

**KEMİK DOKU MÜHENDİSLİĞİNE YÖNELİK BÜYÜME  
FAKTÖRLERİNİN SIRALI SALIMINI SAĞLAYAN NANOPARTİKÜL  
HAZIRLANMASI VE KİTOSAN YAPILARA EKLENEREK  
KOMPOZİT DOKU DESTEKLERİ OLUŞTURULMASI**

**Proje No: 108T805**

Prof.Dr. Nesrin HASIRCI

HAZİRAN 2011

ANKARA

## **ÖNSÖZ**

Bu proje, kemik doku mühendisliğine yönelik büyüme faktörü salımı yapabilecek kompozit doku destekleri geliştirilmesine yönelik bir çalışma olup TÜBİTAK tarafından 108T805 proje koduyla 1 Haziran 2009 – 1 Haziran 2011 tarihleri arasında desteklenmiştir.

# İÇİNDEKİLER

ÖNSÖZ.....	2
İÇİNDEKİLER.....	3
TABLolar LİSTESİ .....	5
ŞEKİLLER LİSTESİ.....	6
ÖZET.....	7
ABSTRACT .....	8
GİRİŞ .....	9
1.1 Kemik .....	9
1.1.1 Kemiğin Yapısı .....	9
1.1.2 Kemikte İyileşme Süreci .....	10
1.2 Kemik Tedavisi ve Rejenerasyonunda Klinik Yaklaşımlar .....	11
1.2.1 Biyolojik Doku Nakilleri.....	11
1.2.2 Sentetik Doku Nakilleri.....	14
1.3 Kemik Tedavisinde Alternatif Bir Yöntem: Doku Mühendisliği.....	16
1.3.1 Kemik Doku Mühendisliğinde Kullanılan Yapı İskeleleri.....	17
1.3.1.1 Yapı İskelelerinde Kullanılan Malzemeler.....	17
1.3.1.1.1 Doğal Polimerler .....	17
1.3.1.1.2 Yapı İskelesi Üretim Teknikleri .....	18
1.3.1.1.2.1 Islak Eğirme .....	19
1.3.2 Kemik Doku Mühendisliğinde Büyüme Faktörleri.....	19
1.3.2.1 Kemik Morfojenik Proteinleri .....	20
1.4 Doku Mühendisliğinde Kontrollü Büyüme Faktörü Salımı .....	20
1.4.1 Nanoteknolojinin Kontrollü Salım Üzerindeki Etkisi .....	22
1.4.2 Doku Mühendisliği Amaçlı Hazırlanan Yapılardan Çoklu Büyüme Faktörü Salınımı .....	23
1.5 Çalışmanın Amacı .....	23
1.6 Çalışmanın Özgün Değeri .....	24
GEREÇ VE YÖNTEM .....	25
2.1 Malzemeler.....	25
2.2 Yöntem .....	26
2.2.1 Kemik Doku Mühendisliği Amaçlı Yapı İskelelerinin Hazırlanması .....	26
2.2.1.1 Kitosan Bazlı Dağınık Fiber Ağ Yapıda Doku Desteğinin Hazırlanması.....	26

2.2.1.2 Kitosan Bazlı Çift Katmanlı Doku Desteklerinin Hazırlanması .....	27
2.2.2 Büyüme Faktörlerini Taşıyacak Nanokapsüllerin Hazırlanması.....	27
2.2.3 Nanokapsüllerin Doku Desteklerine Yüklenmesi .....	28
2.2.3.1 Nanokapsüllerin Kitosan Doku Desteklerinin İçine Yüklenmesi.....	28
2.2.3.2 Nanokapsüllerin Kitosan Doku Desteklerinin Üstüne Yüklenmesi .....	30
2.2.3.3 Çift Katmanlı Kitosan Bazlı Doku Desteklerine BSA Eklenmesi .....	30
2.2.4 Karakterizasyon.....	30
2.2.4.1 Taramalı Elektron Mikroskopisi .....	30
2.2.4.2 Parçacık Boyutu Analizi.....	31
2.2.4.3 İn Situ Bozunmanın Değerlendirilmesi .....	31
2.2.4.3.1 PLGA ve PHBV Nanokapsüllerin Boznuması .....	31
2.2.4.3.2 Doku Desteklerinin Su Tutma ve Bozunma Karakteristiklerinin İncelenmesi .....	31
2.2.4.4 Mikrobilgisayarlı Tomografi.....	31
2.2.5 İn Situ Salım Çalışmaları .....	32
2.2.5.1 Serbest Halde ve Doku Desteği İçine Yerleştirilmiş Nanokapsüllerden BSA Salımı ...	32
2.2.5.2 Serbest Haldeki Nanokapsüllerden BMP Salımı .....	33
SONUÇLAR .....	34
3.1 Nanoparçacıklı Sıralı Salım Sistemlerinin Hazırlanması.....	34
3.1.1 Nanoparçacık Şekli ve Botuyu .....	34
3.1.2 Yüklü PLGA ve PHBV Nanokapsüllerin Bozunması.....	36
3.1.3 Enkapsülasyon Etkinliği ve Salım Kinetikleri .....	37
3.2. Kitosan Doku Desteklerinden Büyüme Faktörü Salımı .....	41
3.2.1 Fiber ağ Yapıda Kitosan Doku Desteklerinin Hazırlanması .....	41
3.2.2 Kitosan Bazlı Çift Katmanlı Doku Desteklerinin Hazırlanması .....	44
3.2.3 Doku Desteklerinin Karakterizasyonu .....	45
3.2.4 Nanoparçacıkların Kitosan Doku Desteklerine Yüklenmesi .....	49
3.2.5 Salım Karakteristiği.....	50
3.2.5.1 Kitosan Doku Desteklerinin Salım Karakteristiği.....	52
3.2.5.2 Kitosan Bazlı Çift Katmanlı Doku Desteklerinin Salım Karakteristiği .....	53
SONUÇ .....	54
KAYNAKLAR.....	55

