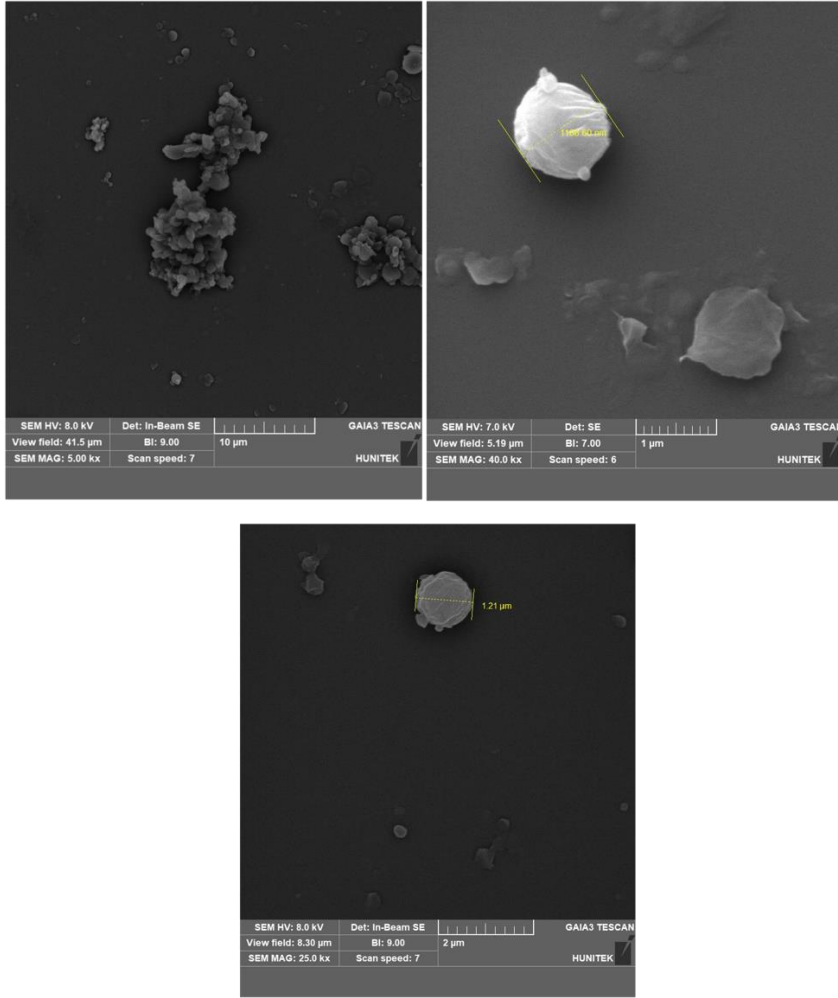
4.5 BSA/Lizozim yüklü PCL/Lesitin/Geleol Hibrit Partiküllerin Hazırlanması ve Karakterizasyonu

PCL/Lesitin/Geleol hibrit partiküller model proteinleri diğer polimerik taşıyıcı sistemlere göre daha yüksek oranda kapsüllediği ve 21 gün boyunca kontrollü salım davranışı gösterdiği için iki model proteininde birlikte kapsülleneceği taşıyıcı sistem olarak hibrit partiküller tercih edilmiştir.

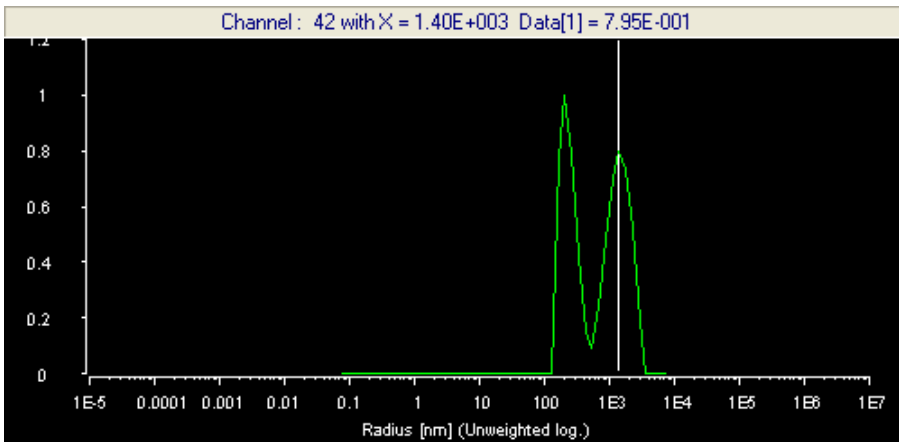
Bu hibrit partiküllerin hazırlanmasında su/yağ/su çift emülsiyon çözücü buharlaştırma yöntemi kullanılmıştır. İç su fazı, yağ fazı ve dış su fazı olarak üç farklı faz hazırlanarak belirli sonikleme gücünde ve süresinde deney gerçekleştirilerek emülsiyonlar oluşturulmuştur. İç su fazı belirli oranlarda BSA ve Lizozim çözeltisi içeren fazdır. Yağ fazında da ise polimer, lipitler ve çözücü bulunmaktadır. Dış su fazı ise emülsiyon edici ajanın yer aldığı fazdır. İç su fazının yağ fazının eklenmesiyle belirli güç ve sürede soniklenmesiyle birinci emülsiyon oluşturulmuştur. Oluşan emülsiyon dış su fazına eklenmesi ve aynı koşullar altında soniklenmesi ile ikinci emülsiyon oluşturulmuştur. Çözücünün buharlaştırılması ile BSA/Lizozim yüklü hibrit partiküller elde edilmiştir.

Su/yağ/su çift emülsiyon çözücü buharlaştırma yöntemi ile hazırlanan partiküllerin DLS ve SEM görüntüleri aşağıdaki gibidir. DLS görüntülerinden boyutları incelenmiştir. SEM görüntülerinde boyutları ve morfolojileri incelenmiştir.

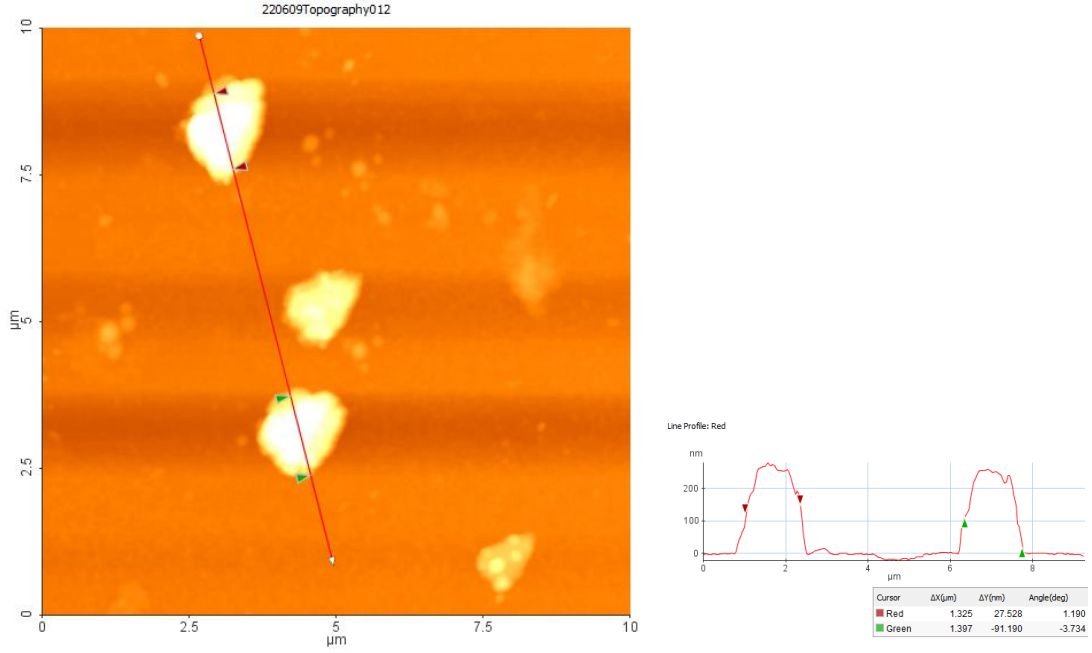
Sem görüntülerinden (Şekil 4.43) BSA/Lizozim PCL/Lesitin/Geleol hibrit partiküllerin küresel ama pürüzlü yüzeye sahip olduğu görülmüştür. Partikülleri elde ederken kullanılan lipitlerin doğası gereği polimer-lipit hibrit partiküllerin yüzeyleri pürüzlü olmaktadır [237]. SEM ölçümünde (Şekil 4.43), partiküllerin boyutların yaklaşık 987 ± 17 nm'lik bir ortalama çapa sahip olduğu görülmüştür. AFM ölçümünde (Şekil 4.45), boyutların yaklaşık 754 ± 29 nm olduğu görülmektedir. DLS ölçümünde (Şekil 4.44), partiküllerin bir polidispers boyut dağılımı (PDI: 0.436 ± 0.046) ile yaklaşık 1008 ± 331 nm'lik bir ortalama bir çapa sahip olduğu elde edilmiştir.



Şekil 4-43 BSA/Lizozim yüklü PCL/Lesitin/ Geleol Hibrit partiküllerin SEM görüntüsü

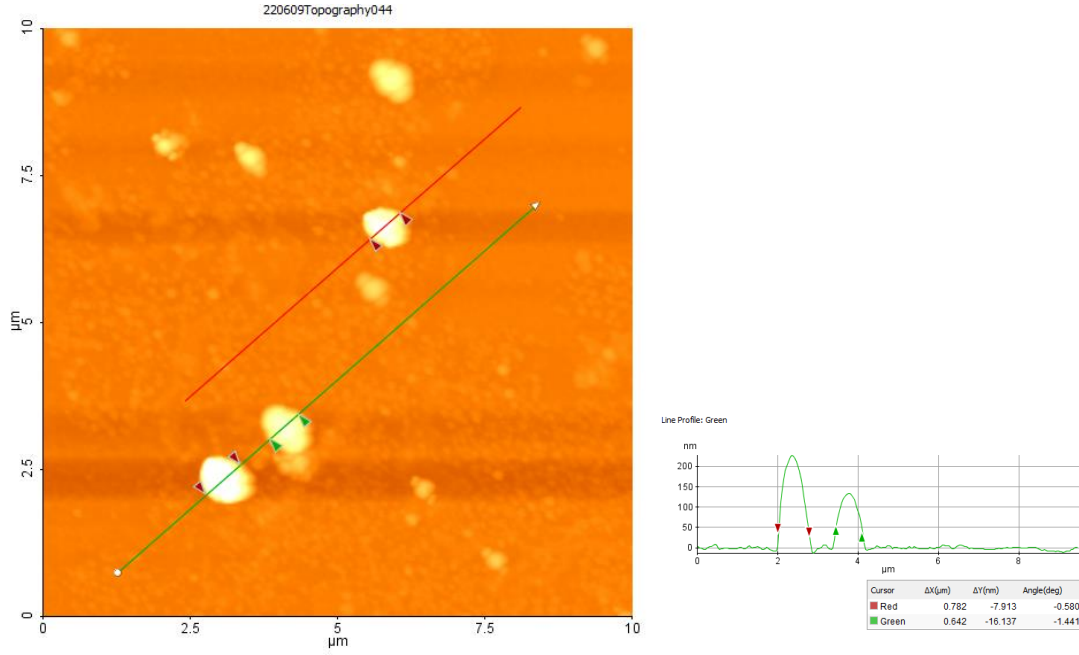


Şekil 4-44 BSA/Lizozim yüklü PCL/Lesitin/ Geleol Hibrit partiküllerin DLS görüntüsü



Şekil 4-45 BSA/Lizozim yüklü PCL/Lesitin/ Geleol Hibrit partiküllerin AFM görüntüsü

Yukarıda gösterilen şekil 4.45’de BSA/Lizozim yüklü PCL/Lesitin/Geleol hibrit partiküllerin AFM görüntüleri yer almaktadır. Elde edilen AFM görüntülerinde partiküllerin yüzeylerinin pürüzlü olduğu görülmüştür. SEM görüntüleri ile benzer olduğu düşünülmüştür. İki farklı proteininde yüklü olduğu polimer-lipit partiküllerde boyutları yaklaşık olarak 1 mikron olduğu için AFM ‘de daha net görüntüler elde edilememiştir. Ayrıca bu partiküllerin PDI değerleri 0,436 olduğu için partiküllerin polidispers olduğu düşünülmüş ve LS görüntülerinde farklı boyutlarda pikler elde edilmiştir. AFM görüntülerinde de farklı boyutlarda hibrit partiküllerin görüntüleri elde edilmiştir. Şekil 4.46’de gösterilmiştir.



Şekil 4-46 BSA/Lizozim yüklü PCL/Lesitin/ Geleol Hibrit partiküllerin AFM görüntüsü

AFM ile elde edilen partiküllerin görüntüleri örneğin yıkanması ve kurutulması nedeniyle partikül boyutları AFM probu (tip) tarafından ölçülen daha küçük çap değeri göstermektedir [238]. Şekil 4.46’da gösterilen BSA/Lizozim yüklü PCL/Lesitin/Geleol hibrit partiküllerin AFM görüntülerinde boyutların yaklaşık olarak 712 ± 128 nm olduğu görülmüştür.

Sonuç olarak boyutlar karşılaştırıldığı polimer-lipit hibrit partiküllere iki farklı molekül ağırlığına sahip proteinleri yükleyince boyutlarında neredeyse mikron düzeyde olacak şekilde artış olmuştur. Partiküllerin boyut değişimleri çizelge 4.2’de gösterilmiştir.

Çizelge 4-2 Partiküllerin Boyutlarındaki Değişimler

Partiküller	AFM (nm)	SEM (nm)	DLS (nm)
BSA yüklü PCL/Lesitin/Geleol Polimer Lipit Hibrit Partiküller	850 ± 27	870 ± 34	864 ± 194
Lizozim yüklü PCL/Lesitin/Geleol Polimer Lipit Hibrit Partiküller	429 ± 35	726 ± 23	$679,9 \pm 168$
BSA/Lizozim yüklü PCL/Lesitin/Geleol Polimer Lipit Hibrit Partiküller	754 ± 29	987 ± 17	1008 ± 331

4.5.1 BSA/Lizozim Yüklü PCL/Lesitin/Geleol Hibrit Partiküllerin Alım Salım Çalışmaları

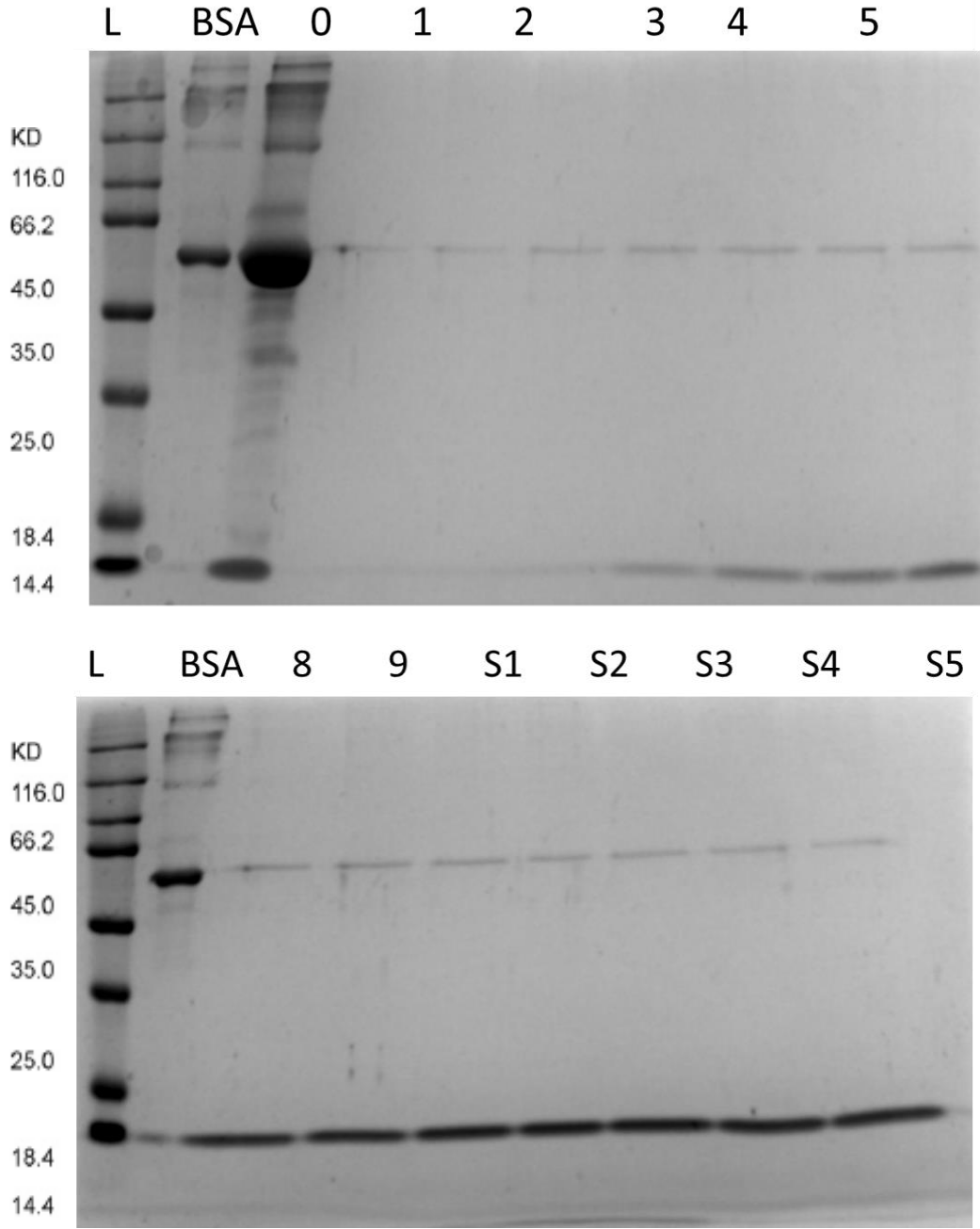
BSA/Lizozim yüklü PCL/Lesitin/Geleol hibrit partikülleri hazırlanıp ve boyutları karakterize edildikten sonra alım ve salım çalışmaları yapılmıştır. Fakat ikisi de protein olduğu için UV 'de 280 nm dalga boyunda veya bradfort reaktifi ile 595 nm dalga boyunda çalışılamamıştır. O yüzden PCL/Lesitin/Geleol hibrit partiküllerin içine aldığı BSA ve Lizozim miktarını hesaplamak için farklı yöntemler araştırılmıştır. Tez çalışması kapsamında çalıştığımız protein sadece molekül ağırlıkları farklı olduğu için en uygun yöntemin sodyum dodesil sülfat poliakrilamid jel elektroforezi (SDS-PAGE) olduğu bulunmuştur. SDS-PAGE yöntemi rutin protein analizlerinde kullanılan bir yöntemdir. Yöntem protein karışımlarını kalitatif olarak analiz etmek için kullanılmaktadır.

Yöntemin temeli oluşturan elektroforez, +,- yüklü moleküllerin bir elektriksel alan içinde gerçekleştirdiği hareketlerin izlendiği bir tekniktir. DNA ve proteinler gibi büyük moleküller de dahil olmak üzere yüklü moleküller bir elektrik alanının etkisi altında sıvı bir ortamda hareket etmektedir. Karışım içerisinde bulunan moleküller veya proteinler göç hızlarındaki farklılıklarına göre birbirinden ayrılmaktadır. Yöntemde kullanılan proteinlerin elektriksel alan içindeki göç hareketleri, net yüklerine, boyutlarına ve şekillerine bağlı olarak değişmektedir. Örneğin en küçük yapıda olan protein en hızlı şekilde hareket etmektedir. DNA gibi büyük molekül en yavaş şekilde hareket etmektedir. Elektroforez için en çok kullanılan yöntem sodyum dodesil sülfatın kullanıldığı SDS-PAGE yöntemidir. Yöntemde negatif yüklü olan sodyum dodesil sülfat (SDS) proteinleri denatüre etmek için kullanılmaktadır. Yöntemde proteinler denatüre edilerek aynı yük ile yani negatif yüklü hale gelmektedir ve aynı yüke sahip oldukları için moleküller ağırlıklarına göre ayrılmaktadır. Bu yöntemi ilk defa 1970 yılında Laemmli tarafından açıklanmıştır [239]. SDS-PAGE yönteminde proteinlerin içinde hareket ettiği ortam poliakrilamid jeldir. Bu yöntem proteinleri yalnızca molekül ağırlıklarındaki farklılıklara dayalı olarak ayırmanın en yaygın kullanılan temel yöntem olarak literatürde bahsedilmektedir [240, 241].