## TABLULAR LİSTESİ

Tablo 2.1 Kimyasallar .....	25
Tablo 2.2 Kitosan bazlı doku desteği hazırlanmasında kullanılan çözeltileri içeriği .....	27
Tablo 3.1 BSA nın hapsedilme etkinliği .....	38
Tablo 3.2 Higuchi modeline göre BSA nın salım kinetik değerleri .....	39
Tablo 3.3 Kitosan doku desteklerinin özelliklerinin inkübasyonla değişimi .....	48

## ŞEKİLLER LİSTESİ

Şekil 1.1 Kemiğin enine kesitinden bir görüntü.....	9
Şekil 1.2 Ticari olarak bulunabilen değişik formlarda DKM çeşitleri.....	13
Şekil 1.3 Değişik şekil ve boyutlarda ticari Surgibone ksenograflar .....	13
Şekil 1.4 Neobone seramik kemik doku yedekleri.....	15
Şekil 2.1 Islak eğirme yöntemiyle kitosan bazlıfiber yapıların hazırlanması .....	24
Şekil 2.2 Çift emülsiyon yöntemiyle nanokapsüllerin hazırlanması.....	27
Şekil 3.1 BSA yüklü nanokapsüllerin SEM görüntüleri .....	35
Şekil 3.2 Nanoparçacıklar için tanecik büyüklüğü dağılımı .....	36
Şekil 3.3 Nanokapsüllerin inkübasyonu süresince ortam pHsındaki değişim .....	36
Şekil 3.4 BSA yüklü nanokapsüllerin inkübasyon esnasında çekilen SEM görüntüleri.....	37
Şekil 3.5 Değişik konsantrasyonlarda polimer çözeltileriyle hazırlanan nanokapsüllerin salım grafiği.....	40
Şekil 3.6 Polimerik nanokapsüllerden BMP salımı.....	41
Şekil 3.7 Desteklerin SEM fotoğrafları.....	42
Şekil 3.8 Desteklerin SEM fotoğrafları.....	44
Şekil 3.9 Hazırlanan çift katmanlı desteklerin kesit SEM görüntüleri.....	45
Şekil 3.10 Doku desteklerinin üç boyutlu görüntüleri.....	46
Şekil 3.11 CHI4-HAc2 doku desteğinin gözeneklilik dağılımı.....	47
Şekil 3.12 Fiber desteklerin inkübasyon öncesi ve sonrası SEM görüntüleri.....	48
Şekil 3.13 PLGA nanokapsül yüklenmiş desteklerin SEM görüntüleri.....	50
Şekil 3.14 Üstlerine nanokapsül yüklenmiş desteklerin SEM görüntüleri.....	51
Şekil 3.15 PLGA ve PHBV nanokapsüllerden ve bu kapsüllerle yüklü doku desteklerinden BSA salım grafikleri.....	52
Şekil 3.16 Çift katmanlı doku desteklerinden BSA salımı.....	54

## ÖZET

### **KEMİK DOKU MÜHENDİSLİĞİNE YÖNELİK BÜYÜME FAKTÖRLERİNİN SIRALI SALIMINI SAĞLAYAN NANOPARTİKÜL HAZIRLANMASI VE KİTOSAN YAPILARA EKLENEREK KOMPOZİT DOKU DESTEKLERİ OLUŞTURULMASI**