Protein uygun boya ile boyanarak poliakrilamid jelde hareketi izlenmektedir. Tez çalışma kapsamında model proteinler mavi renkte olan coomaise boya ile boyanmıştır. Boyanan proteinler tanka yüklendikten sonra elektrik alan içinde hareketi başlamakta ve molekül ağırlıklarına göre uygun yerlerde bantlar oluşturmaktadırlar. Deney sonunda oluşan bantlar moleküller ağırlık belirteci ile karakterize edilerek proteinler molekül ağırlıkları tespit edilmektedir.

Çalışmalara başlamadan önce BSA/Lizozim yüklü PCL/Lesitin/Geleol hibrit partikülleri hazırlanmıştır. Hibrit partikülleri ayırmak için sentez sonunda partiküller 14000 rpm'de 15 dk santrifüj edilmiştir. Santrifüj işleminden sonra süpernatant ayrılarak SDS-PAGE analizi için -20 °C'de dolaba kaldırılmıştır. Elde edilen süpernatant hibrit partiküllere kapsüllenmeyen proteinlerin tespiti için önemlidir. Santrifüj tüpünde elde edilen hibrit partiküllerin yıkama işlemi gerçekleştirilmiştir. Hibrit partiküllerin yıkama işlemi ultra saf su ile 14000 rpm de 5'er dk ile 3 kez gerçekleştirilmiştir. Yıkama işlemi ile hibrit partiküllerin yapısına dahil olmamış yüzey aktif maddelerin uzaklaştırılması amaçlanmıştır. Hibrit partiküllerin yapısının bozulmamasına dikkat ederek 5'er dakika kısa bir sürede yıkama gerçekleştirilmiştir.

Partiküllerin yıkama işlemi gerçekleştirildikten sonra diyaliz metodu ile salım çalışmaları başlatılmıştır. Salım çalışmasında belirli zaman aralıklarında salım ortamında 400 µL örnekler alınarak eppendorf tüplerine konulmuştur SDS-PAGE analizi için -20 °C de dondurularak saklanmıştır. Salım ortamından 400 µL örnek alınıp yerine 400 µL salım ortamı olan taze pH 7.4'de PBS eklenmiştir. Salımlar 21 güne kadar devam ettirilmiştir. Her gün örnek alınarak SDS-PAGE analizi için buzdolabında -20 °C'de saklanmıştır. 21. günün sonunda örnekler SDS-PAGE için hazırlanarak tanka yüklenmiştir. İn-vitro da hibrit partiküllerine kapsüllenmeyen ve salınan BSA, lizozimin varlığı ve yapısının bütünlüğü bantlarda incelenmiştir. Çalışmanın sonunda proteinlerin oluşturduğu bantları görebilmek için analizde kullanılan jel, jel görüntüleme cihazı ile görüntülenmiştir. SDS-PAGE analizinde elde edilen bantların yer aldığı jel şekil 4.47'de sunulmuştur.



Şekil 4-47 BSA/Lizozim yüklü hibrit partküllerin süpernatant ve 21.güne kadar salımların SDS-PAGE bantları (L; Moleküler ağırlık belirteci BSA kontrol, 2 µg BSA proteini 0; Süpernatant, 1; 30.dk, 2; 60 dk, 3; 6h, 4; 24h, 5; 48h 8; 7.gün, 9; 8.gün, S1; 11.gün, S2; 14.gün, S3;15.gün, S4; 16.gün S5; 21.gün

Şekil 4.47'de gösterildiği gibi partiküllerin süpernatında (0.noktada) iki tane bant oluşmuştur. Molekül ağırlık belirtecine göre moleküler ağırlığı yaklaşık 60 kDa olan bölgede koyu renkli bir bant oluşmuştur.

Literatürdeki çalışmalar araştırıldığında bu yüksek molekül ağırlıklı olan bu bandın BSA'nın varlığından kaynaklandığı anlaşılmıştır [206, 242]. Bir diğer bant daha küçük

molekül ağırlığındaki lizozim varlığından kaynaklanmaktadır. Çünkü molekül ağırlık belirtecine göre o bölgenin yaklaşık olarak 14 kDa 'a ait olduğu gösterilmiştir. Elde edilen bu sonuçlar ile hibrit partiküllerin süpernatantında her iki proteininin varlığı ve bütünlüğünü koruduğu anlaşılmıştır. BSA ve lizozim proteinlerin bant oluşumunda herhangi bir değişim gözlemlenmemiştir. Analize başlamadan önce örnekler SDS-PAGE kuyucuklarına eşit hacimde konulmuştur. Fakat yüksek molekül ağırlıkta olan BSA bandının dağınık koyu renk bir bant olduğu görülmüştür. Lizozim bandı ile karşılaştırıldığında BSA konsantrasyonunun daha fazla olduğu anlaşılmaktadır. Lizozim bandı BSA bandına göre daha küçük bir banttır ve süpernatanttaki konsantrasyonunun daha az olduğu düşünülmektedir. Süpernatanttaki sonuçlara göre BSA ve lizozimin aynı anda yüklendiği hibrit partiküllerde BSA'yı lizozime göre göreceli olarak daha az kapsüllediği görülmüştür. Elde edilen bu göreceli sonuç sayısal olarak bir sonuca dayandırılmak istenmiştir. Bu amaçla analiz sırasında kullanılan jel, görüntüleme cihazında görüntülendikten sonra program üzerinden bantların yüzdelikleri elde edilmiştir. Elde edilen sonuca göre BSA'nın bulunduğu bölgede bant yüzdesi %45,7 iken lizozimin bulunduğu bölgede bant yüzdesi %11,7 idi. Elde edilen yüzdeliklere göre süpernatantta BSA konsantrasyonunun fazla olduğu sayısal olarak ispat edilmiştir.

SDS-PAGE analizinde aynı zamanda BSA ve lizozimin in vitro salımda varlıkları araştırılmıştır. Sonuçlara göre analizde farklı molekül ağırlıklarına ait bantlar oluşmuştur. Bu bantların 60 kDa olan BSA ve 14 kDa olan lizozimden kaynaklandığı görülmüştür [206] [242]. Her iki proteine ait olan bantlar elde edilince partiküllerde hem BSA'nın hem de lizozim'in salındığı anlaşılmıştır. Farklı günlerde alınan örneklerde bantların kaybolmadığı görülmüştür. Bantlar teker teker incelendiğinde hibrit partiküllerden BSA ve lizozim salımının günler geçtikçe arttığı anlaşılmaktadır. Jellerdeki tek çizgiler, test edilen salım örnekleri içerisinde bulunan proteinlerin hibrit partiküllerinden salım sırasında parçalanmaya maruz kalmadığına dair kanıt sağlamıştır. 21.güne kadar model proteinlerin bütünlüğünü koruduğu görülmüştür. Beklendiği gibi önceki çalışmalara benzer şekilde, proteinlerin partiküllerde tutma prosedüründen veya serbest bırakma koşullarından etkilenmediğini göstermiştir [240] [243] [220].

Çalışmanın devamında BSA ve Lizozimin salım davranışlarını inceleyebilmek için elde edilen jel üzerinden bant yüzdeleri hesaplanarak kapsüllenme verimi hesaplanmaya çalışılmıştır. İlk önce jele belirli miktarda 2 µg BSA örneği yüklenmiştir. Analiz sonunda BSA kuyucuğunda tek bir bant oluşmuş ve %100 kabul edilmiştir. Böylelikle 2 µg BSA bandın %100'e eşit kabul edilmiştir. Diğer örneklerde molekül ağırlığındaki farklılıklara

bağlı olarak iki tane bant elde edilmiştir. Bantların jel görüntüleme sisteminde teker teker yüzdelikleri hesaplanmış ve kaydedilmiştir. 2 µg BSA %100 'e eşitleyerek doğru orantı ile farklı yüzdeliklerde BSA ve lizozim miktarları elde edilmiştir. Elde edilen sonuçlar tablo halinde düzenlenip aşağıdaki çizelge 4.3'de gösterilmiştir.

Çizelge 4-3 BSA/Lizozim yüklü polimer-lipit hibrit partiküllerin SDS-PAGE bantlarının yüzdelikleri ve protein derişimleri (0; Süpernatant, 1; 30.dk, 2; 60 dk, 3; 6h, 4; 24h, 5; 48h, 8; 7.gün, 9; 8.gün, S1; 11.gün, S2; 14.gün, S3; 15.gün, S4; 16.gün, S5;21.gün)

Örnek	BSA bant %	BSA (mg/ml)	Lizozim bant %	Lizozim (mg/ml)
0	45,7	1,587	11,7	0,431
1	63,3	0,007	36,7	0,005
2	59,6	0,005	40,4	0,003
3	44,0	0,005	56,0	0,006
4	33,4	0,008	66,6	0,017
5	22,0	0,007	78,0	0,029
6	18,1	0,008	81,9	0,033
7	12,1	0,007	87,9	0,048
8	10,5	0,009	89,5	0,085
9	11,5	0,009	88,5	0,087
S1	10,9	0,009	89,1	0,098
S2	8,1	0,009	91,9	0,091
S3	8,6	0,007	91,4	0,097
S4	8,4	0,010	91,6	0,115
S5	6,7	0,007	93,3	0,114

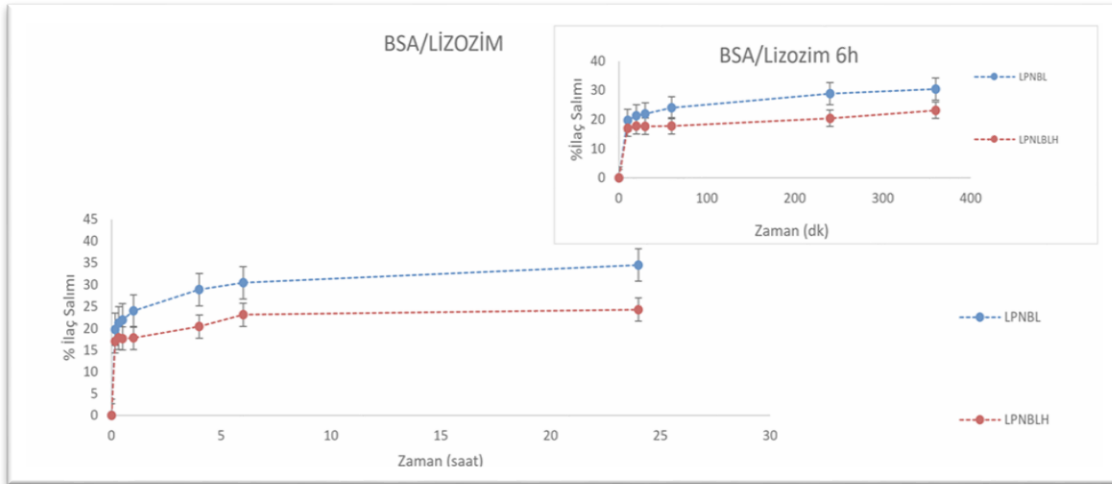
Çizelgede elde edilen sonuçlarda hibrit partiküllerin süpernatantında ve belirli zaman aralıklarında alınan salım örneklerinde BSA ve lizozim konsantrasyonları elde edilmiştir. Elde edilen konsantrasyonlarla % kapsülleme verimi eşitlik A kullanılarak hesaplanmıştır. Sonuçlara göre BSA'yı %66±2, Lizozim'i %74 ±11 kapsüllediği elde edilmiştir. Elde edilen sonuçlar aynı partiküllere tek başlarına yüklendiklerinde elde edilen kapsülleme verimlilikleri ile karşılaştırılmış ve benzer sonuçlar elde edilmiştir. Proteinler birlikte yüklense bile kapsülleme verimliliklerinde bir değişiklik olmadığı görülmüştür. Çizelge 4.4'de farklı moleköl ağırlığındaki proteinlerin yüklü olduğu PCL/Lesitin/Geleol polimer lipit hibrit partiküllerin kapsülleme verimlilikleri sunulmuştur.

Çizelge 4-4 PCL/Lesitin/Geleol Polimer Lipit Hibrit Partiküllerin Boyut Dağılımları ve kapsüllenme verimlerinde ki değişimler

Partiküller	AFM (nm)	SEM (nm)	DLS (nm)	%EE
BSA yüklü PCL/Lesitin/Geleol Polimer Lipit Hibrit Partiküller	850 ±27	870±34	864 ±194	%65±5
Lizozim yüklü PCL/Lesitin/Geleol Polimer Lipit Hibrit Partiküller	429 ±35	726±23	679,9±168	%77±10
BSA/Lizozim yüklü PCL/Lesitin/Geleol Polimer Lipit Hibrit Partiküller	754 ±29	987 ±17	1008 ±331	BSA %66±2 - Lizozim %74 ±11

Bant yüzdeliklerindeki oranlar incelendiğinde aynı polimer-lipit hibrit partikül içerisinde BSA'nin lizozimden daha yavaş salındığı anlaşılmıştır. Bantlardaki renk değişimleri ile bu kanıtlanmıştır. 21.günün sonunda lizozim bandı en koyu hale gelmiştir. Rengi koyu olmasıyla protein konsantrasyonunun fazla olduğu anlaşılmıştır.

Daha sonra iki model proteinin yüklü olduğu PCL/Lesitin/Geleol hibrit partiküller %25 (w/v) pluronik F127 jele yüklenerek salım davranışları araştırılmıştır. Yöntem olarak Franz difüzyon hücre yöntemi tercih edilmiştir. Salım, jelin tükenme hızına göre 1 günde gerçekleşmiştir. 280 nm dalga boyunda elde edilen absorbans değerleri daha önce hazırlanan kalibrasyon doğrusunda ($y=1.019x$) yerine yazılarak toplam protein konsantrasyonları elde edilmiştir. Daha sonra % ilaç salımları hesaplanarak zamana karşı % ilaç salım grafiği elde edilmiştir.



Şekil 4-48 BSA ve Lizozim'in Hibrit partiküllerde (mavi) ve Hibrit Partikül yüklü Hidrojelden (kırmızı) zamana bağlı olarak %ilaç salım değişimi

Şekil 4.48'deki grafik incelendiğinde BSA ve lizozim PCL/Lesitin/Geleol hibrit partiküllerden ilk 6 saatte yaklaşık olarak %30'nun salındığı görülmüştür. Aynı partiküller %25 (w/v) F127 jel içerisine konulduğunda salımın yavaşladığı ve ilk saatte yaklaşık olarak %23'ü salındığı görülmüştür. Bu durum beklenen ve istenilen bir durumdur. Tez kapsamında tasarlanan bu hidrojelin salımları yavaşlatıp model proteinlerin kontrollü bir şekilde salınması istenmiştir. Model proteinler için bir kalkan görevi görerek salımlarını daha kontrollü hale getirmiştir.

Polimer-lipit hibrit partiküllerin ve enjekte edilebilir pluronik F127 jelin model proteinlerle in vitro çalışmaları tamamlandıktan sonra tez kapsamında amaçlanan kronik yaraların tedavisinde kullanılmak üzere diyabetik yaralarda iyileşme hızına etkisinin araştırılması için bir ön çalışma olarak in vivo deneylere başlanmıştır. Tez çalışmasının 4.6 başlıklı kısmında in vivo çalışmaların sonuçları ve tartışmaları yer almaktadır.

4.6 İn vivo Çalışmalar

İn vivo çalışmalarda kullanılmak üzere orijinal proteinlerimiz olan VEGF ve/veya GM-CSF yüklü PCL/Lesitin/Geleol polimer lipit hibrit partiküller hazırlanmıştır. Yeniden hazırlanan hibrit partiküllerin kapsüllenme verimliliği yaklaşık olarak %73'tür. Elde edilen sonuç ile hibrit partiküllerin VEGF/GM-CSF orijinal proteinlerin yaklaşık %73'ünü içerisine aldığı anlaşılmıştır. Bu partikülleri yara bölgesine enjekte edebilmek için %25 (w/v) pluronik F127 jel içerisine yüklenmiştir. Jeller deneklere enjekte edilmeden önce +4 °C saklanmıştır. Hazırlanan enjekte edilebilir jeller streptozotosin ile diyabetik hale getirilen erkek Sprague Dawley sıçanların sırt bölgesinde oluşturulan 2 cm çaplı dairesel kesik yaralarına enjekte edilmiştir ve 10 gün boyunca yaraların iyileşme hızları takip edilmiştir. Çalışmanın belirli günlerinde her bir deneğin yara durumları değerlendirilmiş olup, yara bölgesinin fotoğrafları çekilerek boyutları imageJ programı ile ölçülmüştür. 10 günlük iyileşme sürecinin ardından yara bölgesi çevre doku ile birlikte alınmış, formol ile fikse edilmiş ve histolojik değerlendirmeler gerçekleştirilmiştir

4.6.1 Sıçanların Diyabetik Hale Getirilmesi ve Yara Oluşturma

Tez çalışması kapsamında sıçanlar Cayman Chemical'dan temin edilen streptozotosin ile diyabet hale getirilmiştir. Streptozotosin, diyabet araştırmalarında kullanılan diyabetojenik ajandır [244]. Langerhans adacıklarının beta hücreleri üzerinde sitotoksik bir etkisi vardır. Beta hücrelerini şişirerek dejenere etmektedir. Ajan nedeniyle dejenere

olmuş beta hücreleri insülin salımını gerçekleştirememektedir ve şeker hastalığına neden olmaktadır [245] [246]. Literatürdeki bulgularda STZ tarafından kimyasal olarak diyabet haline gelen sıçanlarda insülin eksikliğinin belirtilerinin açıkça fark edildiği belirtilmektedir [247]. Yorgunluk ve halsizlik hissi yaşanması, hızlı kilo kaybı yaşanması, aşırı susuz hissedilmesi ve buna bağlı olarak bolca su tüketimi, çok sık idrara çıkma isteği bu gibi belirtiler insülinin eksikliğinden kaynaklı olmaktadır.

Çalışmada 10 adet sıçana streptozotosin verilmeden önce açlık kan glikoz seviyeleri ve ağırlıkları ölçülmüştür. STZ, 65 mg/kg dozunda tek doz IP olacak şekilde enjekte edilmiştir. Yavaş ilerleyen diyabet hastalığı indüklemek için 40-70 mg/kg tek bir STZ dozu yeterli olduğu literatürde gösterilmiştir. Kemirgenlerde diyabet hastalığını oluşturmak için STZ yaygın olarak intraperitoneal (IP) veya intravenöz (IV) olmak üzere iki yoldan biriyle verilmektedir. IP, karın içine yapılan bir enjeksiyon olduğu için hızlı ve kolay bir yöntemdir ve özellikle ajanın birden fazla dozunu içeren çalışmalarda kullanılmaktadır [248]. IP enjeksiyonu hızlı ve kolay bir yöntem olduğu için tez çalışmasında STZ ajanını sıçan vücuduna verilmesinde tercih edilmiştir.

Bu bölümde 10 adet Sprague Dawley sıçanların kan-glikoz seviyeleri ve ağırlık takibinde bulguları diyabet hastalığının neden olduğu sıçanlarda gözlenen belirtiler sunulmuştur. Bölüm devamında diyabet olan sıçanlarda dairesel yaralar oluşturarak bulguları değerlendirilmiştir.

Sıçanlarda diyabet model oluşturmadan önce ağırlıkları ve 6-8 saat'lik açlık kan şekerleri ölçülmüştür. Sonuçlar 0.gün olarak çizelge 4.5'de gösterilmiştir. STZ enjekte edildikten sonra açlık kan şekeri ölçümleri 3.gün, 7.gün, 14.gün 21.gün, 28.gün ve 30.gün aynı saatte yapılmıştır. Kan glikoz seviyesi ölçümünde VivaCheck Eco ölçüm cihazı kullanılmıştır. Şeker seviyeleri ve ağırlıkları ölçülen sıçanlar numaranladırılarak ayrı ayrı kafeslere konulmuştur. Şekil 4.49'de gösterilmiştir.



Şekil 4-49 Barınma odasında ayrı ayrı kafeslerine alınan sıçanlar

Denekler ayrı ayrı kafeslere alındıktan sonra normal yem ve su verilerek bakımları sağlanmıştır. Şekil 4.50’da beslenme durumları gösterilmiştir.



Şekil 4-50 Barınma odasında ayrı ayrı kafeslerine alınan sıçanlarda beslenme

0.gün ve streptozotosin ajan enjekte edildikten sonraki 3.gündeki açlık kan şekerlerinde ve ağırlıklarında elde edilen sonuçlar çizelge 4.5’de sunulmuştur.

Çizelge 4-5 0.ve 3.günde ratların ağırlıkları ve açlık kan şekerleri

Sıçan	0.GÜN		3.GÜN	
	Ağırlık (g)	Açlık Kan Şekeri (mg/dl)	Ağırlık (g)	Açlık Kan Şekeri (mg/dl)
1	384	136	329,5	444
2	362,5	78	310	345
3	362	122	345	454
4	334	113	319,5	357
5	320	103	283	436
6	373	87	367	115
7	328	97	376	220
8	393	74	303	455
9	335	107	284	422
10	336	78	311,5	424

Çizelge 4.5’de açlık kan şekerlerinin 3 günde 300 mg/dl üzerinde olduğu tespit edilmiştir. Elde edilen sonuçlar literatürde benzerlik göstermiştir. Literatürde, STZ’nin 60 mg/kg dozunun kullanılması, langerhans adacıkları beta hücrelerinin yok edilmesiyle sonuçlanan bir otoimmün süreci başlattığını ve 2-4 gün içinde klinik diyabetik ortaya çıkmasına neden olduğu belirtilmiştir [249].

Çizelgede sıçanların ağırlıkları incelendiğinde ağırlıklarında hızlı düşüşün meydana geldiği görülmüştür. Sıçanların 7 ve 14.günde açlık kan şekerleri ve ağırlıkları ölçülmeye devam edilmiştir. Elden sonuçlar çizelge 4.6’de belirtilmiştir. Çizelge incelendiğinde 7.günde açlık kan şekerlerinin 300 mg/dl üzerinde seyrettiği görülmüştür. Bazı deneklerin kilo verilmesinin devam ettiği bazılarının kiloların arttığı görülmüştür. 10 numara kilosu neredeyse 400 g’a çıkmıştır. Aynı zamanda sıçanlarda farklı belirtiler oluşmaya başlamıştır. Çok fazla su tüketimi başlamıştır ve buna bağlı olarak altlıklar çok fazla ıslanmaya başlamıştır.

14.gündeki sonuçlar incelendiğinde 9 numara sıçan hariç açlık kan şekerlerinin 300 mg/dl altında düştüğü görülmüştür. Açlık kan şekerleri 300 mg/dl altına düştüğü fark edilince sıçanların iyileşmeye başladığı düşünülüp ve diyabet durumunun devam etmesi için 14.günde aynı doz olacak şekilde tekrardan STZ enjekte edilmiştir. İkinci doz verildikten bir hafta sonra açlık kan şekerleri ve ağırlık takibi yapılmıştır. Elde edilen sonuçlar çizelge 4.7’de sunulmuştur.

Çizelge 4-6 7.gün ve 14.günde ratların ağırlıkları ve açlık kan şekerleri

Sıçan	7.GÜN		14. GÜN	
	Ağırlık (g)	Açlık Kan Şekeri (mg/dl)	Ağırlık (g)	Açlık Kan Şekeri (mg/dl)
1	302,4	259	302	141
2	266	428	302,5	130
3	334,7	428	327,5	115
4	310,2	432	294,5	122
5	262	490	243,5	172
6	372,5	106	365,5	83
7	356,1	136	391	75
8	246,9	311	266	136
9	251,5	506	251,5	471*
10	398	300,7	289	147

Çizelge 4.7 incelendiğinde ikinci doz STZ verilmesine rağmen sıçanları 21.günde açlık kan şekeri düzeyleri 300 mg/dl üzerinde elde edilmemiştir. Fakat kilo kayıpları devam etmiştir. Her gün düzenli olarak normal su yerine % 10 dekstroz verilerek açlık kan şekeri ve ağırlık takibi yapılmıştır. 28.günde görülen değerlerde açlık kan şekeri düzeyleri 300 mg/dl olanlar diyabet kabul edilmiştir.

Çizelge 4-7 21.gün ve 28.günde ratların ağırlıkları ve açlık kan şekerleri

Sıçan	21. GÜN		28.GÜN	
	Ağırlık (g)	Açlık Kan Şekerleri (mg/dl)	Ağırlık (g)	Açlık Kan Şekerleri (mg/dl)
1	287,5	138	223,5	135
2	243,5	102	250	393
3	315,5	187	314	211
4	256	433	242,5	472
5	220	209	222	346
6	357,5	116	351	174
7	393	95	404,5	107
8	249	143	179,5	73
9	240	365	222,5	528
10	296	130	294	210

Deneklerin 30.günün sonunda şeker düzeyleri tekrardan ölçüldüğünde şeker ölçüm cihazında H1 kodu vermiştir (Çizelge 4.8) . Cihazın kullanma kılavuzuna bakılmış ve şeker düzeyleri 600 mg/dl üzerinde olduğunda H1 kodu verdiği anlaşılmıştır. Şeker

düzeyleri 600 mg/dl üzerinde olduğu için diyabetik olarak kabul edilmiştir. Literatür ile de desteklenmiştir. Ratlarda diyabet model oluşturan çalışmalarda şeker düzeyleri 300 mg/dl olduğunda diyabetik kabul edilmiştir [194]. Ayrıca tokluk hiperglisemi için STZ ile muamele edilen gruplarda kan glukoz seviyesi >200 mg/dl olması gerektiği, aç diyabetik hayvanlar için kan şekeri >150 mg/dl olması gerektiği diyabetik model oluşturma protokolü ile desteklenmiştir [250].

Çizelge 4-8 30.günde ratların ağırlıkları ve açlık kan şekerleri

30. GÜN		
Sıçan	Ağırlık (g)	Açlık Kan Şekerleri (mg/dl)
1	272	H1
2	198,5	H1
3	322	H1
4	198,5	H1
5	-	-
6	342,5	H1
7	409	549
8	190	562
9	202,5	H1
10	292	H1

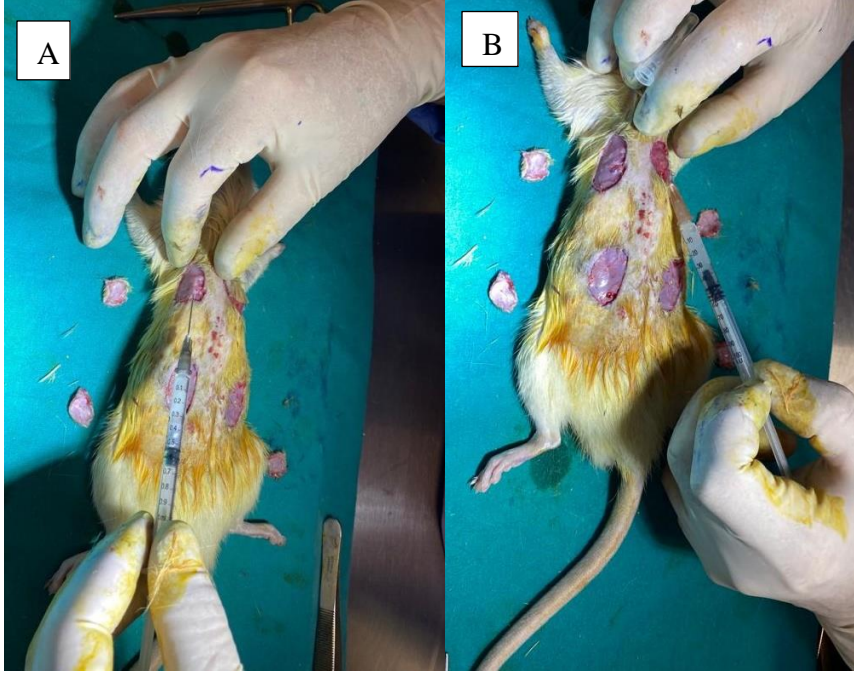
5 numara yara oluşturma deneylere başlamadan ölmüştür. Ölüm nedeninin çok zayıflayıp şeker düzeyinin 300 mg/dl üzerinde olmasıyla ilişkili olduğu düşünülmüştür. Genellikle, tek dozlu STZ enjeksiyonundan 3 hafta sonra, hayvanların %50'den fazlasında şiddetli hiperglisemi gelişmekte ve kan şekeri seviyeleri 300 ila 600 mg/dl'ye ulaşmaktadır [248]. Şiddetli hiperglisemiye bağlı olarak ölümler gerçekleşmektedir. Deneysel çalışmalara 9 denek ile devam edilmiştir.

Sırayla deneklere anestezi ilaçları uygulanarak Şekil 3.13 deki şematik gösterime göre her bir ratın sırtına 2 cm çaplı dairesel 4 adet eksizyonel yara oluşturulmuştur. Yaraların üzeri çıkarılan deri parçasısının tekrardan dikilmesi ile kapatılmıştır. Her bir yaranın derisi yanına konulmuştur (Şekil 4.51).



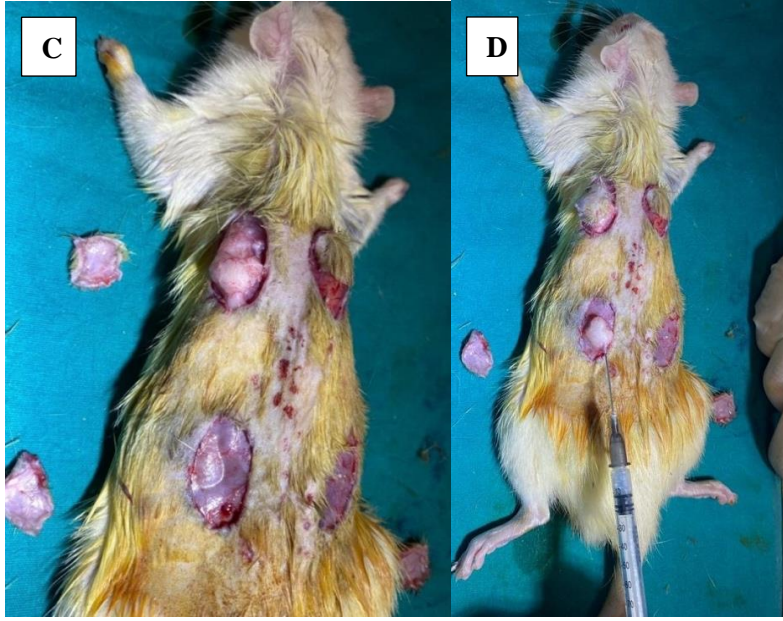
Şekil 4-51 2 cm²lik 4 adet dairesel eksizyonel yaranın görüntüsü

4 adet yara oluşturulduktan sonra şekil 3.11’de gruplandırılan yaralara göre hazırlanan jeller enjekte edilmiştir. Jeller enjekte edilmeden önce UV sterilizasyon cihazı steril edilmiştir. Her bir yaraya 400 mikrolitre jel enjekte edilmiştir (Şekil 4.52). Enjekte edilmesi gereken miktarı belirleyebilmek için literatürdeki çalışmalar araştırılmıştır. Araştırmalarda elde edilen Kant ve arkadaşlarının gerçekleştirildiği bir çalışmada yara bölgesine 400 µl %25 (w/v) F127 jelin topikal olarak uygulanmasıyla yaraların iyileşme hızlarının arttığı gösterilmiştir [171].



Şekil 4-52 Gruplandırılan yaralara taşıyıcı sistemlerin enjekte edilmesi A) protein yüklü olmayan boş PCL/Lesitin/Geleol polimer lipid hibrit partiküllerin yüklü jel, B) VEGF ve GM-CSF'nin tek başına bulunduğu jel

Tasarladığımız jel sistemi bölgeye enjekte edildikten sonra deri altında jelleşmiştir ve beyaz bir tabaka halinde gözle görülmüştür. Şekil 4.53'de jelleştiği görüntüler sunulmuştur. Bu durum beklenen bir durumdur. Jel sistemi ısıya duyarlı bir sistem olduğu için vücut sıvısına maruz kaldığında 5 dk gibi kısa bir sürede jelleşmektedir. Bu durum tez çalışmamızın in vitro deneylerle gösterilmiştir. Canlı vücudu ile desteklenmiştir. Ayrıca istenilen bölgede jelleşme gerçekleştiği için vücut içerisinde enjekte edildiği bölgede kalmıştır. İçerisinde bulunan taşıyıcı sisteminin farklı bölgelere geçmesi engellenmiştir.



Şekil 4-53 %25 (w/v) F127 Jelinin vücut içerisinde jelleşmesi C) protein yüklü olmayan boş PCL/Lesitin/Geleol polimer lipit hibrit partiküllerin yüklü jel ve VEGF ve GM-CSF'nin tek başına bulunduğu jelin uygulanması D) VEGF/GM-CSF yüklü PCL/Lesitin/Geleol polimer

Yaraları oluşturulan ve jel sistemi enjekte edilen deneklerin yaraları kendi deri greftleri yerlerine dikilerek kapatılmıştır. Şekil 4.54'de yaraların dikiş ile kapandığı hali gösterilmiştir.



Şekil 4-54 Yaraların deri parçaları ile kapatılması

Yara oluşturma deneyleri sırasında 4, 8 ve 10 numaralı denekler ölmüştür. 4 ve 8 numaranın anestezi verildikten sonra nefes alışveriş hareketleri durmuştur. Kalp masajı

yapılarak hayata döndürülmeye çalışılmış fakat hayata döndürülememişlerdir. Deney grubundan çıkarılmıştır. 6 denek ile deneylere devam edilmiştir. 6 hayvanın yaralarını kapatılarak ayrı ayrı kafeslerine alınmıştır normal yem ve %10 (w/v) dekstroz içeren su verilerek 10 gün boyunca yaraların fotoğrafları çekilmiştir. Diyabetik durumlarının korunabilmesi için 10 gün boyunca şekerli su verilmiştir. Yaraların 4.gününde ve 10.gününde şekerleri tekrardan ölçülmüştür. Elde edilen sonuçlarla diyabetik durumlarını koruduğu anlaşılmıştır. Çizelge 4.9’da 4.gününde ve 10.gündeki ağırlıkları ve şeker düzeyleri sunulmuştur.

Çizelge 4-9 Yara iyileşmesinin 4. ve 10.gününde şeker düzeyleri

Sıçan	4.GÜN		10.GÜN	
	Ağırlık(g)	Kan Şekeri (mg/dl)	Ağırlık (g)	Kan Şekeri (mg/dl)
1	240	481	255	575
2	254,5	H1	260	H1
3	327,5	H1	328,5	H1
7	405	363	397,5	300

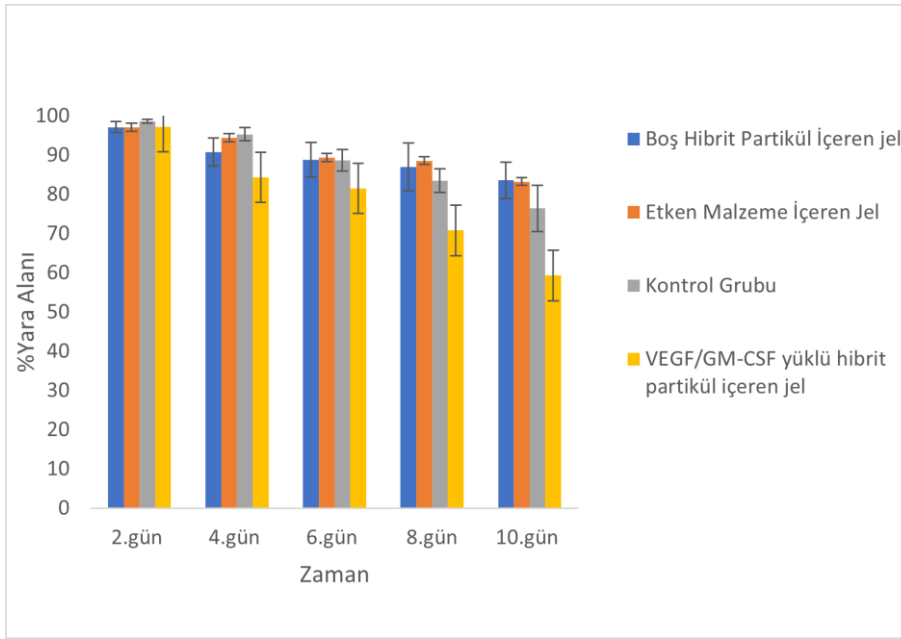
Çizelge 4.9 ‘da gösterilen tablo incelendiğinde yara iyileşmesinin 4.ve 10.gününde şeker düzeyleri 300 mg/dl ve üzerinde olduğu görülmektedir ve 4. ve 10.günde de diyabet durumlarını koruduğu anlaşılmaktadır. 2 ve 3 numaralı hayvanın kan şekeri değeri cihazda H1 olarak okunmuştur. Şekerlerinin 600 mg/dl üzerinde olduğu cihazın kullanma kılavuzunda tespit edilmiştir. Şeker düzeylerinin yüksek olmasına bağlı olarak sürekli su içme ihtiyacı ve sık idrar yapma durumu devam etmiştir.

4.6.2 Yara Bölgesinin Makroskopik Olarak Değerlendirilmesi

Yaraları kapatılan sıçanlarının belirli gündeki fotoğrafları çekilerek ayrı ayrı kafeslerine alınmıştır. 1 numara, 2 numara, 3 numara, 6 numara,7 numara ve 9 numara olmak üzere 6 hayvanın 10 gün boyunca yaraları gözlemlenmiş ve yaraların boyutların ölçülebilmesi için fotoğrafları çekilmiştir. Elde edilen fotoğraf ve bulgular bu bölümde detaylı olarak anlatılmıştır. 10 gün sürdürülen deney grupları için elde edilen % yara alanı değerleri ise çizelge 4.10 ve Şekil 4.55’de gösterilmiştir

Çizelge 4-10 10 günde sonlandırılan deney gruplarına ait % yara alanı değerleri

Deney Grubu	%Yara Alanı				
	2. Gün	4.Gün	6. Gün	8.Gün	10.gün
Kontrol Grubu	98,61±1,36	95,31±1,63	88,64±2,76	83,45±2,998	76,41±5,90
Etken Malzeme İçeren Jel	97,08±0,87	94,43±1,37	89,37±5,57	88,55±5,39	83,24±2,67
Boş Hibrit Partikül İçeren jel	97,12±1,36	90,81±3,57	88,78±4,38	86,96±6,1	83,54±4,5
VEGF/GM-CSF yüklü hibrit partikül içeren jel	97,23±0,5	84,30±1,35	81,50±0,75	70,80±7	59,28±8















Şekil 4-55 10 günde sonlandırılan in vivo deney gruplarında farklı jel gruplarının yara alanı üzerine etkileri

10 gün boyunca devam ettirilen in vivo deney sonuçları grupların 2.gün, 4.gün, 6.gün, 8.gün ve 10.gün % yara alanları karşılaştırılarak incelenmiştir. Kontrol grubu jel enjekte edilen gruplar karşılaştırıldığında, ‘Etken malzeme içeren jel’, ‘Boş hibrit partikül içeren jel’ grubu ve ‘VEGF/GM-CSF yüklü hibrit partikül içeren jel’ grupların yara alanlarının azaldığı gözlenmiştir. (Tablo 4.10 ve Şekil 4.55). Sonuçlara göre pluronik F127 jelinin yara iyileştirmede etkisinin olduğu kanıtlanmıştır. Literatür incelendiğinde pluronığın yaralar üzerine etkisinin araştırıldığı çalışma ile karşılaştırılmıştır [171]. Çalışmada yara













bölgesinde enjekte edilen PBS ve %25 (w/v) F127 jel karşılaştırıldığında jel içeren grubun yarayı daha hızlı iyileştirdiğini kanıtlamışlardır. Kontrol grubunda ise %yara alanı %76,41'dir. Aradaki bu farkın yaranın sırt bölgesinde bulunduğu konumuna bağlı olduğu düşünülmektedir. Konum olarak sırt sağ alt kısmında bulunmakta ve sıçanın ulaşabildiği konumdadır. Bazı hayvanlar kontrol grubu olan yara bölgesine ulaşarak yaranın şeklini bozmuştur. VEGF/GM-CSF yüklü hibrit partikül içeren jelin 10.günde %yara alanı %59,28 olarak hesaplanmıştır. Aradaki bu fark VEGF/GM-CSF'nin partikül içerisine kapsüllenmesinin yara iyileştirici etkisinin önemli derecede geliştirdiğini göstermiştir.

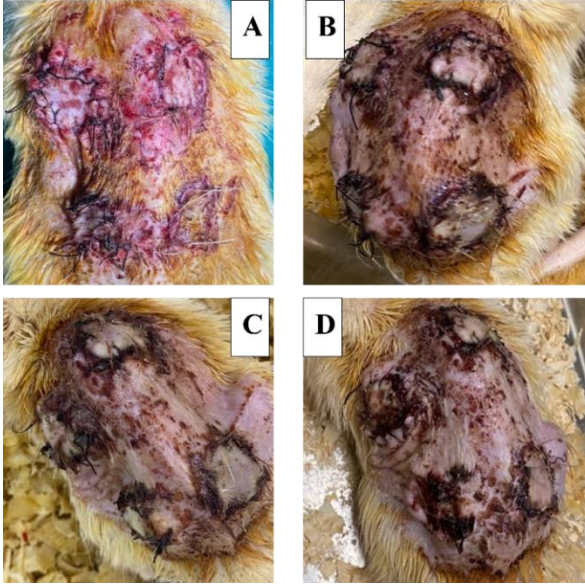
Çizelge 4.11'de yara gruplarının 0.gün, 2.gün ve 4.gün yara alanı görüntüleri sunulmuştur. Görüntüler incelendiğinde her bir yaranın yüzeyinin koyu renk olduğu ve koyu bir tabaka meydana geldiği görülmüştür. VEGF/GM-CSF yüklü LPN içeren jel verilen yaranın 4.gününde dikişi attığı dikkati çekmiştir. Sıçanın o yaraya ulaşmasıyla dikişlerini kemirdiği düşünülmüştür. Yara gruplarının 6.8. ve 10.gündeki yara alanlarının görüntüleri Çizelge 4.12'de gösterilmiştir Görüntüler incelendiğinde her bir grupta kabuklanmanın arttığı göze çarpmaktadır. Tez çalışması için önemli olan VEGF/GM-CSF yüklü LPN içeren jel enjekte edilen yarada doku greftinin küçük bir parçasının kaldığı görülmektedir. Diğer yara gruplarına göre yara alanında gözle görülebilir bir küçülme meydana gelmiştir. Aradaki bu fark VEGF/GM-CSF'nin partikül içerisine kapsüllenmesinin yara iyileştirici etkisinin önemli derecede geliştirdiğini göstermektedir. Şekil 56-66 arasında deneklerin üzerindeki yaraların makroskopik görüntüleri detaylı incelenmiş ve bulgular belirtilmiştir.