Kemik dokusunun laboratuvarında yapay olarak oluşturulması, kemik hasarlarında kullanılmak üzere doku mühendisliğinin umut verici bir yaklaşımıdır. Ancak doğayı taklit edebilen tamamen fonksiyonel üç boyutlu yapıların oluşturulması için gerekli hücre organizasyonu ve aktivitelerinin yapay olarak kontrolü henüz sağlanamamıştır. Bu sorunu çözmek amacıyla, son yıllardaki çalışmalar, hücre davranışlarını tetikleyecek ve kontrol edecek gerekli biyoaktif ajanların doğadakine yakın salımını sağlayabilen multi-fonksiyonel doku iskeleleri oluşturmak üzerine konsantre olmuştur. Bu proje kapsamında yapılan çalışmanın amacı, kemik iyileşme sürecini taklit edebilmek amacıyla hazırlanmış bir sıralı salım sistemi içeren fonksiyonel polimerik doku iskeleleri oluşturmaktır. Bunun elde edilmesi için izlenen yöntem, osteojenik büyüme faktörleri olan ve kemik morfojenik proteinleri (BMP) olarak isimlendirilen BMP-2 ve BMP-7'nin, doğada olduğu gibi sıralı salımını sağlayabilmek amacıyla bunların farklı bozunma hızı ve özelliklere sahip iki farklı polimerik nanokapsül (poli(laktik asit-ko-glikolik asit), PLGA, ve poli(3-hidroksibütirat-ko-3-hidroksivalerat), PHBV) içerisine hapsedilmesi ve erken dönemde BMP-2 ve geç dönemde BMP-7 salımı sağlayabilen bir sistem oluşturulmasıdır. Proje kapsamında nanopartiküller hazırlanmış ve BMP-2 ve BMP-7'nin tek, birlikte ve sıralı salım kinetikleri örnek bir protein olarak seçilen sığır serum albumini (BSA) ile incelenmiştir. Biyoaktif doku iskelelerinin tamamlanması için, nanopartiküller kitosan bazlı polimerik bir sistem içerisine yüklenmiştir. Bu sistemler tek katmanlı kitosan ve iki katmanlı kitosan-aljinat iskeleler olmak üzere iki çeşit hazırlanmış, ve iki büyüme faktörünü içeren nanotaneceklerin doğal oluşma sıralarını taklit ederek sıralı şekilde salınmasını sağlayacak olan yapı iskelelerine yerleştirilmesinin salım kinetiği üzerindeki etkisi incelenmiştir.

**Anahtar Sözcükler:** Kemik Doku Mühendisliği, Nanopartiküller, Islak Eğirme, Biyobozunur Polimerler.

## ABSTRACT

### **PREPARATION OF A NANOPARTICULATE SEQUENTIAL GROWTH FACTOR DELIVERY SYSTEM AND INCORPORATION INTO CHITOSAN-BASED SCAFFOLDS FOR BONE TISSUE ENGINEERING**

Tissue engineering is a promising strategy to produce artificial bone substitutes in the laboratories to be used in bone defects. However, the control of the cell organization and cell behavior to create fully functional 3-D constructs has not yet been achieved. To overcome this problem, the research in the last decades is concentrated on the development of multi-functional tissue engineering scaffolds capable of delivering the required bioactive agents to initiate and control cellular activities close to natural manner. The aim of this study was to prepare tissue engineered constructs composed of polymeric scaffolds carrying growth factor delivery system that would sequentially deliver the growth factors in order to mimic the natural bone healing process. To achieve this, the method followed is to encapsulate BMP-2 and BMP-7, osteogenic growth factors which are bone morphogenic proteins (BMP), in different polymeric nanocapsules (poly(lactic acid-co-glycolic acid), PLGA, and poly(3-hydroxybutyrate-co-3-hydroxyvalerate), PHBV) having different degradation rates and crystallinity properties, and therefore, different release rates to achieve the early release of BMP-2 and late release of BMP-7, as it is in nature. In the concept of the project, the nanoparticulate delivery systems were prepared and the effect of single, simultaneous and sequential delivery of BMP-2 and BMP-7 from these delivery systems was studied by using a model protein of bovine serum albumin (BSA). To complete the construction of the bioactive scaffold, this nanoparticles were incorporated into chitosan based polymeric systems. Two kinds of chitosan based polymeric scaffold systems were prepared as single layer chitosan scaffolds and double layered chitosan-alginate scaffolds, and the the effects of incorporation of nanoparticles into scaffolds in a way to mimic the natural sequential delivery of bioactive agents on the release kineticts were examined.

**Keywords:** Bone Tissue Engineering, Nanoparticles, Wet Spinning, Biodegradable Polymers.



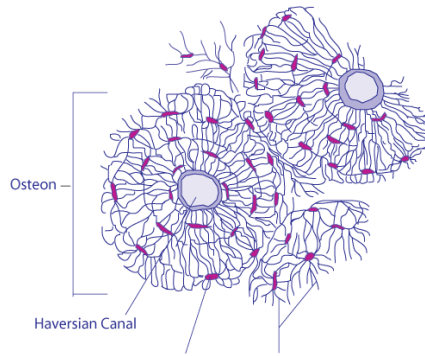
# GİRİŞ

## 1.1 Kemik

### 1.1.1 Kemiğin yapısı

İnsan vücudunun en sert kısmını oluşturan kemik dokusu, vücudu desteklemek, dik duruşu sağlamak, iç organları korumak, mineral depolamak ve kan üretmek gibi önemli görevleri yerine getirir. Kemik yapısı oldukça gelişmiş, düzenli ve sürekli değişime uğrayan bir dokudur. Yetişkin bir insan iskeletinde kemiklerin %80'ini sert kemik dokusu, %20'sini ise süngerimsi kemik dokusu oluşturur. Sert kemik dokusu, %5-10 oranları arasında değişen gözenekli yapısıyla kemiğin yoğun kısmını ve kemiğin dış çeperlerini oluşturur. Kemiğin iç kısmı ise süngerimsi yapıdadır, yoğunluğu düşüktür, ve kemik iliği ve damarları bu kısımda bulunur. Süngerimsi kemik yapısının etrafını sert kemik dokusu kaplar ve yapıyı korur. (Buckwalter ve ark., 1995).