Çizelge 4-11 Yara gruplarının ilk gün 2. ve 4.gündeki yara iyileşmesi

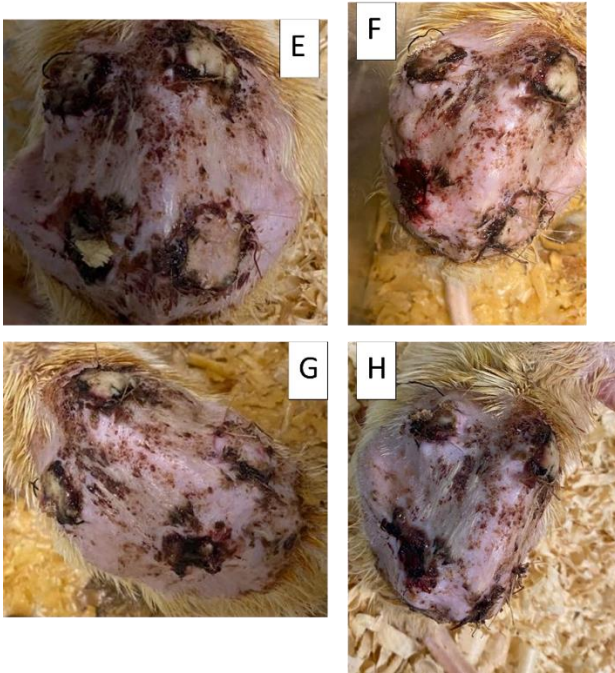
YARA	0.Gün	2.gün	4.gün
Kontrol Grubu			
VEGF/GM-CSF içeren Jel			
Boş LPN içeren Jel			
VEGF/GM-CSF yüklü LPN içeren jel			

Çizelge 4-12 Yara gruplarının 6.gün 8. ve 10.gündeki yara iyileşmesi

YARA	6.gün	8.gün	10.gün
Kontrol Grubu			
VEGF/GM-CSF içeren Jel			
Boş LPN içeren Jel			
VEGF/GM-CSF yüklü LPN içeren jel			



Şekil 4-56 1 numaralı sıçanın A) 0.gün B) 2.gün C) 4.gün D) 6.gün yara iyileşmesi

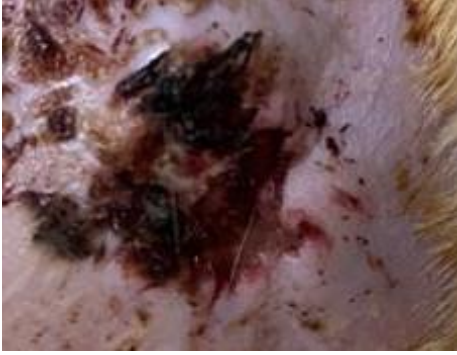


Şekil 4-57 1 numaralı sıçanın E) 7.gün F) 8.gün G) 9.gün H) 10.gün yara iyileşmesi

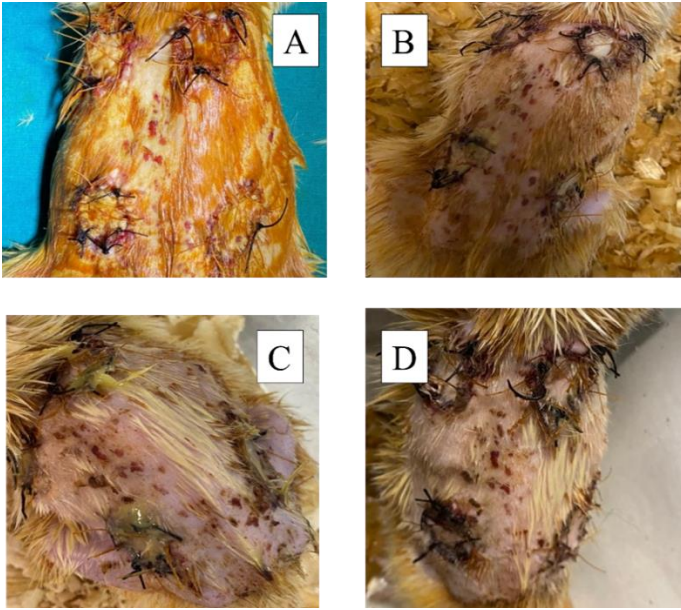
1 numaralı sıçanın farklı günlerde yaralarının fotoğrafları şekil 4.56 ve 4.57'de gösterilmiştir. Görseller incelendiğinde hayvanın 0.günde deri yapısının çok iyi olmadığı görülmüştür. Yaraların görüntüleri net değildir.

Diyabet hastalığının neden olduğu kilo kaybından dolayı deri yapısı bozulmuştur. Yara iyileşmesinin 2.gününde yaralar ve dikiş yerleri belirgin hale gelmiştir. Yara çevresinde koyu izler oluşmuştur. Fakat yara iyileşmesinin 6.gününde yaraların çevresindeki koyu çizgiler artmıştır ve sol alt kısmındaki dikilen deri parçasının dikişleri açılmıştır. Sol alt

kısımda bulunan yaralara VEGF/GM-CSF yüklü polimer-lipit hibrit partikülü içeren jel enjekte edilmiştir. Hayvanın o bölgedeki yaraya ulaşım kemirerek dikişlerini aldığı düşünülmüştür. Şekil 4.58 incelendiğinde 8.günde dikişi açılan yaranın kanadığı ve 10.günde yaranın gözle görülebilir şekilde küçüldüğü görülmüştür.

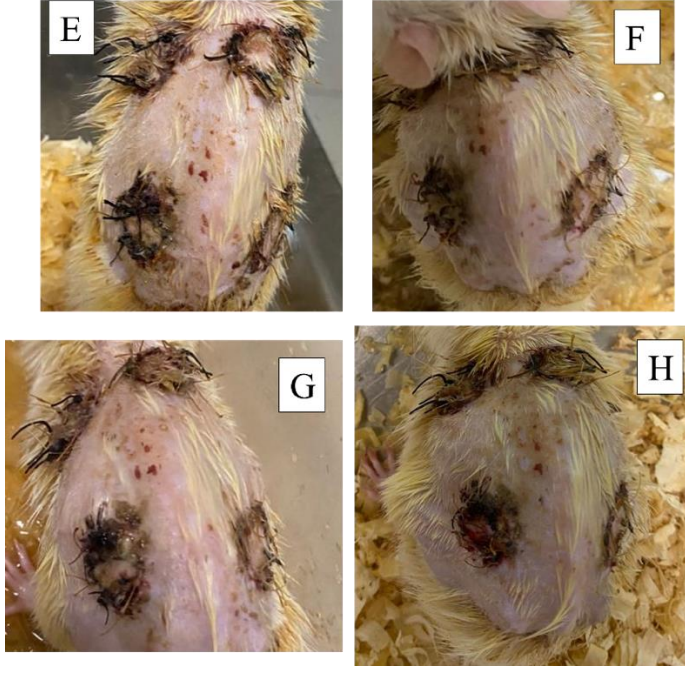


Şekil 4-58 1 numaralı sıçanın 6.günde kanamanın olduğu yara



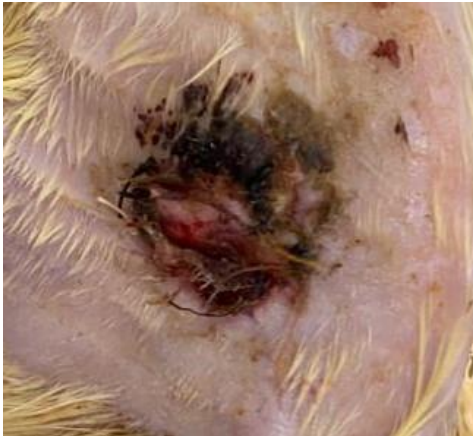
Şekil 4-59 2 numaralı sıçanın A) 0.gün B) 2.gün C) 4.gün D) 6.gün yara iyileşmesi

Şekil 4.59 ve şekil 4.60'da 2 numaralı sıçanın belirli günlerdeki yara iyileşme fotoğrafları yer almaktadır. Yara iyileşmesinin 2.gününde yaraların çevresinde hafif kararmalar meydana geldiği görülmüştür. 4. Gününde yaranın kurumaması ve enfeksiyon kapmaması için antibiyotik krem sürülmüştür. 6.gününde yara bölgelerinde tüyler çıkmaya başlamıştır. Yara çevrelerinin koyulaşmaya başladığı ve kabuklanma olduğu göze çarpmıştır.

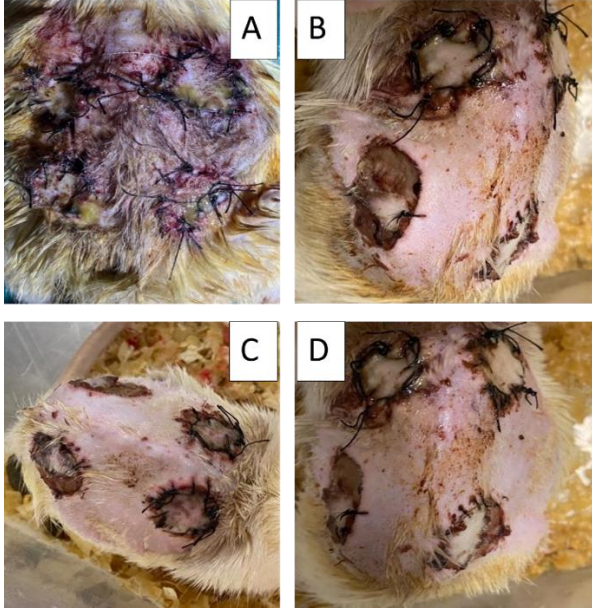


Şekil 4-60 2 numaralı sıçanın E) 7.gün F) 8.gün G) 9.gün H) 10.gün yara iyileşmesi

Yukarıda şekil 4.60'de 2 numaralı sıçanın 7.gün, 8.gün, 9.gün ve 10.gündeki yara iyileşme fotoğrafları sunulmuştur. Fotoğraflar teker teker incelendiğinde sağ alt kısımda bulunan kontrol grubu yarada herhangi bir farklılık göze çarpmamıştır. Yara alanı ve yara bölgesindeki kabuklanma kalınlığında herhangi bir farklılık bulunmamıştır. Diğer grup yaralarda kabuklanma artmıştır. 10.günde sol altta bulunan yarada dikilen derinin bir kısmının olmadığı ve kanamanın olduğu görülmüştür. (Şekil 4.61)

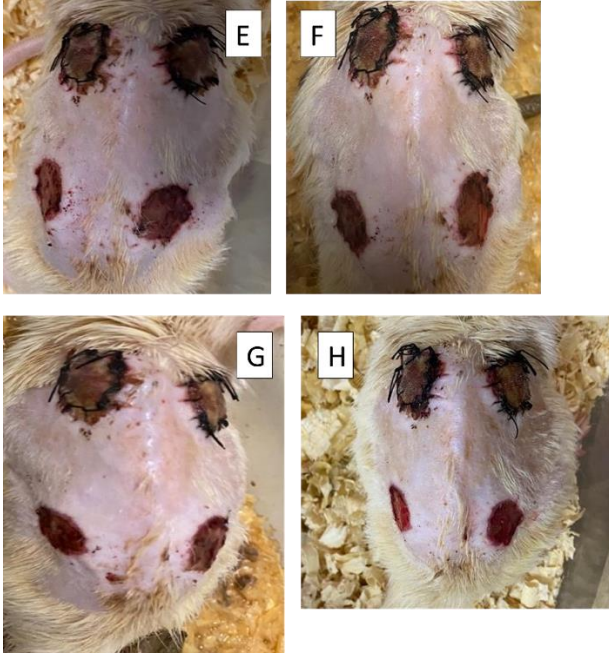


Şekil 4-61 2 numaralı sıçanın 10.günde kanamanın olduğu yara

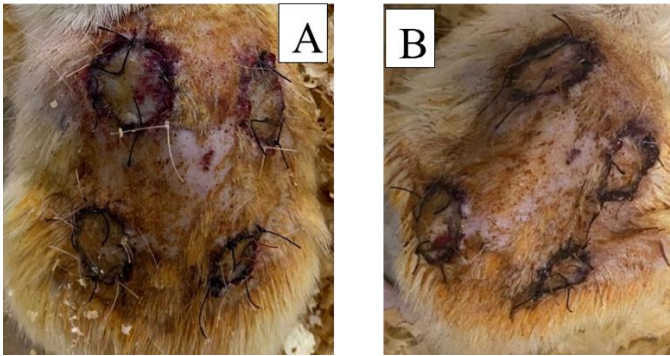


Şekil 4-62 3 numaralı sıçanın A) 0.gün B) 2.gün C) 4.gün D) 6.gün yara iyileşmesi

Şekil 4.62 ve şekil 4.63’de 3 numaralı sıçanın 0.günden 10.güne elde edilen yara iyileşmesi fotoğrafları gösterilmiştir. Fotoğraf incelendiğinde 2. ve 4.günlerde sırtın üst kısmında bulunan yaralarda herhangi bir değişiklik gözlemlenmezken alt kısımdaki yaralarda deri greftinin dikiş yerlerinden açıldığı ve küçük bir kısmının kaldığı görülmüştür. Yaralar açık hale gelmiştir. Şekil 62’de yaralar incelendiğinde üst kısımdaki yaralarda kabuklanmanın meydana geldiği görülmüş ve koyu renk haline gelmiştir. 9.ve 10. günde deri greftinde hiçbir parça kalmamıştır. Açık yaraların çaplarında küçülme görülmüştür.



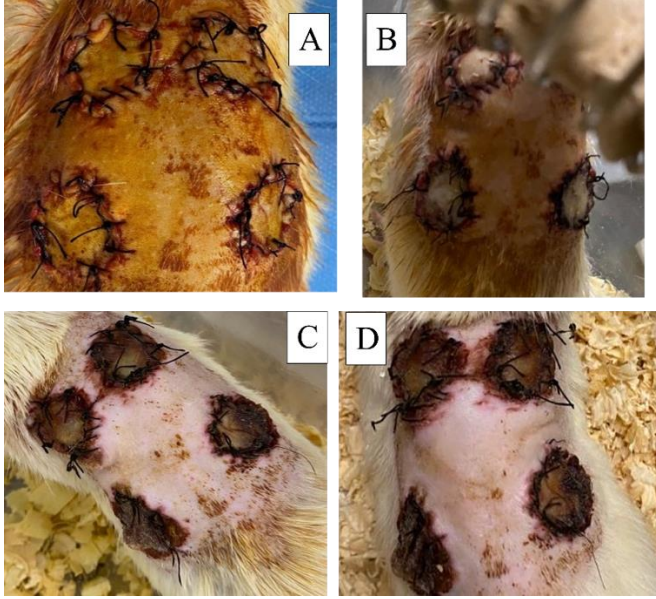
Şekil 4-63 3 numaralı sıçan E) 7.gün F) 8.gün G) 9.gün H) 10.gün yara iyileşmesi



Şekil 4-64 6 numaralı sıçan A) 0.gün B) 1.gün yara iyileşmesi

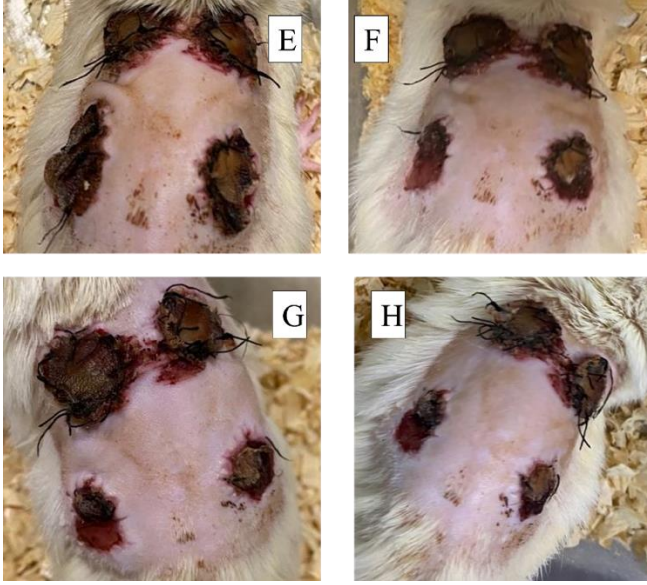
4 numara anestezi sırasında öldüğü için 6 numaralı sıçanda yara oluşturulup deneye devam edilmiştir. Operasyon sonrası 0.günde fotoğrafı çekilip ayrı kafesine konulmuştur. Ertesi gün kontrole gidildiğinde hayvanın anesteziden uyandığı görülmüştür. 1.gün yara iyileşmesinin fotoğrafları çekilmiştir (Şekil 4.64). 2.gün kontrolle gidildiğinde kafesinde ölü olarak bulunmuştur. Ölü vücudu kafesinden alınıp -80°C 'deki dolaba kaldırılmıştır. 6 numara deney takibinden çıkarılmıştır. Ölüm nedeninin şiddetli hiperglisemiden kaynaklı

olduğu düşünölmüştür. 1 gün takip edilebildiği için yara iyileşmesinde belirgin farklılık görölmemiştir.



Şekil 4-65 7 numaralı sıçan A) 0.gün B) 2.gün C) 4.gün D) 6.gün yara iyileşmesi

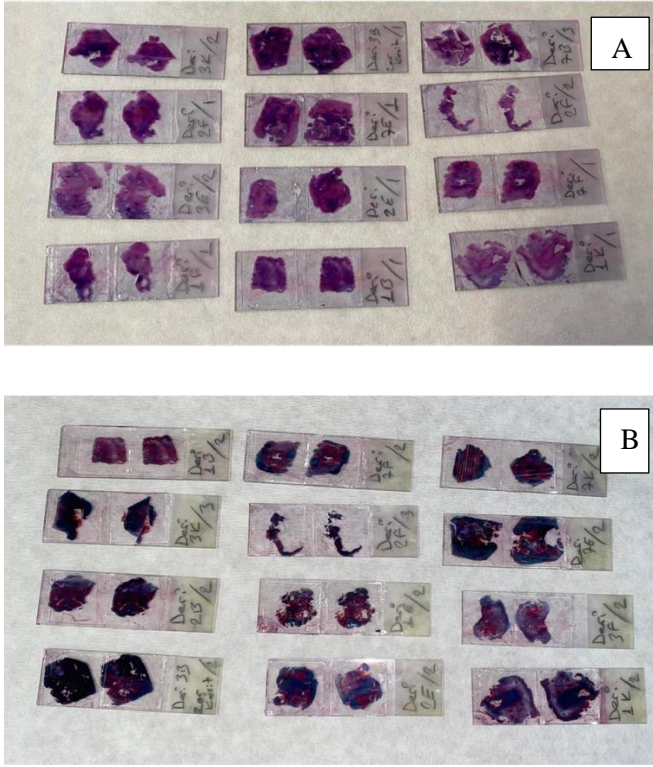
7 numaralı denek diğer denekler arasında en iri denek olmuştur. Belirli günlerdeki yara iyileşme fotoğrafları şekil 4.65 ve şekil 4.66’da değerlendirmek amacıyla sunulmuştur. 0.günde deri yüzeyi daha iyi görölmektedir. Diğer sıçanlara göre yaraların kabuklanma süresi hızlı olmuştur. 4. Günde yaraların bütün yüzeyi koyu renk olmuş ve kabuklanmıştır. Fakat 4.günde sol alt yaranın dikişinde açılma fark edilmiştir. Şekil 4.65’de 7-10.günler incelendiğinde dikişleri açılmayan üst kısımdaki yaraların kabuklanmaları devam etmiştir. 7.günde sağ alttaki yaranın dikişi açılmıştır. Alt taraftaki soldaki ve sağdaki yaralarda deri greftinin yarısı ayrılmıştır. Bir kısmı açık yara haline gelmiştir. 9.ve 10.günlerde yara çaplarında küçölme farkedilmiştir.



Şekil 4-66 7 numaralı hayvanın E) 7.gün F) 8.gün G) 9.gün H) 10.gün yara iyileşmesi

9 numaralı sıçan anestezi sonrasında uyanamamıştır. Deneyden çıkarılmış yara takibine devam edilememiştir.

10.günün sonunda elde edilen yara alanlarının değerlendirildiği bu sonuçlar sadece yara epitelizasyonunun onarımı göstermesi nedeni ile yaranın iyileşme hızının değerlendirilmesi tartışılmalıdır. Yara iyileşmesi farklı fazlardan oluştuğu ve epitelizasyonun sadece epidermisin üst tabakası hakkında bilgi verdiği bilinmektedir [251]. Bu amaçla tasarlanan çok fonksiyonlu hidrojelin yara iyileşmesinin farklı fazlarda etkisinin incelenebilmesi için deneklerin yara bölgesinden alınan doku örneklerine hematoksilin-eozin (H&E) boyamalar yapılmıştır (Şekil 4.67). Boyamalarda elde edilen bulgular histomorfometri başlığı altında sunulmuştur.

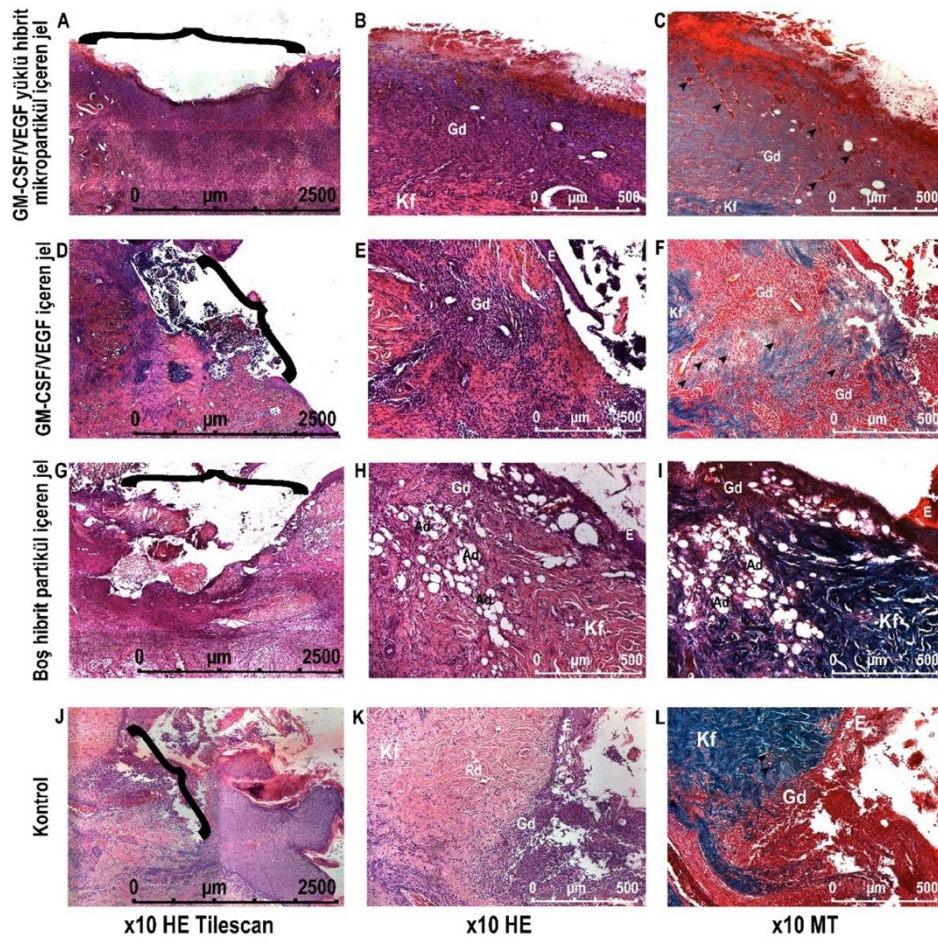


Şekil 4-67 Dokuların Boyanması, A) Hematoksilen ve eozin (H&E) B) Masson's Trichrome

4.6.3 Histomorfometri

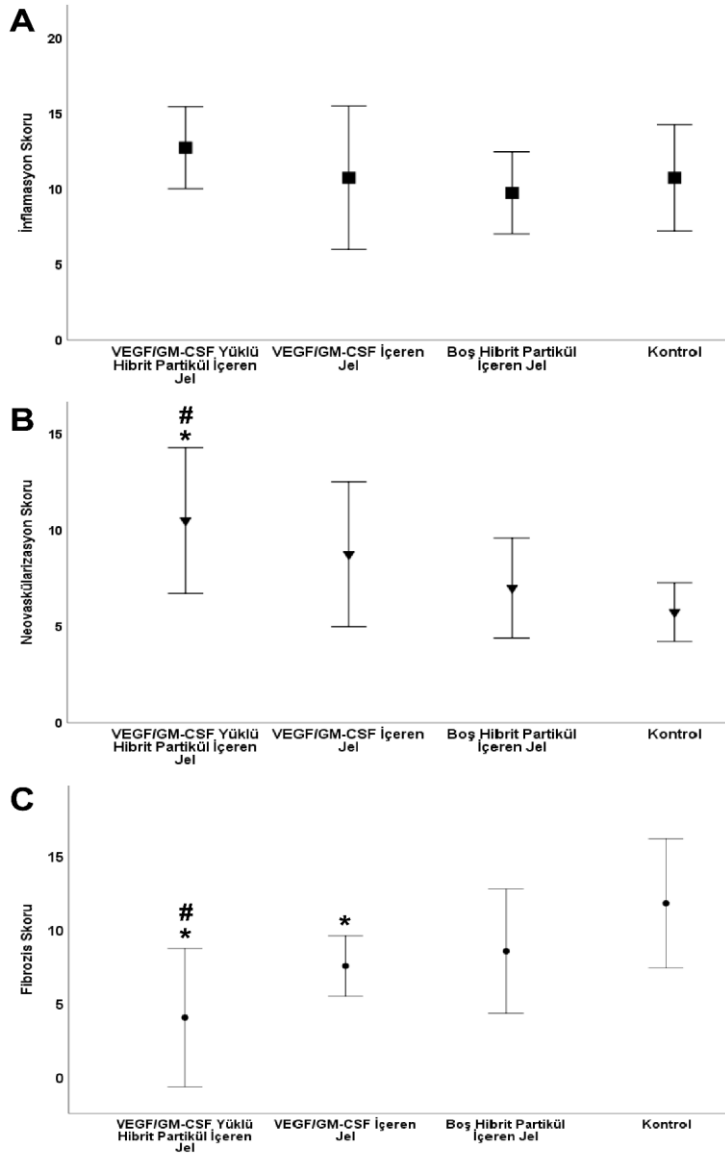
Deney ve kontrol gruplarından 10. günde elde edilen kesitlerde hiçbir grupta yarannın tümüyle epitelize olmadığı saptanmıştır (Şekil 4.67 A, D, G, J). GM-CSF/VEGF yüklü hibrit mikropartikül içeren jel uygulanan grupta (Şekil 4.67 A, B, C) neovaskülarizasyon derecesi kontrol (Şekil 4.67 J, K, L) ve boş hibrit partikül içeren jel (Şekil 4.67 G, H, I) uygulanan gruba göre istatistiksel olarak anlamlı yüksek saptanmıştır (Şekil 4.68). Bu durum GM-CSF/VEGF yüklü hibrit mikropartiküllerin damarlanmayı tüm diğer gruplara göre daha fazla arttırdığını göstermiştir. Diyabetli hastalarda yüksek açlık şekeri miktarı hücrelerin enerji için kullanma yetilerini azaltır. Bunun yanısıra diyabet angiopatik etkisi nedeni ile dokuların ihtiyacı olan oksijenin taşınmasında kısıtlayıcı etki oluşturmaktadır. Sonuçta özellikle uç bölgelerde iskemi ve buna bağlı diyabetik yaralar gelişmektedir. Birim alandaki açık ve yeterli kalibrasyonda damar sayısı azalmaktadır. Bu nedenle diyabetik yaraların iyileşmesi için yara bölgesindeki patent damar sayısının artması önem arz etmektedir. Çalışmamızın verileri literatür ile uyumlu olarak -partiküllerden VEGF salınması- damarlanmadaki artışın nedeni olarak yorumlanmıştır [252]. Aynı zamanda diyabetin neden olduğu kronik yaralardaki inflamasyon yanıtı yetersiz kalmaktadır. Bu

nedence yara iyileşmesinin inflamatuvar fazının desteklenmesi, inflamasyon düzeyinin artırılması bir başka deyişle yara iyileşmesine destek verilmesi önemli bir adımdır. Bu çalışmanın diğere önemli bir öngörüsü bu basamaktadır. Bu bakış açısı ile sonuçlar değerlendirildiğinde GM-CSF/VEGF yüklü hibrit mikropartikül içeren jel ve tek başına GM-CSF/VEGF içeren jel (Şekil 4.67 D, E, F) uygulanan gruplarda fibrozis derecesi kontrol grubuna göre (istatistiksel anlamlı) düşük saptanmıştır (Şekil 4.68 C). Fibrozisteki azalmayı inflamasyonda artış izlemektedir. Bu verilere göre, GM-CSF/VEGF'in mikropartikül ya da jel ile uygulandığında (kontrol grubunun verilerine göre) fibrotik doku oluşumunu azaltma potansiyeli olduğu şeklinde yorumlanmıştır. Deney ve kontrol grupları arasında inflamasyon derecesi açısından istatistiksel anlamlılık saptanmamıştır (Şekil 4.68 A). GM-CSF/VEGF yüklü hibrit mikropartikül içeren jel grubunda 10. günde yara derinliğinin azaldığı ve yara alanını damardan zengin, matür granülasyon dokusu ile dolduğı dikkati çekmiştir (Şekil 4.67 A-C).



Şekil 4-68 Birinci kolonda (A, D, G, J) yara alanının (parantez) tile scan görüntüleri, ikinci kolonda (B, E, H, K) yara kenarındaki pembe renkli granülasyon dokusu (Gd),

damarlar (ok işareti) ve üçüncü kolonda (C, F, I, L) komşu retiküler dermisteki (Rd) mavi renkli kollajen fibriller (Kf) izlenmektedir. C ve F’de damarlanmış (ok) granülasyon dokusunun I ve L’de yerini yağ infiltrasyonu (Ad) ve kollajen fibrillerin baskınlığındaki fibrotik dokuya bıraktığına dikkat ediniz. HE: Hematoksilen-Eozin, MT: Masson Trikrom. x100.



Şekil 4-69 Kontrol grubu ile GM-CSF/VEGF yüklü hibrit mikropartikül içeren jel, tek başına GM-CSF/VEGF içeren jel ve boş hibrit partikül içeren jel uygulanan gruplarda inflamasyon (A), neovaskülarizasyon (B) ve fibrozis (C) skorlarına ait ortalama-standart sapma grafikleridir. (*): kontrole göre $p < 0.05$, (#): Boş hibrit partikül içeren jel grubuna göre $p < 0.05$.

Tez çalışmamızdaki hipotezimiz, yara bölgesinde GM-CSF ve VEGF 'in kontrollü ve sıralı salımlarını gerçekleştirerek yara iyileşmesinin farklı fazlarını etkileyerek diyabetli deneklerdeki yara iyileştirmelerini karşılamaktır. Bu amaçla hibrit partikül içeren jelden ilk önce GM-CSF salımı gerçekleşecek, yara bölgesinde inflamasyon fazında rol oynayan hücreleri aktive ederek fazın tamamlanmasını sağlayacağı öngörülmüştür. Ardından hibrit partiküllerden ve jelden VEGF 'nin salınması ile (anjiojenesis) damar oluşumunu artırarak doku perfuzyonunu düzeltme, sonuçta iyileşmenin düzgün bir şekilde gerçekleşmesi beklenilmektedir. Histomorfometri sonuçları tez çalışmasındaki hipotezi doğrular niteliktedir: Şekil 4.69 skor grafiklerinde GM-CSF/VEGF yüklü hibrit partiküllerin olduğu yara bölgesinde diğer gruplara göre inflamasyon skorunun yüksek olduğu görülmüştür buna bağlı olarak fibrotik skorda düşüş meydana gelmiştir. Bu verilerden inflamasyon fazının düzgün bir şekilde gerçekleştiği kanaatine varılmıştır. Aynı şekil üzerinden neovaskülarizasyon skoru tartışıldığında ise GM-CSF/VEGF yüklü hibrit partiküllerin olduğu yara bölgesinde diğer gruplara göre neovaskülarizasyon artışı görülmektedir. Böylelikle GM-CSF/VEGF yüklü hibrit partikül içeren hidrojelin bölgede inflamasyonu artırarak ve ardından taşıyıcı sistemdeki VEGF ile damarlanmayı sağlayarak yaraların iyileşme hızlarını etkilediğini söylemek mümkündür.

Çalışma zor iyileşen ve kronik yara grubunda değerlendirilen, toplumda morbidite - mortalite artışı ile seyreden diyabetik yaraların tedavisine yeni bir bakış açısı ile sorgulamayı sağlamıştır. Denek sayısının az olması takip süresinin tek zaman dilimini kapsamaması bu çalışmanın zayıf kısmını oluşturmaktadır. Ancak deneklerde diyabetin oluşturulması ve onların yaşatılmasındaki güçlükler bu çalışmalardaki hendikapları oluşturmaktadır. Bu araştırmanın *invivo* basamağı pilot çalışma özelliğindedir. Daha çok denekte ve farklı zaman dilimlerini de kapsayacak şekilde bir üst filogenetik grup deneklerde tekrarlanmasında yarar olduğu kanaatindeyiz.

5 YORUM

Yara iyileşmesi birbiri içine geçmiş sıralı fazlar şeklinde ilerlemektedir. Sorunsuz bir yara iyileşmesi hemostaz, inflamasyon, proliferasyon basamakları ile ortalama 21 günde tamamlanır. Remodeling fazı ise çok uzun süren en son basamaktır. Fakat yaraların iyileşme sürecinde bazı istenmeyen durumlar ile karşılaşmaktadır. Diyabet gibi bazı metabolik hastalıklar bu etmenlerden sadece birisidir. Diyabetli kişilerde meydana gelen yaralar iyileşmesi zor, kronik yaralar kategorisine girmektedir. Diyabetik yaralarda normal yara iyileşme fazları sorunsuz bir şekilde ilerlememektedir. Diyabet hastalığı bütün vücudu, hücreleri, dokuları etkileyen bir hastalıktır. Yara bölgesinde hücreleri ve dokuları etkilediği için iyileşme tamamlanamamaktadır. Bu yaraların tedavileri oldukça güçtür ve bir dizi tedavi yöntemleri uygulanmaktadır. Bu amaç doğrultusunda diyabetin neden olduğu iyileşmesi zor kronik yaraların iyileşmesini hızlandırmak amacıyla iyileşmenin farklı fazlarında etkin rol oynayacak, uygun geometri ve boyut özelliklerine sahip farklı molekül ağırlıklarına sahip büyüme faktörlerini (GM-CSF 14 kDa) (VEGF Mw 44 kDa) eş zamanlı olarak kapsülleyebilecek ve kontrollü bir şekilde sıralı salabilecek partikülleri içeren, biyouyumlu ve güvenilir, çok fonksiyonlu, sıcaklığa duyarlı enjekte edilebilir hidrojel sisteminin geliştirilmesi ve kullanım potansiyelinin bir ön çalışma olarak diyabetik sıçan yaralarında incelenmesi hedeflenmiştir. Bu tez çalışması ile,

- Polimerik, PCL/Lesitin monolit partiküller ve PCL/Lesitin/Geleol polimer-lipit hibrit partiküller çift emülsiyon (W/O/W) çözücü buharlaştırma yöntemi kullanılarak elde edilmiştir.
- PCL/Lesitin monolit ve polimer-lipit hibrit partiküllerin hazırlanma sırasında çözücü, surfaktan ve emülsifiye edici ajan parametreleri incelenmiştir.
- Hazırlanan partiküllerin boyut ve boyut dağılımları, morfolojileri, atomik kuvvet mikroskobu, taramalı elektron mikroskobu ve dinamik ışık saçınımı cihazları ile analiz edilerek incelenmiştir. Polimer-lipit hibrit partiküllerin yüzey yüklerinin analizlenmesi için zeta potansiyel ölçümleri yapılmıştır.
- İn vitro alım-salım çalışmalarında model proteinler ile çalışılmıştır. VEGF (Mw 44 kDa)'e model olarak BSA (Mw 60 kDa), GM-CSF (Mw 14 kDa)'e model olarak lizozim (Mw 14 kDa) proteinleri benzer fizikokimyasal özellikleri göstermeleri nedeniyle tercih edilmiştir.

- Alım-salım çalışmalarında polimerik PCL partiküllerin yüksek dereceli hidrofobik doğası gereği yüksek oranda suda çözünen BSA ve lizozim proteinini kapsüllemediği kanıtlanmıştır. Salım deneyleri gerçekleştirilememiştir. Proteinlerin partikül içerisine kapsüllemesini sağlamak amacıyla ortamın hidrofobikliğini azaltmak için PCL/Lesitin monolit partikülleri hazırlanmıştır.
- PCL/Lesitin monolit partiküllerin alım-salım çalışmalarında BSA'yı kapsülleme yeteneği incelenmiştir. Sentez ortamının hidrofilikliğini arttırmak için farklı oranlarda (100 mg, 200 mg, 500 mg) lesitin ile çalışılmıştır. Monolit partiküllerin BSA'yı kapsülleme yeteneği eşitlik II kullanılarak hesaplanmıştır. Partiküllerin içerisinde BSA'nın varlığını kanıtlamak amacıyla FTIR analizleri gerçekleştirilmiştir. FTIR analizleri ile PCL/Lesitin monolit partiküllerin içerisinde BSA varlığı kanıtlanmıştır.
- PCL/Lesitin/Geleol polimer-lipit hibrit partiküllerin BSA'yı yaklaşık %65±5 kapsüllediği, lizozimi ise %77±10 kapsüllediği alım-salım çalışmaları ile kanıtlanmıştır. İn vitro salımları sonucunda 21 gün boyunca BSA ve Lizozim salımının gerçekleştirdiği zamana karşı %ilaç salım grafikleri ile gösterilmiştir.
- Elde edilen sonuçlara göre BSA ve Lizozim'in eş zamanlı olarak kapsüllemesini ve kontrollü salımları gerçekleştirilmesi amacıyla en uygun partikül sisteminin polimer-lipit hibrit partikül ile olduğu belirlenmiştir. Çalışmanın bu kısmında iki model proteinin eş zamanlı olarak yüklendiği BSA/Lizozim yüklü PCL/Lesitin/Geleol polimer-lipit hibrit partiküller hazırlanmıştır. Karakterizasyon ve alım-salım çalışmaları gerçekleştirilmiştir. SDS-PAGE analizi ile farklı molekül ağırlığındaki proteinlerin salım davranışı incelenmiştir. Elde edilen sonuçlara göre proteinlerin 21 gün boyunca stabilitelelerini koruyarak molekül ağırlıklarına göre salımlarının gerçekleştirildiği anlaşılmıştır.
- Polimer-lipit hibrit partiküllerin yara bölgesine topikal olarak uygulanması için %25 (w/v) pluronik F127 konsantrasyonunda, sıcaklığa duyarlı enjekte edilebilir hidrojel, soğuk yöntem ile hazırlanmıştır. Karakterizasyon testleri ile +4°C'de akışkan halinde olduğu +37 °C'de (vücut sıcaklığı) viskozitesi artarak jel haline geldiği ispatlanmıştır. Jelleşme süresinin ise 5 dk gibi kısa bir sürede gerçekleştiği ters cam şişe testiyle gösterilmiştir. Jel tükenme hızı incelendiğinde 1.5 ml'lik jelin 1 günde tükendiği gözlemlenmiştir.