Kemik dokusu; organik bazlı kolajen yapılar, inorganik bazlı hidroksiapatit mineralleri ve doğal bazlı olan kemik hücrelerinden (osteoblast, osteoklast, osteosit) oluşan hiyerarşik bir yapıya sahiptir. Temel yapı birimini birkaç milimetre uzunluğunda ve yaklaşık 0.2 mm çapında silindirik bir yapı olan Haversian sistemi (osteon) oluşturur (Şekil 1.1). Her bir osteon içinde sinirler ve damarları barındıran ve kolajenden oluşan bir ana kanal içerir. Bu ana kanala Haversian kanalı denir.



Şekil 1.1 Kemiğin enine kesitinden bir görüntü (Gray, 2000).

Her kemikte fazla sayıda osteon kemiğin ekseni boyunca paralel olarak bir araya gelerek sert kemik dokusunu oluşturur. Bu düzenli yapı kemiğin üstünde oluşabilecek basınç ve eğilme kuvvetlerine dayanmasını sağlar. Kemiklerin uç kısımlarına doğru yaklaştıkça osteonlar yayılarak ağ örgüsü gibi bir yapı oluşturur ve süngerimsi kemik dokusunu meydana getirir. Bu kısım ise kemik üzerinde oluşabilecek ani baskının bir noktada toplanmasını engelleyerek kemik içinde hızla yayılmasını, kolayca absorblanmasını ve dolayısıyla ani darbelerde kemiğin kırılmamasını sağlar.

### **1.1.2 Kemikte İyileşme Süreci**

Kemik dokusu insan hayatı boyunca, ilerleyen yaşla azalan bir aktiviteyle kendini sürekli yeniler. Kemik yapısı, kemik içinde bulunan hücrelerden osteoklastların aktivitesiyle bozulurken osteoblastların aktivitesi ile yeniden yapılandırılır. Bu yeniden modelleme esnasında ise kalsiyum döngüsü düzenlenir, küçük boyutlu hasarlar giderilir ve iskelet şekillendirilir. Kemik aynı zamanda kendi kendine iyileşebilme yeteneğine sahip bir dokudur. Kemikte iyileşme inflamatuvar, düzeltme ve yeniden yapılanma olmak üzere üç ana basamakta gerçekleşir. İnflamatuvar tepki, hasar meydana geldiği anda hasarın olduğu bölgede ortaya çıkan hematomla eş zamanlı olarak görülür. Hematom içinde lokal olarak üretilen sitokinler ve büyüme faktörleri osteoprogenitör hücreleri hasarlı bölgeye yönlendirerek bu hücrelerin belirli kemik hücrelerine özelleşmesini sağlar (Allori ve ark., 2008). Bu süreç esnasında pek çok büyüme faktörü, değişik zaman ve farklı konsantrasyonlarda ve işbirliği içinde aktiflik gösterirler ve kemik iyileşmesinin değişik kısımlarını düzenlerler (Hauschka ve ark., 1986). Osteokondüktif aktivitesi en yüksek büyüme faktörlerinden olan BMP-2 ve BMP-7'nin, sırasıyla hasarın birinci günü ve ikinci haftası içinde vücutta yoğun olarak salındığı, ve diğer faktörlerin yanı sıra kemik iyileşmesinde etkin olduğu literatürde belirtilmiştir (Cho ve ark., 2002).

Kemik iyileşmesinde ikinci basamak olan düzeltme kısmında, hasarın oluşmasından sonra yaklaşık olarak üç hafta içinde hasar bölgesinde kallus oluşumu gözlenir. İlerleyen zamanlarda bu yapıda aşamalı olarak yeniden yapılandırılır ve kemik 6-12 hafta içinde eski şekline ve gücüne kavuşur (Marieb ve Hoehn, 2007).

## **1.2 Kemik Tedavisi ve Rejenerasyonunda Klinik Yaklaşımlar**

Kemik dokusunun kendini iyileştirme ve yenileme özelliği olmasına karşın bu onarma sürecinin her zaman tatmin edici olmadığı gözlemlenmiştir. Kemik dokusunun rejenerasyon yani yenilenme yeteneği, hasarın büyük ve/veya çok parçalı olduğu durumlarda veya kemik tümörünün neden olduğu vahim durumlarda yetersiz kalmaktadır (Carano ve Filvaroff, 2003). Ayrıca, sıklıkla görülmemekle beraber, etkin bir iyileşmenin gözlemlenmediği durumlar tüm vakalar içinde %1-5 arasında bir oranda küçük hasarlarda da gözlemlenebilmektedir (Fernandez ve ark., 2001). Bu gibi durumlarda, kemikte meydana gelen boşluğu doldurmak ve kemiğin şeklini ve fonksiyonunu geri kazanmasına yardımcı olmak için hasarlı bölgeye uygun destek dolgular yerleştirmek iyileşmeyi sağlamak açısından gerekmektedir.

Günümüzde kemik transplantasyonları herhangi bir organ transplantasyonundan 10 kat daha fazla yapılmaktadır (Sutherland ve Bostrom, 2005). Kemik dokusu için kullanılacak ideal dolgu, doğal dokuyu taklit edecek gözenek ve yapıya sahip olan bir osteokondüktif destek matrisine sahip olmalıdır. Bu desteğin, osteoindüktif faktörler ve osteogenik hücreler ilavesi ile tedavide göstereceği etkinliği artırılabilir. Bu amaç doğrultusunda biyolojik ve sentetik doku nakilleri klinik uygulamalarda kullanılmaktadır.