- %25 (w/v) pluronik F127 jelin in vitro salım çalışmaları, jelin içerisine BSA yüklü, Lizozim yüklü ve BSA/Lizozim yüklü polimer -lipit hibrit partikülleri ayrı ayrı yüklenmesiyle gerçekleştirilmiştir. Elde edilen sonuçlar ile polimer-lipit hibrit partiküllerde gözlenen patlama salımının azaldığı ve daha kontrollü salımın elde edildiği gözlemlenmiştir. Elde edilen veriler ile hibrit partiküllerde lizozimin salımının ilk önce, BSA salımının daha sonra (lizozimi takip ederek) gerçekleştiği gözlenmiştir. Böylelikle hibrit partiküllerden farklı molekül ağırlıklı proteinlerin istenildiği gibi salımı sıralı bir şekilde gerçekleştiği saptanmıştır.
- Model proteinlerle partiküllerin ve jelin karakterizasyon çalışmaları tamamlandıktan sonra yara iyileşmesinin farklı fazlarında rol oynayacak VEGF ve GM-CSF 'nin polimer-lipit hibrit partiküller içerisine yüklenerek VEGF/GM-CSF yüklü polimer-lipit hibrit partiküller hazırlanmıştır. Hazırlanan hibrit partiküller jel içerisine eklenmiştir.
- Sıcaklığa duyarlı enjekte edilebilir jel sisteminin diyabetik yaralarda etkisinin incelenmesi amacıyla ön çalışma olarak in vivo çalışmalar sonucunda yara alanlarının küçüldüğü matematiksel verilerle ispat edilmiştir.
- Histolojik bulgular ile GM-CSF/VEGF yüklü hibrit partikülleri içeren jel grubunda 10.günde yara derinliğinin azaldığı ve inflamasyon fazının arttığı buna bağlı olarak da fibrotik skar dokusunda azalma meydana geldiği, aynı zamanda yara alanının damardan zengin, matür granülasyon dokusunun oluştuğu kanıtlanmıştır.
- Elde edilen bulgular ile tasarlanan ve karakterize edilen hibrit partiküllerden yara bölgesine ilk GM-CSF'nin ulaştığı, inflamasyon fazını başlattığı ve ardından VEGF'in ulaşarak damarlanma sayısının arttırdığı ve dolayısıyla yaraların iyileşme hızını arttırması, tez çalışmasındaki hipotezimizi doğrulamaktadır. Kullanılan salım sistemi özgün değere sahiptir. GM-CSF/VEGF kombinasyonu da yenidir ve özgündür.

Bu tez çalışmasında sonuç olarak iyileşmesi zor olan yaralar için farklı büyüme faktörleri kullanılarak, polimer-lipitler ve F127 jel ile fonksiyonlandırılmış, yara iyileşmesinin birçok aşamasında rol oynayan yeni bir taşıyıcı sistem tasarlanmış ve yeni bir büyüme faktör kombinasyonu oluşturularak kronik yaraların iyileşmesinde test edilmiştir. Fakat tez çalışmasının in vivo basamağında kullanılan denek sayısı yeterli değildir. Bu çalışma pilot çalışma özelliğindedir. Kuvvetli veriler elde

edebilmek adına daha fazla sayıda denek ve farklı filogenetik yapıdaki denekler üzerinde de çalışılması uygun olacaktır.

6 KAYNAKLAR

- [1] Değim, Z., Use of microparticulate systems to accelerate skin wound healing. *Journal of drug targeting*, **2008**. 16(6): p. 437-448.
- [2] Shamloo, A., et al., Accelerated full-thickness wound healing via sustained bFGF delivery based on a PVA/chitosan/gelatin hydrogel incorporating PCL microspheres. *International journal of pharmaceutics*, **2018**. 537(1-2): p. 278-289.
- [3] Castano, O., et al., Instructive microenvironments in skin wound healing: Biomaterials as signal releasing platforms. *Advanced drug delivery reviews*, **2018**. 129: p. 95-117.
- [4] Gence, H., Fötal Yara İyileşmesi. *Ankara Üniversitesi Tıp Fakültesi Mecmuası*, **2008**. 61(3): p. 171-179.
- [5] Arif, M.M., et al., Polymer-based biomaterials for chronic wound management: Promises and challenges. *International Journal of Pharmaceutics*, **2021**. 598: p. 120270.
- [6] Komarcević, A., The modern approach to wound treatment. *Medicinski pregled*, **2000**. 53(7-8): p. 363-368.
- [7] Singh, M.R., et al., Innovative approaches in wound healing: trajectory and advances. *Artificial cells, nanomedicine, and biotechnology*, **2013**. 41(3): p. 202-212.
- [8] Kailani, M.H., H. Jafar, and A. Awidi, Synthetic biomaterials for skin tissue engineering. *Skin Tissue Engineering and Regenerative Medicine*, eds Albanna MZ, Holmes JH, IV (Cambridge, MA: Academic Press, **2016**: p. 163-183.
- [9] Barrientos, S., et al., Growth factors and cytokines in wound healing. *Wound repair and regeneration*, **2008**. 16(5): p. 585-601.
- [10] Uzun, E., Diyabetik ratlarda topikal vasküler endotelial büyüme faktörü (VEGF) uygulamasının yara dokusundaki oksidatif olaylar üzerine etkisinin araştırılması / Investigation of the effect of topical vascular endothelial growth factor (VEGF) administration on oxidative status of wound tissue in diabetic rats, Yüksek Lisans Tezi. **2013**, Gazi Üniversitesi: Gazi Üniversitesi / Fen Bilimleri Enstitüsü p. 111.
- [11] Huang, J., et al., Tunable sequential drug delivery system based on chitosan/hyaluronic acid hydrogels and PLGA microspheres for management of

- non-healing infected wounds. *Materials Science and Engineering: C*, **2018**. 89: p. 213-222.
- [12] Vargel, I., et al., Effects of growth factors on doxorubicin-induced skin necrosis: documentation of histomorphological alterations and early treatment by GM-CSF and G-CSF. *Annals of plastic surgery*, **2002**. 49(6): p. 646-653.
- [13] Huang, G., et al., Combined application of alginate dressing and human granulocyte-macrophage colony stimulating factor promotes healing in refractory chronic skin ulcers. *Experimental and Therapeutic Medicine*, **2014**. 7(6): p. 1772-1776.
- [14] Devrim, B., et al., Lysozyme-loaded lipid-polymer hybrid nanoparticles: preparation, characterization and colloidal stability evaluation. *Drug development and industrial pharmacy*, **2016**. 42(11): p. 1865-1876.
- [15] Maibach, H.I. and G. Honari, *Applied dermatotoxicology: clinical aspects*. **2014**: Academic Press.
- [16] Celleno, L. and F. Tamburi, Structure and function of the skin, in *Nutritional Cosmetics*. **2009**, Elsevier. p. 3-45.
- [17] Fenner, J. and R. Clark, Anatomy, physiology, histology, and immunohistochemistry of human skin. *Skin tissue engineering and regenerative medicine*, **2016**. 1.
- [18] ekinci, P.D.E.U.-P.D.H.Ü.-P.D.N., *İnsan Anatomisi*. **2005**, Kayseri: Medikal Kitapevi.
- [19] Falanga, V., Bioengineered skin constructs, in *Principles of tissue engineering*. **2020**, Elsevier. p. 1331-1352.
- [20] Erdemir, N., Hypericum Perforatum Yağı Yüklendiş Polimerik Membranların Yanık Yara İyileşmesinde Skar Doku Oluşumuna Etkisinin İncelenmesi, Yüksek Lisans Tezi. **2019**, Tokat Gaziosmanpaşa Üniversitesi: Tokat. p. 109.
- [21] James, W.D., D. Elston, and T. Berger, *Andrew's diseases of the skin E-book: clinical dermatology*. **2011**: Elsevier Health Sciences.
- [22] Marks, J. and J. Miller, *Lookingbill and Marks' principles of dermatology*. Rotterdam. **2013**, New York: Elsevier.

- [23] Okur, M.E., et al., Recent trends on wound management: New therapeutic choices based on polymeric carriers. *Asian Journal of Pharmaceutical Sciences*, **2020**. 15(6): p. 661-684.
- [24] Coşkun, Ö., et al., Kronik yarada tedavi yaklaşımları. *Gülhane Tıp Dergisi*, **2016**. 58(2): p. 207-228.
- [25] Parsak, C.K., G. Sakman, and Ü. Çelik, Yara iyileşmesi, yara bakımı ve komplikasyonları. *Arşiv Kaynak Tarama Dergisi*, **2007**. 16(2): p. 145-159.
- [26] Hess, C.T., Checklist for factors affecting wound healing. *Advances in skin & wound care*, **2011**. 24(4): p. 192.
- [27] Chen, S., et al., Metal-organic frameworks for improving wound healing. *Coordination Chemistry Reviews*, **2021**. 439: p. 213929.
- [28] Gonzalez, A.C.d.O., et al., Wound healing-A literature review. *Anais brasileiros de dermatologia*, **2016**. 91: p. 614-620.
- [29] Hamdan, S., et al., Nanotechnology-driven therapeutic interventions in wound healing: potential uses and applications. *ACS central science*, **2017**. 3(3): p. 163-175.
- [30] Nurden, A.T., et al., Platelets and wound healing. *Frontiers in Bioscience-Landmark*, **2008**. 13(9): p. 3532-3548.
- [31] Dovi, J.V., A.M. Szpaderska, and L.A. DiPietro, Neutrophil function in the healing wound: adding insult to injury? *Thrombosis and haemostasis*, **2004**. 92(08): p. 275-280.
- [32] Bainbridge, P., Wound healing and the role of fibroblasts. *Journal of wound care*, **2013**. 22(8).
- [33] Sanon, S., D.A. Hart, and E.E. Tredget, Molecular and cellular biology of wound healing and skin regeneration. *Skin Tissue Engineering and Regenerative Medicine*, **2016**: p. 19-47.
- [34] Rittié, L., Cellular mechanisms of skin repair in humans and other mammals. *Journal of cell communication and signaling*, **2016**. 10(2): p. 103-120.
- [35] Eisenmann-Klein, M.Z.S.a.M., *Plastic and Reconstructive Surgery*, ed. J. Lumley. **2010**, Springer-Verlag London: Springer.

- [36] Gantwerker, E.A. and D.B. Hom, Skin: histology and physiology of wound healing. Clinics in plastic surgery, **2012**. 39(1): p. 85-97.
- [37] Kaltalıoğlu, K., Trombosit Koklenli Büyüme Faktoru'nün Yara Dokusu Oksidatif Olayları Üzerine Etkisi. **2012**, Yüksek Lisans Tezi. Gazi Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitusu.
- [38] Oztopalan, D.F., I. Recep, and A.S. Durmuş, Yara iyileşmesinde büyüme faktörleri ve sitokinlerin rolü. Dicle Üniversitesi Veteriner Fakültesi Dergisi, **2017**. 10(1): p. 83-88.
- [39] Dindar, B., Trombosit Koklenli Büyüme Faktoru (PDGF) ve Vasküler Endotelyal Büyüme Faktorunun (VEGF) Ratlarda Yara İyileşmesi Üzerine Etkisi, Yüksek Lisans Tezi. **2015**, Gazi Üniversitesi: Fen Bilimleri Enstitusu. p. 124.
- [40] Kalay, Z., Topikal EGF Uygulamasının Dorsolateral Eksizyonel Yaralarda Oksidan Olaylara Etkisi. Fen Bilimleri Enstitusu. Yüksek Lisans Tezi, Ankara: Gazi Üniversitesi, **2011**.
- [41] Baum, C.L. and C.J. Arpey, Normal cutaneous wound healing: clinical correlation with cellular and molecular events. Dermatologic surgery, **2005**. 31(6): p. 674-686.
- [42] Ferrara, N., Vascular endothelial growth factor and the regulation of angiogenesis. Recent progress in hormone research, **2000**. 55: p. 15-35; discussion 35.
- [43] Guran, Ş., T. Fen, and Y. Tunca, Anjiyogenezis ve antianjiyogenik ilaçların kanser tedavisindeki rolü. T Klin Tıp Bilimleri, **2004**. 24: p. 380-2.
- [44] Pascoe, J.R., Atlas of Small Animal Surgery (Chapter 1), in Wound healing. , I.M.G.a.C.R. Gregory, Editor. **1991**, Gower Medical: New York. p. 2-13.
- [45] Robinson, J. and R. Rohrich, Wound healing and abnormal scars. Selected Read Plast Surg, **1999**. 9: p. 1.
- [46] Kawasumi, A., et al., Wound healing in mammals and amphibians: toward limb regeneration in mammals. New Perspectives in Regeneration, **2012**: p. 33-49.
- [47] Mutlu, S. and E. Yılmaz, Yara Yönetiminde Yenilikçi Yaklaşımalar. Gumushane Üniversitesi Sağlık Bilimleri Dergisi, **2019**. 8(4): p. 481-494.

- [48] Bozkaya, O., Centella Asiatica Bitki Özütü ile Kaplı Gümüş Nanopartikül İçeren Polimer Liflerin Yara İyileştirici Etkisinin In vitro ve In Vivo Araştırılması, Doktora Tezi, **2021**, Hacettepe Üniversitesi: Fen Bilimleri Enstitüsü. p. 210.
- [49] Akdoğan, M. and M. Yöntem, Sitokinler. Online Türk Sağlık Bilimleri Dergisi, **2018**. 3(1): p. 36-45.
- [50] Kim, H., et al., Hyaluronate□ Epidermal Growth Factor Conjugate for Skin Wound Healing and Regeneration. Biomacromolecules, **2016**. 17(11): p. 3694-3705.
- [51] Yetkin, G. and N. Çelebi, Transforme Edici Büyüme Faktörü (Transforming Growth Factor) Alfa'nın Özellikleri, Kanser Hücreleri ve Ülser Yaraları Üzerindeki Etkileri. FABAD Journal of Pharmaceutical Sciences, **2001**. 26(4): p. 185-196.
- [52] Yazır, Y., et al., Endotel Hücreleri İçin Önemli Bir Protein Ailesi; Vasküler Endotel Büyüme Faktörü (Vegf), Ailenin Üyeleri, Yapısı ve Sentezi.
- [53] Thomas, K.A., Vascular Endothelial Growth Factor, a Potent and Selective Angiogenic Agent (*). Journal of Biological Chemistry, **1996**. 271(2): p. 603-606.
- [54] Erol, N., Vasküler endotelial büyüme faktörü ve anti-VEGF ajanlar. Ret Vit Özel Sayı, **2007**. 15: p. 35-40.
- [55] Jin, K.L., X.O. Mao, and D.A. Greenberg, Vascular endothelial growth factor: direct neuroprotective effect in in vitro ischemia. Proceedings of the National Academy of Sciences, **2000**. 97(18): p. 10242-10247.
- [56] Miyamoto, K., et al., Vascular endothelial growth factor (VEGF)-induced retinal vascular permeability is mediated by intercellular adhesion molecule-1 (ICAM-1). The American journal of pathology, **2000**. 156(5): p. 1733-1739.
- [57] Byrne, A.M., D.J. Bouchier-Hayes, and J.H. Harmey, Angiogenic and cell survival functions of vascular endothelial growth factor (VEGF). Journal of cellular and molecular medicine, **2005**. 9(4): p. 777-794.
- [58] Wilgus, T.A., Vascular endothelial growth factor and cutaneous scarring. Advances in Wound Care, **2019**. 8(12): p. 671-678.
- [59] Vural, P., Fizyolojik ve Patolojik Anjiogenezde Vasküler Endotelial Büyüme Faktörünün Rolü. Türk Klinik Biyokimya Dergisi, **2018**. 16(1): p. 53-62.

- [60] Li, X., et al., VEGF-B: a survival, or an angiogenic factor? *Cell adhesion & migration*, **2009**. 3(4): p. 322-327.
- [61] Rauniyar, K., S.K. Jha, and M. Jeltsch, Biology of vascular endothelial growth factor C in the morphogenesis of lymphatic vessels. *Frontiers in bioengineering and biotechnology*, **2018**. 6: p. 7.
- [62] Wise, L.M., et al., The vascular endothelial growth factor (VEGF)-E encoded by orf virus regulates keratinocyte proliferation and migration and promotes epidermal regeneration. *Cellular microbiology*, **2012**. 14(9): p. 1376-1390.
- [63] De Falco, S., The discovery of placenta growth factor and its biological activity. *Experimental & molecular medicine*, **2012**. 44(1): p. 1-9.
- [64] Bao, P., et al., The role of vascular endothelial growth factor in wound healing. *Journal of Surgical Research*, **2009**. 153(2): p. 347-358.
- [65] Özer, S., Vasküler endotelial büyüme faktörü yüklü polikaprolakton nanopartiküllerinin hazırlanması, karakterizasyonu ve in vitro salım çalışmaları. Sağlık Bilimleri Enstitüsü.
- [66] Formiga, F.R., et al., Sustained release of VEGF through PLGA microparticles improves vasculogenesis and tissue remodeling in an acute myocardial ischemia–reperfusion model. *Journal of Controlled Release*, **2010**. 147(1): p. 30-37.
- [67] Golub, J.S., et al., Sustained VEGF delivery via PLGA nanoparticles promotes vascular growth. *American Journal of Physiology-Heart and Circulatory Physiology*, **2010**. 298(6): p. H1959-H1965.
- [68] De la Riva, B., et al., VEGF-controlled release within a bone defect from alginate/chitosan/PLA-H scaffolds. *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics*, **2009**. 73(1): p. 50-58.
- [69] Wu, H., et al., Fabrication of core–shell microspheres using alginate and chitosan–polycaprolactone for controlled release of vascular endothelial growth factor. *Reactive and Functional Polymers*, **2012**. 72(7): p. 427-437.
- [70] Wu, J., et al., Infarct stabilization and cardiac repair with a VEGF-conjugated, injectable hydrogel. *Biomaterials*, **2011**. 32(2): p. 579-586.

- [71] Xie, J., et al., Induction of angiogenesis by controlled delivery of vascular endothelial growth factor using nanoparticles. *Cardiovascular therapeutics*, **2013**. 31(3): p. e12-e18.
- [72] Rodness, J., et al., VEGF-loaded microsphere patch for local protein delivery to the ischemic heart. *Acta Biomaterialia*, **2016**. 45: p. 169-181.
- [73] Liu, Y., et al., Tailoring of the dopamine coated surface with VEGF loaded heparin/poly-l-lysine particles for anticoagulation and accelerate in situ endothelialization. *Journal of Biomedical Materials Research Part A*, **2015**. 103(6): p. 2024-2034.
- [74] Zhou, J., et al., Surface biofunctionalization of the decellularized porcine aortic valve with VEGF-loaded nanoparticles for accelerating endothelialization. *Materials Science and Engineering: C*, **2019**. 97: p. 632-643.
- [75] Wan, X., et al., Poly (ϵ -caprolactone)/keratin/heparin/VEGF biocomposite mats for vascular tissue engineering. *Journal of Biomedical Materials Research Part A*, **2020**. 108(2): p. 292-300.
- [76] Karal-Yılmaz, O., et al., Preparation and in vitro characterization of vascular endothelial growth factor (VEGF)-loaded poly (D, L-lactic-co-glycolic acid) microspheres using a double emulsion/solvent evaporation technique. *Journal of microencapsulation*, **2011**. 28(1): p. 46-54.
- [77] Lee M. Ellis, E.P.G., Howard I. Kaufman, Louis M. Weiner, *Cancer Therapeutic Targets*. Vol. 1. **2017**: Springer.
- [78] Schirmacher, P., et al., Keratinocyte-derived granulocyte-macrophage colony stimulating factor accelerates wound healing: Stimulation of keratinocyte proliferation, granulation tissue formation, and vascularization. *Journal of Investigative Dermatology*, **2001**. 117(6): p. 1382-1390.
- [79] Bussolino, F., et al., Granulocyte-and granulocyte-macrophage-colony stimulating factors induce human endothelial cells to migrate and proliferate. *Nature*, **1989**. 337(6206): p. 471-473.
- [80] Zhang, L., J. Chen, and C. Han, A multicenter clinical trial of recombinant human GM-CSF hydrogel for the treatment of deep second-degree burns. *Wound repair and regeneration*, **2009**. 17(5): p. 685-689.