### **1.2.1 Biyolojik Doku Nakilleri**

Kemik dokusunda oluşan hasarlarda tedavi amaçlı olarak en çok otojenik, allojenik ve ksenojenik kaynaklı biyolojik doku nakilleri kullanılmaktadır. Kadavralardan elde edilen kemik dokusu ile demineralize kemik matrisi ise biyolojik doku nakillerinde kullanılan diğer ana kaynaklardır (Ebraheim ve ark., 2001).

Aynı bireyin vücudunun bir parçasından alınıp yine kendisine nakledilen dokuya otograft denilmektedir. Günümüzde otograftlar, %80-90 arasında değişen yüksek başarı oranlarıyla en çok tercih edilen biyolojik doku graflarıdır (Nystorm ve ark., 2002). Otograftlar vücutla uyumlu, hastalık taşımayan ve canlı osteoblastlar içeren dokulardır. Osteoblastlar, ameliyat sonrası iyileşme döneminde özellikle önem taşıyan, yumuşak kallus oluşumunu sağlayan hücrelerdir (Sutherland ve Bostrom, 2005). Fakat kısıtlı mevcudiyeti ve enfeksiyon riski, sebep olduğu ağrı, uzun anestezi süresi ve ameliyat esnasında yaşanan yoğun kan kaybı bu

methodun tercih edilme oranı oldukça azaltmakta ve otograft kullanımını azaltmaktadır (Younger ve Chapman, 1989).

Allograft, bir bireyden alınıp başka bir bireye nakledilen dokuya verilen isimdir. Bu tip nakillerde, bulunabilirlik oranı otograflarda olduğu gibi kısıtlı değildir. Allojenik transplantasyon teknikleri çok gelişmiş olsa da, nakledilen dokunun vücut tarafından reddedilme ve enfeksiyon riski halen sıklıkla karşılaşılan komplikasyonlardır (Mankin ve ark., 1992; Sutherland ve Bostrom, 2005). Ayrıca, implantasyon öncesi gerekli olan sterilizasyon ve detaylı test işlemleri allograftların osteoinduktif ve osteokonduktif özelliklerini olumsuz olarak etkilemektedir. Ayrıca, donör azlığı nedeniyle taze doku elde edebilme zorluğu bulunmaktadır. Bu sebeplerden dolayı allojenik kemik dokusu nadiren taze olarak kullanılabilir. Genellikle bu dokular topluca steril edilmekte ve  $-60^{\circ}\text{C}$ 'nin altında veya osteoprogenitör hücreleri ve osteoinduktif faktörleri yok eden dondurarak kurutma işlemi ile dondurularak saklanmaktadır. Bir başka allograft kaynağı olarak kullanılan kadavra kemik dokusu da benzer işlemlerden geçirilmektedir. Değişen özellikleri nedeniyle allograftlar ancak osteokonduktif yapı iskeleleri olarak kullanılabilirler.

Demineralize kemik matrisi (DKM) allograft kemik dokusunun asitle özütünün çıkarılması ile elde edilmektedir. Bu da pek çok mineralize bileşenin, kolajenin ve büyüme faktörlerini de içeren proteinlerin kaybedilmesine sebep olmaktadır (Khan ve ark., 2005). DKM'nin kemik graftı olarak başarısı matris içinde korunabilen BMPlerin konsantrasyonuna ve birbirlerine oranlarına bağlıdır. DKM osteoinduktif özellik taşıyan tek allografttır fakat başarı oranı yüksek farklılıklar göstermektedir. Değişik kaynaklardan alınan allograftların spinal füzyonu başlatmaktaki başarısının allograftların elde edilme işlemlerine bağlı olarak değiştiği bilimsel çalışmalarla gösterilmiştir (Peterson ve ark., 2004). Günümüzde DKM toz, parçacık veya jel formlarında bulunabilmektedir (Şekil 1.2).

Ksenotransplantasyon, yaşayan hücre, doku veya organların başka bir türden alınıp bir türe nakledilmesi işlemidir. Ksenotransplantasyon dünya çapında organ nakli ihtiyacı için bir çözüm sunmasına karşın türler arası hastalık transferi gibi pek çok tıbbi, hukuki ve etik sorunu da beraberinde getirmektedir. Tarihteki ilk ksenograft, insandaki bir kafatası hasarını onarmak için köpekten alınan kemik dokusunun kullanılmasıyla gerçekleştirilmiştir (van Meerkeren ve ark., 1668). Graft malzemesi olarak büyük baş hayvan kemik dokusu ilk kez 1957 yılında

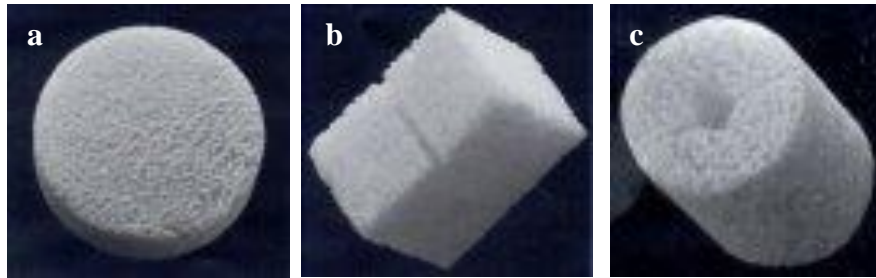
ortaya çıkmıştır (Maatz ve Baurmeister, 1957) ve günümüzde pek çok çeşiti Surgibone® ismiyle ticari olarak kullanılmaktadır (Şekil 1.3).

Sitotoksik/sistemik etkileri, potansiyel antijen oluşumu ve bağışıklık sistemi tepkilerini önlemek ve pirojen maddelerden arındırılmak için sterilize edilen ksenograftlar ancak osteokondüktif matrisler olarak kullanılabilirler (Chau ve Mobbs, 2009).



**Şekil 1.2** Ticari olarak bulunabilen değişik formlarda DKM çeşitleri (Firma: Exactech, Optecure® allograft çeşitleri

(a) Optecure® jel allograft; (b) plaka (c) küresel (d) toz (e) Optecure kortikal süngerimsi tanecikler (<http://www.exac.com/products/biologics/optecure-optecure-ccc>).



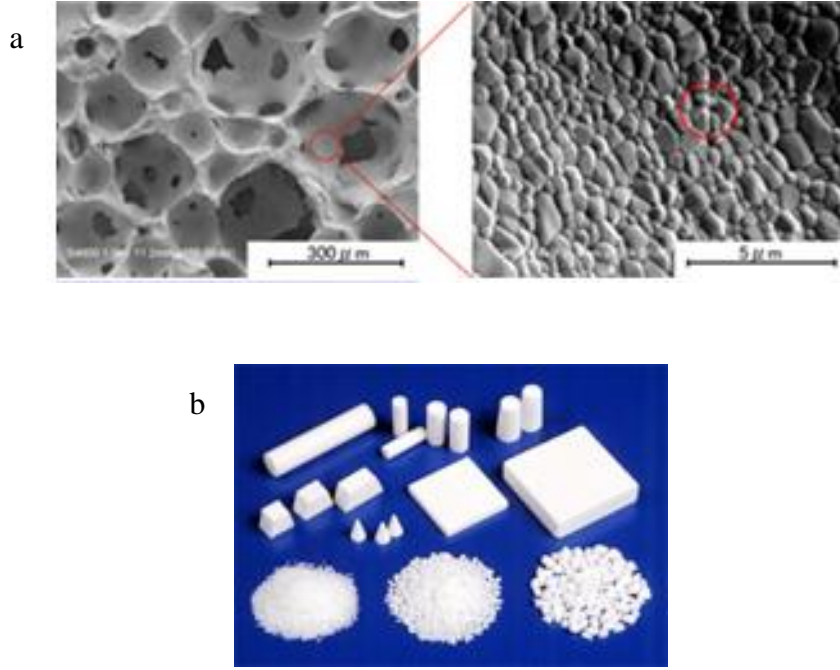
**Şekil 1.3** Değişik şekil ve boyutlarda ticari büyük baş Surgibone® ksenograftlar, (a) disk şeklinde, (b) dikdörtgen prizma, (c) silindirik sünger. ([www.canmedica.com/Unilab/Surgibone.htm](http://www.canmedica.com/Unilab/Surgibone.htm)).

### 1.2.2 Sentetik Doku Nakilleri

Dinamik yaşamın yoğunlaştığı, insanların hareketinin arttığı ve trafiğin her geçen gün hızlandığı göz önüne alınırsa, kazalar nedeni ile meydana gelecek kemik hasarlarının da artması beklenen bir olgudur. Bir yılda, sadece Amerika Birleşik Devletlerinde yaklaşık 6,2 milyon kemik hasarı meydana gelmekte ve bunların %15'i bir çeşit kemik transplantasyonu gerektirmektedir (Sutherland ve Bostrom, 2005). Bu sebeple, yeni, biyouyumlu ve istenilen sağlık ve özellikle malzemelerin geliştirilmesi ve kemik doku naklinde kullanılması büyük önem taşımaktadır. Ayrıca, tahminlere göre 2020 yılına kadar 50 yaşın üstünde, kemik hastalıklarından etkilenecek insan sayısının şu anda bulunan sayının iki katına çıkması beklenmektedir (Navarro ve ark., 2008). Biyolojik doku nakillerinin yukarıda açıklanan kısıtlı eldesi ve hastalık taşıma riski sebebiyle, istenilen mekanik ve biyouyumluluk özelliklerine sahip malzemelerin sentetik olarak üretilmesi için araştırmalar yoğun olarak sürdürülmektedir. Klinik uygulamalarda öncelikli olarak doğal ve sentetik polimerler, seramik, metalik ve kompozit greftler kullanılmaktadır. Sözü edilen ve canlı olmayan bu kemik doku graf malzemeleri, hasarlı alanı yapısal ve mekanik olarak uygun bir şekilde doldurabilse bile komşu dokularla uygun bir etkileşim içine girmekten ve tam bir biyouyum sağlamaktan yoksun kalmaktadır.