- [81] Hu, X., et al., Topically applied rhGM-CSF for the wound healing: a systematic review. *Burns*, **2011**. 37(5): p. 729-741.
- [82] Fang, Y., et al., Granulocyte-macrophage colony-stimulating factor enhances wound healing in diabetes via upregulation of proinflammatory cytokines. *British Journal of Dermatology*, **2010**. 162(3): p. 478-486.
- [83] Mihalik, N.E., et al., Formulation and In Vitro Characterization of PLGA/PLGA-PEG Nanoparticles Loaded with Murine Granulocyte-Macrophage Colony-Stimulating Factor. *AAPS PharmSciTech*, **2021**. 22(5): p. 1-14.
- [84] Wu, F., et al., Practically feasible production of sustained-release microspheres of granulocyte-macrophage colony-stimulating factor (rhGM-CSF). *Journal of Controlled Release*, **2017**. 259: p. 195-202.
- [85] Allen, R., et al., Polymer-loaded hydrogels serve as depots for lactate and mimic “cold” tumor microenvironments. *Biomaterials science*, **2020**. 8(21): p. 6056-6068.
- [86] Kim, J., et al., Effect of pore structure of macroporous poly (lactide-co-glycolide) scaffolds on the in vivo enrichment of dendritic cells. *ACS applied materials & interfaces*, **2014**. 6(11): p. 8505-8512.
- [87] Lewicki, S., et al., Encapsulation of granulocyte colony-stimulating factor and granulocyte-macrophage colony-stimulating factor in liposomes prepared by thin film hydration and their transfer to mesenchymal stem cells and cord blood hematopoietic stem cells. *Archives of Medical Science: AMS*, **2022**. 18(4): p. 1051.
- [88] Vanitha, S., et al., Recombinant human granulocyte macrophage colony stimulating factor (hGM-CSF): Possibility of nanoparticle-mediated delivery in cancer immunotherapy. *Bioengineered*, **2017**. 8(2): p. 120-123.
- [89] Falanga, V., Chronic wounds: pathophysiologic and experimental considerations. *Journal of investigative dermatology*, **1993**. 100(5): p. 721-725.
- [90] Park, J.W., S.R. Hwang, and I.-S. Yoon, Advanced growth factor delivery systems in wound management and skin regeneration. *Molecules*, **2017**. 22(8): p. 1259.
- [91] Pierce, G., et al., Detection of platelet-derived growth factor (PDGF)-AA in actively healing human wounds treated with recombinant PDGF-BB and absence

- of PDGF in chronic nonhealing wounds. *The Journal of clinical investigation*, **1995**. 96(3): p. 1336-1350.
- [92] Catanzano, O., F. Quaglia, and J.S. Boateng, Wound dressings as growth factor delivery platforms for chronic wound healing. *Expert Opinion on Drug Delivery*, **2021**. 18(6): p. 737-759.
- [93] Gainza, G., et al., Advances in drug delivery systems (DDSs) to release growth factors for wound healing and skin regeneration. *Nanomedicine: Nanotechnology, Biology and Medicine*, **2015**. 11(6): p. 1551-1573.
- [94] Fang, R.C. and R.D. Galiano, A review of becaplermin gel in the treatment of diabetic neuropathic foot ulcers. *Biologics: targets & therapy*, **2008**. 2(1): p. 1.
- [95] Margolis, D.J., et al., Effectiveness of recombinant human platelet-derived growth factor for the treatment of diabetic neuropathic foot ulcers. *Wound repair and regeneration*, **2005**. 13(6): p. 531-536.
- [96] Steed, D.L., Clinical evaluation of recombinant human platelet-derived growth factor for the treatment of lower extremity diabetic ulcers. *Journal of vascular surgery*, **1995**. 21(1): p. 71-81.
- [97] Smiell, J.M., Clinical safety of becaplermin (rhPDGF-BB) gel. *The American journal of surgery*, **1998**. 176(2): p. 68S-73S.
- [98] Boateng, J.S., et al., Wound healing dressings and drug delivery systems: a review. *Journal of pharmaceutical sciences*, **2008**. 97(8): p. 2892-2923.
- [99] Boateng, J. and O. Catanzano, Advanced therapeutic dressings for effective wound healing—a review. *Journal of pharmaceutical sciences*, **2015**. 104(11): p. 3653-3680.
- [100] Lin, Y.-J., et al., Stimulation of wound healing by PU/hydrogel composites containing fibroblast growth factor-2. *Journal of Materials Chemistry B*, **2015**. 3(9): p. 1931-1941.
- [101] Nejaddehbashi, F., et al., Application of polycaprolactone, chitosan, and collagen composite as a nanofibrous mat loaded with silver sulfadiazine and growth factors for wound dressing. *Artificial Organs*, **2019**. 43(4): p. 413-423.
- [102] Choi, D.H., et al., Dual growth factor delivery using biocompatible core-shell microcapsules for angiogenesis. *Small*, **2013**. 9(20): p. 3468-3476.

- [103] Losi, P., et al., Fibrin-based scaffold incorporating VEGF-and bFGF-loaded nanoparticles stimulates wound healing in diabetic mice. *Acta biomaterialia*, **2013**. 9(8): p. 7814-7821.
- [104] Ribeiro, M., et al., Dextran-based hydrogel containing chitosan microparticles loaded with growth factors to be used in wound healing. *Materials Science and Engineering: C*, **2013**. 33(5): p. 2958-2966.
- [105] Chu, Y., et al., Nanotechnology promotes the full-thickness diabetic wound healing effect of recombinant human epidermal growth factor in diabetic rats. *Wound repair and regeneration*, **2010**. 18(5): p. 499-505.
- [106] Laiva, A.L., F.J. O'Brien, and M.B. Keogh, Innovations in gene and growth factor delivery systems for diabetic wound healing. *Journal of Tissue Engineering and Regenerative Medicine*, **2018**. 12(1): p. e296-e312.
- [107] Gainza, G., et al., A novel strategy for the treatment of chronic wounds based on the topical administration of rhEGF-loaded lipid nanoparticles: In vitro bioactivity and in vivo effectiveness in healing-impaired db/db mice. *Journal of controlled release*, **2014**. 185: p. 51-61.
- [108] Wang, W., et al., Nano-drug delivery systems in wound treatment and skin regeneration. *Journal of nanobiotechnology*, **2019**. 17(1): p. 1-15.
- [109] Eltaher, H.M., S.S. Said, and L.K. El-Khordagui, Drug delivery for cardiac regeneration, in *Applications of Nanocomposite Materials in Drug Delivery*. **2018**, Elsevier. p. 283-321.
- [110] Bale, S., et al., Overview on therapeutic applications of microparticulate drug delivery systems. *Critical Reviews™ in Therapeutic Drug Carrier Systems*, **2016**. 33(4).
- [111] Mahale, M.M. and R. Saudagar, Microsphere: a review. *Journal of drug delivery and therapeutics*, **2019**. 9(3-s): p. 854-856.
- [112] Gregory, J., *Flocculation fundamentals*. Encyclopedia of colloid and interface science. Springer, Berlin, **2013**: p. 459-491.
- [113] Patra, J.K., et al., Nano based drug delivery systems: recent developments and future prospects. *Journal of nanobiotechnology*, **2018**. 16(1): p. 1-33.

- [114] Felice, B., et al., Drug delivery vehicles on a nano-engineering perspective. *Materials Science and Engineering: C*, **2014**. 41: p. 178-195.
- [115] Sahoo, S.K., F. Dilnawaz, and S. Krishnakumar, Nanotechnology in ocular drug delivery. *Drug discovery today*, **2008**. 13(3-4): p. 144-151.
- [116] Singh, R. and J.W. Lillard Jr, Nanoparticle-based targeted drug delivery. *Experimental and molecular pathology*, **2009**. 86(3): p. 215-223.
- [117] Derman, S., K. Kızılbey, and Z.M. Akdeste, Polymeric nanoparticles. *Sigma Journal of Engineering and Natural Sciences*, **2013**. 31(1): p. 107-120.
- [118] Spirescu, V.A., et al., Inorganic nanoparticles and composite films for antimicrobial therapies. *International Journal of Molecular Sciences*, **2021**. 22(9): p. 4595.
- [119] Zarubova, J., et al., Nano-in-micro dual delivery platform for chronic wound healing applications. *Micromachines*, **2020**. 11(2): p. 158.
- [120] Dong, X., et al., Repair effect of diabetic ulcers with recombinant human epidermal growth factor loaded by sustained-release microspheres. *Science in China Series C: Life Sciences*, **2008**. 51(11): p. 1039-1044.
- [121] Elçin, Y.M., V. Dixit, and G. Gitnick, Extensive in vivo angiogenesis following controlled release of human vascular endothelial cell growth factor: implications for tissue engineering and wound healing. *Artificial organs*, **2001**. 25(7): p. 558-565.
- [122] Pettit, D.K., et al., Characterization of poly (glycolide-co-D, L-lactide)/poly (D, L-lactide) microspheres for controlled release of GM-CSF. *Pharmaceutical research*, **1997**. 14(10): p. 1422-1430.
- [123] Chereddy, K.K., et al., Combined effects of PLGA and vascular endothelial growth factor promote the healing of non-diabetic and diabetic wounds. *Nanomedicine: Nanotechnology, Biology and Medicine*, **2015**. 11(8): p. 1975-1984.
- [124] Dehkordi, N.K., et al., Nanocrystalline cellulose–hyaluronic acid composite enriched with GM-CSF loaded chitosan nanoparticles for enhanced wound healing. *Biomedical Materials*, **2019**. 14(3): p. 035003.

- [125] Chereddy, K.K., et al., PLGA nanoparticles loaded with host defense peptide LL37 promote wound healing. *Journal of Controlled Release*, **2014**. 194: p. 138-147.
- [126] Martinez, N.Y., et al., Development of double emulsion nanoparticles for the encapsulation of bovine serum albumin. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*, **2017**. 158: p. 190-196.
- [127] Malikmammadov, E., et al., PCL and PCL-based materials in biomedical applications. *Journal of Biomaterials science, Polymer edition*, **2018**. 29(7-9): p. 863-893.
- [128] Devrim, B. and A. Bozkır, Preparation and characterization of protein-loaded lipid-polymer hybrid nanoparticles with polycaprolactone as polymeric core material. *J Biomol Res Ther*, **2014**. 3(115): p. 2.
- [129] Mandal, B., et al., Core-shell-type lipid-polymer hybrid nanoparticles as a drug delivery platform. *Nanomedicine: Nanotechnology, Biology and Medicine*, **2013**. 9(4): p. 474-491.
- [130] Parveen, S. and S.K. Sahoo, Polymeric nanoparticles for cancer therapy. *Journal of drug targeting*, **2008**. 16(2): p. 108-123.
- [131] Ghasemiyeh, P. and S. Mohammadi-Samani, Solid lipid nanoparticles and nanostructured lipid carriers as novel drug delivery systems: Applications, advantages and disadvantages. *Research in pharmaceutical sciences*, **2018**. 13(4): p. 288.
- [132] Serpe, L., et al., Intracellular accumulation and cytotoxicity of doxorubicin with different pharmaceutical formulations in human cancer cell lines. *Journal of nanoscience and nanotechnology*, **2006**. 6(9-10): p. 3062-3069.
- [133] Fang, R.H., et al., Quick synthesis of lipid-polymer hybrid nanoparticles with low polydispersity using a single-step sonication method. *Langmuir*, **2010**. 26(22): p. 16958-16962.
- [134] Hallan, S.S., et al., Lipid polymer hybrid as emerging tool in nanocarriers for oral drug delivery. *Artificial cells, nanomedicine, and biotechnology*, **2016**. 44(1): p. 334-349.

- [135] Messerschmidt, S.K., et al., Targeted lipid-coated nanoparticles: delivery of tumor necrosis factor-functionalized particles to tumor cells. *Journal of controlled release*, **2009**. 137(1): p. 69-77.
- [136] Shi, J., et al., Differentially charged hollow core/shell lipid–polymer–lipid hybrid nanoparticles for small interfering RNA delivery. *Angewandte Chemie International Edition*, **2011**. 50(31): p. 7027-7031.
- [137] Hu, C.-M.J., et al., Erythrocyte membrane-camouflaged polymeric nanoparticles as a biomimetic delivery platform. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, **2011**. 108(27): p. 10980-10985.
- [138] Lee, S.-M., et al., Biological evaluation of pH-responsive polymer-caged nanobins for breast cancer therapy. *ACS nano*, **2010**. 4(9): p. 4971-4978.
- [139] Khater, S.E., et al., Fluoxetine hydrochloride loaded lipid polymer hybrid nanoparticles showed possible efficiency against SARS-CoV-2 infection. *International journal of pharmaceutics*, **2021**. 607: p. 121023.
- [140] Thakur, K., et al., Nano-engineered lipid-polymer hybrid nanoparticles of fusidic acid: an investigative study on dermatokinetics profile and MRSA-infected burn wound model. *Drug Delivery and Translational Research*, **2019**. 9(4): p. 748-763.
- [141] Jangde, R., et al., Hesperidin-Loaded Lipid Polymer Hybrid Nanoparticles for Topical Delivery of Bioactive Drugs. *Pharmaceuticals*, **2022**. 15(2): p. 211.
- [142] Sengupta, S., et al., Temporal targeting of tumour cells and neovasculature with a nanoscale delivery system. *Nature*, **2005**. 436(7050): p. 568-572.
- [143] Krishnamurthy, S., et al., Lipid-coated polymeric nanoparticles for cancer drug delivery. *Biomaterials science*, **2015**. 3(7): p. 923-936.
- [144] Zhang, L., et al., Self-assembled lipid– polymer hybrid nanoparticles: a robust drug delivery platform. *ACS nano*, **2008**. 2(8): p. 1696-1702.
- [145] Chaisri, W., W.E. Hennink, and S. Okonogi, Preparation and characterization of cephalexin loaded PLGA microspheres. *Current drug delivery*, **2009**. 6(1): p. 69-75.
- [146] Cohen-Sela, E., et al., Single and double emulsion manufacturing techniques of an amphiphilic drug in PLGA nanoparticles: formulations of mithramycin and bioactivity. *Journal of pharmaceutical sciences*, **2009**. 98(4): p. 1452-1462.

- [147] Kang, F. and J. Singh, Effect of additives on the release of a model protein from PLGA microspheres. *Aaps Pharmscitech*, **2001**. 2(4): p. 86-92.
- [148] Paillard-Giteau, A., et al., Effect of various additives and polymers on lysozyme release from PLGA microspheres prepared by an s/o/w emulsion technique. *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics*, **2010**. 75(2): p. 128-136.
- [149] Zhang, L. and L. Zhang, Lipid–polymer hybrid nanoparticles: synthesis, characterization and applications. *Nano life*, **2010**. 1(01n02): p. 163-173.
- [150] Tahir, N., et al., Lipid-polymer hybrid nanoparticles for controlled delivery of hydrophilic and lipophilic doxorubicin for breast cancer therapy. *International Journal of Nanomedicine*, **2019**. 14: p. 4961.
- [151] Gavasane, A.J. and H.A. Pawar, Synthetic biodegradable polymers used in controlled drug delivery system: an overview. *Clin Pharmacol Biopharm*, **2014**. 3(2): p. 1-7.
- [152] Hamid Akash, M.S., K. Rehman, and S. Chen, Natural and synthetic polymers as drug carriers for delivery of therapeutic proteins. *Polymer Reviews*, **2015**. 55(3): p. 371-406.
- [153] Kalaycioglu, G.D., et al., pH-Sensitive Polymeric Poly (ϵ -caprolactone) Core-Chitosan/Alginate Shell Particle System for Oral Insulin Delivery. *ChemistrySelect*, **2021**. 6(4): p. 695-704.
- [154] Wang, W., et al., Dual-functional transdermal drug delivery system with controllable drug loading based on thermosensitive poloxamer hydrogel for atopic dermatitis treatment. *Scientific reports*, **2016**. 6(1): p. 1-10.
- [155] BRAHIMA, S., pH ve sıcaklığa duyarlı hidrojellerin sentezlenmesi ve ilaç salım davranışlarının modellenmesi / Synthesis of pH and temperature sensitive hydrogels and modelling of drug release behavior, *Yüksek Lisans Tezi*. **2016**, İnönü Üniversitesi: Fen Bilimleri Enstitüsü. p. 103.
- [156] Sop, E.S., Doku genişletme amaçlı hidrojel sentezi, karakterizasyonu ve şişme kinetiği. **2013**.
- [157] Alven, S., et al., Polymer-Based Wound Dressing Materials Loaded with Bioactive Agents: Potential Materials for the Treatment of Diabetic Wounds. *Polymers*, **2022**. 14(4): p. 724.

- [158] Liang, Y., et al., Dual-dynamic-bond cross-linked antibacterial adhesive hydrogel sealants with on-demand removability for post-wound-closure and infected wound healing. *ACS nano*, **2021**. 15(4): p. 7078-7093.
- [159] Ojeh, N., et al., Stem cells in skin regeneration, wound healing, and their clinical applications. *International journal of molecular sciences*, **2015**. 16(10): p. 25476-25501.
- [160] Kaisang, L., et al., Adipose-derived stem cells seeded in Pluronic F-127 hydrogel promotes diabetic wound healing. *Journal of Surgical Research*, **2017**. 217: p. 63-74.
- [161] Abdeltawab, H., D. Svirskis, and M. Sharma, Formulation strategies to modulate drug release from poloxamer based in situ gelling systems. *Expert Opinion on Drug Delivery*, **2020**. 17(4): p. 495-509.
- [162] Park, Y.E., et al., Sustained Delivery of Lactoferrin Using Poloxamer Gels for Local Bone Regeneration in a Rat Calvarial Defect Model. *Materials*, **2021**. 15(1): p. 212.
- [163] Abdeltawab, H., et al., Injectable thermoresponsive gels offer sustained dual release of bupivacaine hydrochloride and ketorolac tromethamine for up to two weeks. *International Journal of Pharmaceutics*, **2021**. 604: p. 120748.
- [164] Nie, S., et al., Thermoreversible Pluronic® F127-based hydrogel containing liposomes for the controlled delivery of paclitaxel: in vitro drug release, cell cytotoxicity, and uptake studies. *International journal of nanomedicine*, **2011**. 6: p. 151-166.
- [165] Nasir, F., et al., Development and evaluation of diclofenac sodium thermoreversible subcutaneous drug delivery system. *International journal of pharmaceutics*, **2012**. 439(1-2): p. 120-126.
- [166] Gao, M., et al., Preparation and characterization of curcumin thermosensitive hydrogels for intratumoral injection treatment. *Drug development and industrial pharmacy*, **2014**. 40(11): p. 1557-1564.
- [167] Hui, P.C.-L., et al., Preparation and characterisation of chitosan microcapsules loaded with Cortex Moutan. *International journal of biological macromolecules*, **2013**. 55: p. 32-38.

- [168] Carmona-Moran, C.A., et al., Development of gellan gum containing formulations for transdermal drug delivery: Component evaluation and controlled drug release using temperature responsive nanogels. *International Journal of Pharmaceutics*, **2016**. 509(1-2): p. 465-476.
- [169] Hamad, K.M., et al., Fluconazole conjugated-gold nanorods as an antifungal nanomedicine with low cytotoxicity against human dermal fibroblasts. *RSC advances*, **2020**. 10(43): p. 25889-25897.
- [170] Yu, Y., et al., Recent advances in thermo-sensitive hydrogels for drug delivery. *Journal of Materials Chemistry B*, **2021**. 9(13): p. 2979-2992.
- [171] Kant, V., et al., Topical pluronic F-127 gel application enhances cutaneous wound healing in rats. *Acta Histochemica*, **2014**. 116(1): p. 5-13.
- [172] Machado, H., et al., Release of a wound-healing agent from PLGA microspheres in a thermosensitive gel. *BioMed Research International*, **2013**. 2013.
- [173] Bernal-Chávez, S.A., et al., Platelet lysate-loaded PLGA nanoparticles in a thermo-responsive hydrogel intended for the treatment of wounds. *European Journal of Pharmaceutical Sciences*, **2020**. 146: p. 105231.
- [174] Association, A.D., Diagnosis and classification of diabetes mellitus. *Diabetes care*, **2010**. 33(Supplement_1): p. S62-S69.
- [175] Greenhalgh, D.G., Wound healing and diabetes mellitus. *Clinics in plastic surgery*, **2003**. 30(1): p. 37-45.
- [176] Kidambi, S. and S.B. Patel, Diabetes mellitus: considerations for dentistry. *The Journal of the American Dental Association*, **2008**. 139: p. 8S-18S.
- [177] Duffy, D.L., Genetic determinants of diabetes are similarly associated with other immune-mediated diseases. *Current opinion in allergy and clinical immunology*, **2007**. 7(6): p. 468-474.
- [178] Zıba, R., Tip 2 Diyabetli Bireylerde Bilişsel ve Sosyal Faktörlerin Değerlendirilmesi, Yüksek Lisans Tezi. **2020**, Çukurova Üniversitesi: Sağlık Bilimleri Enstitüsü. p. 70.
- [179] Sharp, A. and J. Clark, Diabetes and its effects on wound healing. *Nursing Standard*, **2011**. 25(45).

- [180] Patel, S., et al., Mechanistic insight into diabetic wounds: Pathogenesis, molecular targets and treatment strategies to pace wound healing. *Biomedicine & Pharmacotherapy*, **2019**. 112: p. 108615.
- [181] Brem, H. and M. Tomic-Canic, Cellular and molecular basis of wound healing in diabetes. *The Journal of clinical investigation*, **2007**. 117(5): p. 1219-1222.
- [182] Mallapragada, S.K. and N.A. Peppas, Dissolution mechanism of semicrystalline poly (vinyl alcohol) in water. *Journal of Polymer Science Part B: Polymer Physics*, **1996**. 34(7): p. 1339-1346.
- [183] Schmolka, I.R., Artificial skin I. Preparation and properties of pluronic F-127 gels for treatment of burns. *Journal of biomedical materials research*, **1972**. 6(6): p. 571-582.
- [184] Chen, X., et al., Enhanced brain targeting of curcumin by intranasal administration of a thermosensitive poloxamer hydrogel. *Journal of Pharmacy and Pharmacology*, **2013**. 65(6): p. 807-816.
- [185] Lim, J., et al., Characterization of magnetic nanoparticle by dynamic light scattering. *Nanoscale research letters*, **2013**. 8(1): p. 1-14.
- [186] Seo, Y. and W. Jhe, Atomic force microscopy and spectroscopy. *Reports on Progress in Physics*, **2007**. 71(1): p. 016101.
- [187] Spink, C.H., Differential scanning calorimetry. *Methods in cell biology*, **2008**. 84: p. 115-141.
- [188] Titus, D., E.J.J. Samuel, and S.M. Roopan, Nanoparticle characterization techniques, in *Green synthesis, characterization and applications of nanoparticles*. **2019**, Elsevier. p. 303-319.
- [189] Ünsal, H., Özel tasarım yüzey aktif maddeler kullanılarak nano/mikro boyutlu tübüler yapıların oluşturulması, karakterizasyonu ve uygulamaları, *Doktora Tezi*. **2014**, Hacettepe Üniversitesi: Fen Bilimleri Enstitüsü. p. 221.
- [190] Kruger, N.J., The Bradford method for protein quantitation. *The protein protocols handbook*, **2009**: p. 17-24.
- [191] Gilbert, J.C., et al., The effect of solutes and polymers on the gelation properties of pluronic F-127 solutions for controlled drug delivery. *Journal of controlled release*, **1987**. 5(2): p. 113-118.

- [192] Vadnere, M., et al., Thermodynamic studies on the gel-sol transition of some pluronic polyols. *International journal of pharmaceutics*, **1984**. 22(2-3): p. 207-218.
- [193] Kaczmarczyk-Sedlak, I., et al., Effect of caffeine on biomarkers of oxidative stress in lenses of rats with streptozotocin-induced diabetes. *Archives of Medical Science*, **2019**. 15(4): p. 1073-1080.
- [194] Cheng, K.-Y., et al., Wound healing in streptozotocin-induced diabetic rats using atmospheric-pressure argon plasma jet. *Scientific reports*, **2018**. 8(1): p. 1-15.
- [195] Wang-Fischer, Y. and T. Garyantes, Improving the reliability and utility of streptozotocin-induced rat diabetic model. *Journal of diabetes research*, 2018. **2018**.
- [196] Kant, V., et al., Topical application of substance P promotes wound healing in streptozotocin-induced diabetic rats. *Cytokine*, **2015**. 73(1): p. 144-155.
- [197] Fologea, D., et al., Electrical characterization of protein molecules by a solid-state nanopore. *Applied physics letters*, **2007**. 91(5): p. 053901.
- [198] Li, R., et al., Role of pH-induced structural change in protein aggregation in foam fractionation of bovine serum albumin. *Biotechnology Reports*, **2016**. 9: p. 46-52.
- [199] Shimada, H., et al., Concentration gradient of vascular endothelial growth factor in the vitreous of eyes with diabetic macular edema. *Investigative ophthalmology & visual science*, **2009**. 50(6): p. 2953-2955.
- [200] Merck. GM-CSF rat. <https://www.sigmaaldrich.com/TR/en/product/sigma/srp3271> [Erişim tarihi **2022 12.17**].
- [201] Rezwan, K., L.P. Meier, and L.J. Gauckler, Lysozyme and bovine serum albumin adsorption on uncoated silica and AlOOH-coated silica particles: the influence of positively and negatively charged oxide surface coatings. *Biomaterials*, **2005**. 26(21): p. 4351-4357.
- [202] Das, S.K., et al., Techniques and methods used for the fabrication of bionanocomposites, in *Bionanocomposites in Tissue Engineering and Regenerative Medicine*. **2021**, Elsevier. p. 17-43.

- [203] Meng, F.T., et al., W/O/W double emulsion technique using ethyl acetate as organic solvent: effects of its diffusion rate on the characteristics of microparticles. *Journal of controlled release*, **2003**. 91(3): p. 407-416.
- [204] Das, P.P., et al., Amphiphilic copolymeric stabilizer for the formation of polycaprolactone particles. *Polymer Bulletin*, **2022**. 79(8): p. 6497-6512.
- [205] Rayaprolu, B.M. and J.G. Strom, Design and evaluation of D- α tocopheryl polyethylene glycol 1000 succinate emulsified poly- ϵ -caprolactone nanoparticles for protein/peptide drug delivery. *Drug Development and Industrial Pharmacy*, **2013**. 39(7): p. 1046-1052.
- [206] Xie, S., et al., Effect of PLGA as a polymeric emulsifier on preparation of hydrophilic protein-loaded solid lipid nanoparticles. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*, **2008**. 67(2): p. 199-204.
- [207] List, G., Soybean lecithin: Food, industrial uses, and other applications. *Polar lipids*, **2015**: p. 1-33.
- [208] Immordino, M.L., F. Dosio, and L. Cattel, Stealth liposomes: review of the basic science, rationale, and clinical applications, existing and potential. *International journal of nanomedicine*, **2006**. 1(3): p. 297.
- [209] Carradori, D., et al., Application of nanomedicine to the CNS diseases. *International review of neurobiology*, **2016**. 130: p. 73-113.
- [210] Gattefossé. Geleol™ Mono and Diglycerides NF. <https://www.gattefosse.com/pharmaceuticals-products/geleol-mono-and-diglycerides-nf> [Erişim Tarihi 2022 12.17].
- [211] Voigt, M., M. Koerber, and R. Bodmeier, Improved physical stability and injectability of non-aqueous in situ PLGA microparticle forming emulsions. *International journal of pharmaceutics*, **2012**. 434(1-2): p. 251-256.
- [212] Dinda, A., et al., Formulation development and evaluation of paclitaxel loaded solid lipid nanoparticles using glyceryl monostearate. *Journal of applied pharmaceutical science*, **2013**. 3(8): p. 133-138.
- [213] Wu, C., et al., Lipid and PLGA hybrid microparticles as carriers for protein delivery. *Journal of Drug Delivery Science and Technology*, **2018**. 43: p. 65-72.

- [214] Ashour, A.E., et al., Physical pegylation enhances the cytotoxicity of 5-fluorouracil-loaded PLGA and PCL nanoparticles. *International journal of nanomedicine*, **2019**. 14: p. 9259.
- [215] Aitken, A. and M.P. Learmonth, Protein determination by UV absorption, in *The protein protocols handbook*. **2009**, Springer. p. 3-6.
- [216] Callan, M., et al., Characterization of Pluronic F127 for the controlled drug release vancomycin in the spinal column. *J. Undergrad. Chem. Eng. Res*, **2017**. 6: p. 6-19.
- [217] Bradford, M.M., A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Analytical biochemistry*, **1976**. 72(1-2): p. 248-254.
- [218] Bianchi-Bosisio, A., *PROTEINS| Physiological Samples*. **2005**.
- [219] Grdadolnik, J. and Y. Maréchal, Bovine serum albumin observed by infrared spectrometry. I. Methodology, structural investigation, and water uptake. *Biopolymers: Original Research on Biomolecules*, **2001**. 62(1): p. 40-53.
- [220] Devrim Gökberk, B. and N. Erdinç, Design, Optimization, and Characterization of Lysozyme-Loaded Poly (ϵ -Caprolactone) Microparticles for Pulmonary Delivery. *Journal of Pharmaceutical Innovation*, **2022**: p. 1-14.
- [221] Feng, S., et al., Effects of drug and polymer molecular weight on drug release from PLGA-m PEG microspheres. *Journal of applied polymer science*, **2015**. 132(6).
- [222] Müller, R.H., K. Mäder, and S. Gohla, Solid lipid nanoparticles (SLN) for controlled drug delivery—a review of the state of the art. *European journal of pharmaceutics and biopharmaceutics*, **2000**. 50(1): p. 161-177.
- [223] Nawaz, T., et al., Development and Optimization of Acriflavine-Loaded Polycaprolactone Nanoparticles Using Box–Behnken Design for Burn Wound Healing Applications. *Polymers*, **2021**. 14(1): p. 101.
- [224] Bajsić, E.G., et al., Characterization of biodegradable polycaprolactone containing titanium dioxide micro and nanoparticles. *International Journal of Materials and Metallurgical Engineering*, **2014**. 8(7): p. 611-615.

- [225] Seyed Yagoubi, A., et al., Preparation, characterization and evaluation of physicochemical properties of phycocyanin-loaded solid lipid nanoparticles and nanostructured lipid carriers. *Journal of Food Measurement and Characterization*, **2018**. 12(1): p. 378-385.
- [226] Arakawa, T. and Y. Kita, Stabilizing effects of caprylate and acetyltryptophanate on heat-induced aggregation of bovine serum albumin. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Protein Structure and Molecular Enzymology*, **2000**. 1479(1-2): p. 32-36.
- [227] Azizi, M., et al., Fabrication of protein-loaded PLGA nanoparticles: effect of selected formulation variables on particle size and release profile. *Journal of Polymer Research*, **2013**. 20(4): p. 1-14.
- [228] Chouhan, D., et al., Emerging and innovative approaches for wound healing and skin regeneration: Current status and advances. *Biomaterials*, **2019**. 216: p. 119267.
- [229] Lee, Y.H. and M.C. Yang, Effect of poly (γ -glutamic acid) on the gelation of Pluronic F127. *Polymers for Advanced Technologies*, **2009**. 20(8): p. 703-705.
- [230] Geng, H., et al., Sustained release of VEGF from PLGA nanoparticles embedded thermo-sensitive hydrogel in full-thickness porcine bladder acellular matrix. *Nanoscale research letters*, **2011**. 6(1): p. 1-8.
- [231] Gioffredi, E., et al., Pluronic F127 hydrogel characterization and biofabrication in cellularized constructs for tissue engineering applications. *Procedia Cirp*, **2016**. 49: p. 125-132.
- [232] Moonay, D. What is Shear Rate and Why is it Important? **2017**.
- [233] Chhabra, R.P., Non-Newtonian fluids: an introduction, in *Rheology of complex fluids*. **2010**, Springer. p. 3-34.
- [234] Grillo, R., et al., Influence of hybrid polymeric nanoparticle/thermosensitive hydrogels systems on formulation tracking and in vitro artificial membrane permeation: A promising system for skin drug-delivery. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*, **2019**. 174: p. 56-62.
- [235] Sellers, D.L., et al., Poly (lactic-co-glycolic) acid microspheres encapsulated in Pluronic F-127 prolong hirudin delivery and improve functional recovery from a demyelination lesion. *Biomaterials*, **2014**. 35(31): p. 8895-8902.

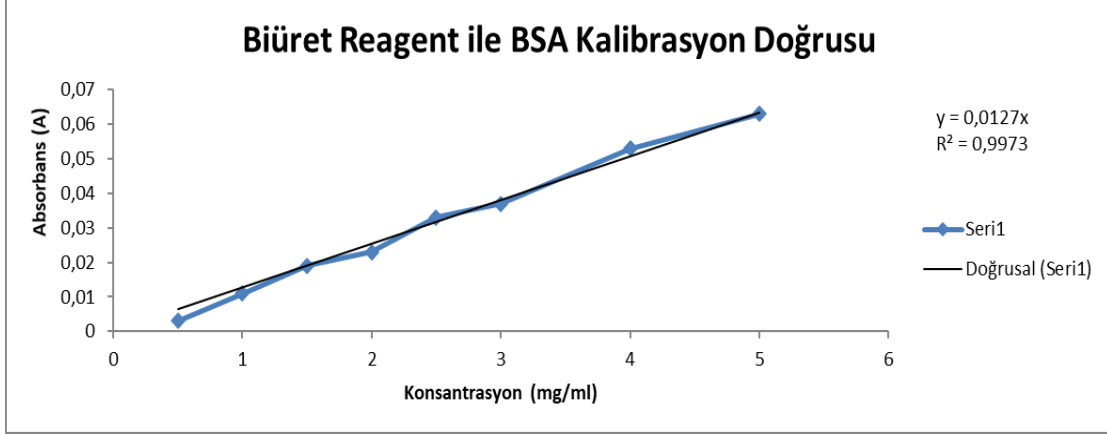
- [236] Chen, P.C., et al., Injectable microparticle–gel system for prolonged and localized lidocaine release. II. In vivo anesthetic effects. *Journal of Biomedical Materials Research Part A: An Official Journal of The Society for Biomaterials, The Japanese Society for Biomaterials, and The Australian Society for Biomaterials and the Korean Society for Biomaterials*, **2004**. 70(3): p. 459-466.
- [237] Dave, V., et al., Lipid-polymer hybrid nanoparticles: Development & statistical optimization of norfloxacin for topical drug delivery system. *Bioactive materials*, **2017**. 2(4): p. 269-280.
- [238] Cetin, M., et al., Preparation and in vitro evaluation of bFGF-loaded chitosan nanoparticles. *Drug Delivery*, **2007**. 14(8): p. 525-529.
- [239] Gallagher, S.R. and E.A. Wiley, *Current protocols essential laboratory techniques*. **2008**: John Wiley & Sons San Francisco, CA.
- [240] Çetin, M., et al., Preparation and characterization of BSA-loaded alginate microspheres. *Fabad Journal of Pharmaceutical Sciences*, **2007**. 3(32): p. 103-107.
- [241] He, Y. and E.S. Yeung, Rapid determination of protein molecular weight by the Ferguson method and multiplexed capillary electrophoresis. *Journal of proteome research*, **2002**. 1(3): p. 273-277.
- [242] Dabaghi, N., et al., Preparation and in vitro release profiling of PLGA microspheres containing BSA as a model protein. *Brazilian Journal of Pharmaceutical Sciences*, **2020**. 56.
- [243] Laemmli, U.K., Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *nature*, **1970**. 227(5259): p. 680-685.
- [244] Lenzen, S., The mechanisms of alloxan-and streptozotocin-induced diabetes. *Diabetologia*, **2008**. 51(2): p. 216-226.
- [245] Akbarzadeh, A., et al., Induction of diabetes by streptozotocin in rats. *Indian Journal of Clinical Biochemistry*, **2007**. 22(2): p. 60-64.
- [246] Ikebukuro, K., et al., Treatment of streptozotocin-induced diabetes mellitus by transplantation of islet cells plus bone marrow cells via portal vein in rats. *Transplantation*, **2002**. 73(4): p. 512-518.

- [247] Elias, D., et al., Autoimmune diabetes induced by the β -cell toxin STZ: immunity to the 60-kDa heat shock protein and to insulin. *Diabetes*, **1994**. 43(8): p. 992-998.
- [248] Deeds, M., et al., Single dose streptozotocin-induced diabetes: considerations for study design in islet transplantation models. *Laboratory animals*, **2011**. 45(3): p. 131-140.
- [249] Weiss, R.B., Streptozocin: a review of its pharmacology, efficacy, and toxicity. *Cancer Treat Rep*, **1982**. 66(3): p. 427-38.
- [250] Furman, B.L., Streptozotocin-induced diabetic models in mice and rats. *Current Protocols*, **2021**. 1(4): p. e78.
- [251] Strodbeck, F., Physiology of wound healing. *Newborn and infant nursing reviews*, **2001**. 1(1): p. 43-52.
- [252] Chi, J., et al., Antibacterial and angiogenic chitosan microneedle array patch for promoting wound healing. *Bioactive materials*, **2020**. 5(2): p. 253-259.

7 EKLER

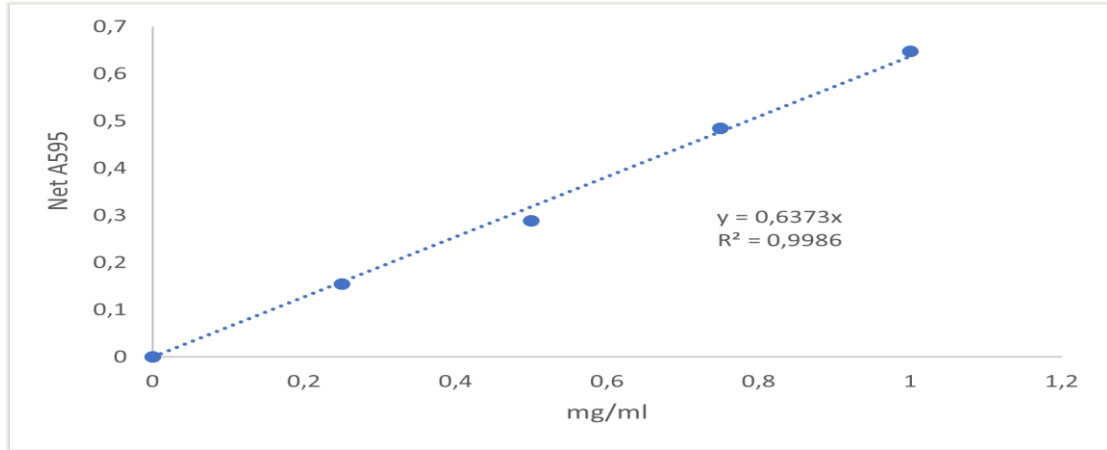
7.1 EK-1 Kalibrasyon Doğruları

7.1.1 EK-1.a. Sığır Serum Albumin'inin Biüret ile Kalibrasyon Doğrusu



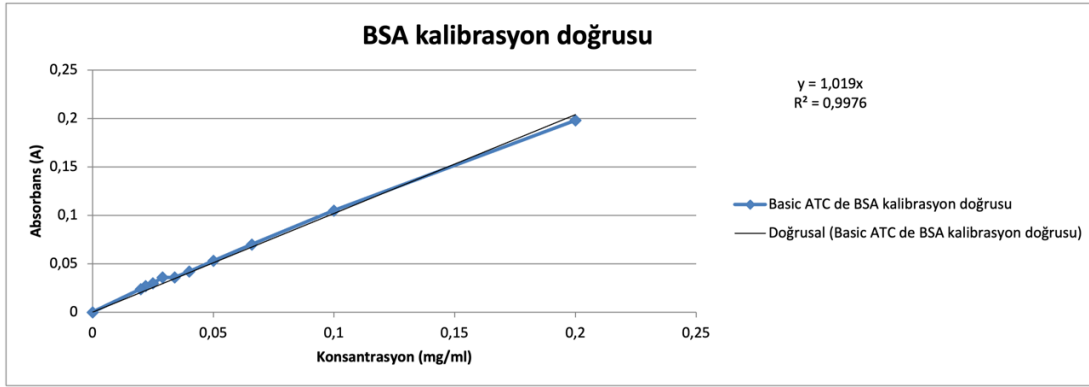
Şekil 7-1 Biüret Çözültisi ile 540 nm dalga boyunda sığır serum albuminin kalibrasyon doğrusu

7.1.2 EK-1.b. BSA Bradford ile Kalibrasyon Doğrusu



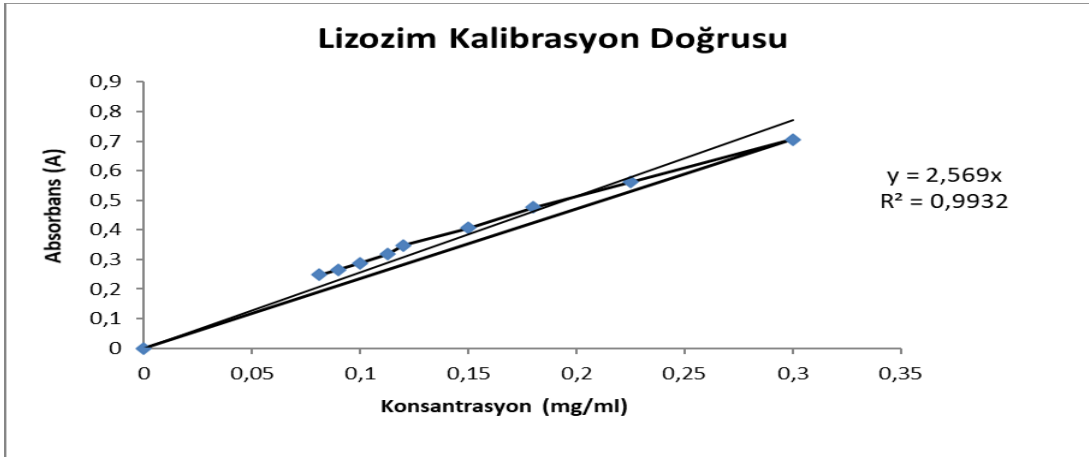
Şekil 7-2 Bradford Reaktif ile 595 nm dalga boyunda sığır serum albuminin kalibrasyon doğrusu

7.1.3 EK-1.c. BSA 280 nm Dalga Boyunda Kalibrasyon Doğrusu



Şekil 7-3 280 nm dalga boyunda sığır serum albuminin kalibrasyon doğrusu

7.1.4 EK-1.d. Lizozim Kalibrasyon Doğrusu



Şekil 7-4 280 nm dalga boyunda lizozimin kalibrasyon doğrusu

7.2 EK-2 Tez Çalışması Etik Kurul İzni

7.3 EK-3 Tez Çalışmasının Orijinallik Raporu

8 Özgeçmiş