Metalik malzemeler; özellikle paslanmaz çelik, kobalt-krom alaşımları ve titanium ortopedik cerrahide sıklıkla kullanılmaktadır. Özellikle uzun süreli implantlarda, aşınmaya karşı yüksek dayanıklılığı ve kemik dokusu ile bütünleşebilme özellikleri nedeniyle titanyum ortopedik kullanımlarda tercih edilen bir malzeme olmuştur.

Günümüzde kullanılan kemik doku yedeklerinin %60'ını seramik malzemeler oluşturmaktadır (Laurencin ve ark., 2006). Seramiklerin şekillendirilmesi için yüksek sıcaklık gerektirmesi ve kırılma olmaları sebebiyle başka malzemelerle hazırlanan kompozit yapıları tercih edilmektedir. Kemikteki başlıca anorganik maddenin hidroksiapatit (HAp) olması sebebiyle özellikle kalsiyum fosfat, sentetik hidroksiapatit ve mercanlı hidroksiapatit içeren seramikler oldukça revaçtadır. Oluşan yeni kemik dokusunun yapı iskelesine nüfuz etmesini sağlayan gözenekli hidroksiapatit kemik yedekleri, ticari olarak Neobone® adı altında pek çok çeşitte bulunabilmektedir (Şekil 1.4).



**Şekil 1.4** Neobone ® seramik kemik doku yedekleri, (a) mikroyapı, (b) silindirik ve dikdörtgen prizma sünger, toz ve parçacıklı yapıları içeren çeşitli formlar (<http://www.covalent.co.jp/eng/products/bio/neobone.html>).

Polimerler, kemik doku yedeği olarak sıklıkla kullanılan malzemelerdir. Hench'in sınıflandırmasına göre ortopedik cerrahide kullanılan birinci nesil polimerler, bağışıklık tepkisi yaratmayacak ve yabancı cisim reaksiyonunu en aza indirecek etkisiz polimerlerdir. Birinci nesil polimerler silikon, akrilik rezinler, polietilen (PE), polipropilen (PP), polimetilmetakrilat (PMMA) gibi polimerleri içermektedir (Hench, 1980).

İkinci nesil polimerler, yeni doku oluştuğunda çözünmeye uğrayan biyobozunur malzemelerin kullanılmasıyla geliştirilen ve biyolojik çevreyle etkileşime girebilen, doku ve implant arasındaki bağlanmayı arttıran biyoaktif malzemelerdir (Navarro ve ark., 2008). Bu tip polimerler ortopedik uygulamalarda sıklıkla kullanılmaktadır. Ayrıca kullanılan polimerlerin yüzeyleri HAp katmanlarıyla modifiye edilerek mineralleşme süreci hızlandırılabilir (Kato ve ark., 1996; Ma ve ark., 2002).

Üçüncü nesil polimerler moleküler düzeyde, özelleşmiş hücrel aktiviteleri teşvik edebilen malzemelerdir (Hench ve Polak, 2002). Hücrelerin yapışması ve çoğalmasını sağlayan üç

boyutlu gözenekli yapılar ve ekstrasellüler matrisi taklit eden, peptit sıralamalarıyla işlevselleştirilmiş yüzeyler üçüncü nesil polimerlerin kullanımıyla geliştirilmiştir (Hutmacher ve ark., 2000; Temenoff ve Mikos, 2000; Agrawal ve Ray, 2001). Bu tip polimerlerin geliştirilmesiyle oluşturulan yapı iskeleleri kemik doku mühendisliğinde kullanılmaktadır.

### **1.3 Kemik Tedavisinde Alternatif Bir Yöntem: Doku Mühendisliği**

Malzeme alanındaki bütün gelişmelere rağmen, kemik dokusu için uygun bir yedek malzemesi henüz geliştirilememiştir. Kemik dokusu yerine kullanılacak olan yedeğin; tercihen hastanın kendisine ait canlı hücreler içermesi, gerekli yapısal ve mekanik özellikleri taşıyan bir yapı iskelesine sahip olması ve hücre davranışlarını düzenleyecek biyoaktif ajanlar taşıması gerekmektedir. Doku mühendisliği bu tip üç boyutlu ve canlı öğeler taşıyan işlevsel yapıların geliştirilmesinde umut veren alternatif bir yöntemdir.

Doku mühendisliği; tıp, malzeme bilimi, mühendislik, kimya ve biyoloji gibi alanları pek çok açıdan birbirine bağlayan çok disiplinli bir alandır. Sıklıkla kullanılan tanımına göre doku mühendisliği, ‘bir dokunun yada organın işlevini yerine getirmeye, korumaya veya iyileştirmeye yarayacak biyolojik yedekler geliştirmek için mühendislik ve yaşam bilimlerini birleştiren interdisipliner bir alandır’ (Langer ve Vacanti, 1993). Doku mühendisliği, biyobozunur ve biyoyumlu yapı iskelelerinin, uygun kaynaklardan izole edilen hücrelerin ve biyoaktif ajanların doku destek malzemelerinin hazırlanması amacıyla kullanımını kapsamaktadır.

Kemik doku mühendisliğinde izlenen genel strateji; kemik hücrelerini kaynağından izole etmek, in vitro hücre kültür ortamında çoğaltmak, hasarlı kısmın yapısal ve mekanik gereksinimlerini karşılayabilecek özelliklere sahip biyoyumlu ve biyobozunur bir yapı iskelesine yerleştirmektir. Ayrıca, kemik oluşumunu hızlandıracak uygun büyüme faktörleri de iyileşmeyi hızlandırmak amacıyla kullanılmakta ve bu yapılara eklenmektedir. Hücre ekilmiş bu yapının tercihen biyoreaktör kullanılarak in vitro ortamda olgunlaştırılmasından sonra, hazırlanan destek yapı istenilen hedef bölgeye yerleştirilmektedir. Zaman içinde, hücreler çoğalarak kendi ekstrasellüler matrislerini üretecek ve sentetik yapı iskelesininin yerini dolduracaktır. Bu esnada biyobozunur yapı iskelesi de parçalanmaya başlayacaktır. Böylece kemik dokusunun kendini yenilemesi ve tekrar modellenmesi için gereken uygun ortam oluşturulabilecektir (Freyman ve ark., 2001).



### **1.3.1 Kemik Doku Mühendisliğinde Kullanılan Yapı İskeleleri**

Doku mühendisliğinde kullanılan yapı iskeleleri rejenerasyonu destekleme ve yönlendirmede ve son şekli tanımlamada önemli bir rol oynamaktadır. Doku mühendisliğinde kullanılacak olan yapı iskeleleri aşağıda verilen kriterleri karşılamalıdır (Spaans, 2000; Boccaccini, 2002):

- biyouyumlu olmalıdır,
- biyobozunur olmalıdır,
- dokunun iyileşme hızına uyumlu olarak bozunmalıdır,
- bozunma sonucu ortaya çıkan ürünler toksik olmamalıdır,
- yük taşıyan konumlarda kemik dokusunun yenilenmesi için uygun mekanik özelliklere sahip olmalıdır,
- yeni kemik oluşumunun ilk aşamaları boyunca bütünlüğünü korumalıdır,
- osteokonduktif olmalıdır,
- hasarlı kısmın şekliyle uyumlu olmalıdır,
- gerekli damarlaşma, doku büyümesi ve beslenmeye olanak sağlayacak gözenekli bir yapıya sahip olmalıdır.

#### **1.3.1.1 Yapı İskelelerinde Kullanılan Malzemeler**

Kemik doku mühendisliğinde kullanılan malzemeler genel olarak doğal veya sentetik kaynaklı biyobozunur polimerlerdir. Buna ek olarak yapılara kalsiyum fosfat ve HAp eklenmesi de revaçtadır.

##### **1.3.1.1.1 Doğal Polimerler**

Pek çok doğal polimer kemik doku mühendisliği amaçlı yapı iskelesi üretiminde başarıyla kullanılmaktadır. Doğal polimerler, canlı yapıların doğal bileşenleri olmaları ve doğal dokularla aralarında biyolojik ve kimyasal benzerlikler bulunması sebebiyle kemik doku mühendisliğinde özellikle ilgi çekmektedirler. Kollajen (Anselme ve ark., 2000; Xiao ve ark., 2003; Kos ve ark., 2004; Ber ve ark., 2005; Lyons ve ark., 2010; Saeidi ve ark., 2011) ve ipek (Altman ve ark., 2003; Meinel ve ark., 2005; Fuchs ve ark., 2009; Zhao ve ark., 2009; Sengupta ve ark., 2010; Wei ve ark., 2011) gibi proteinler; aljinik asit (Wang ve ark., 2003; Grellier ve ark., 2009; Kolambkar ve ark., 2011), nişasta (Marques ve ark., 2002; Salgado ve

ark., 2007; Martins ve ark., 2009; Goncalves ve ark., 2011) ve kitosan (Vandevord ve ark., 2002; Khor ve Lim, 2003; Ho ve ark., 2005; Qiu ve ark., 2009; Abarrategi ve ark., 2010; Wang ve ark., 2011) gibi polisakkaritler ve bakteri kaynaklı poli hidrosialkanatlar (Kos eve ark., 2003; Shishatskaya ve ark., 2006; Kenar ve ark., 2008; Wu ve ark., 2009; Ke ve ark., 2010) gibi polyesterler pek çok in vitro ve in vivo çalışmada kullanılmıştır.

Kitosan, kitinin deasetilasyonu ile elde edilen doğal bir polimerdir. Glikozanaminoglikanlarla (GAG) arasındaki yapısal benzerlik ve enzimlerle bozunabilir olması sebebiyle pek çok doku mühendisliği uygulaması için çalışılmış ve üzerinde yoğun araştırmalar yapılmıştır. (1-4)-D-glikozamin ve N-asetil-D-glikozaminlerden oluşan doğrusal bir polisakkarit olup doğada en çok bulunan organik maddelerden biridir (Drury ve Mooney, 2003). Kitosan, serbest amino grubunun protonlanmasıyla seyreltik asidik çözeltilerde çözünebilir. Çözündükten sonra ise, pH artırılarak veya bir çöktürme çözeltisi kullanılarak jelleştirilebilir. Kitosan biyouyumluluk, fizyolojik uyum, biyobozunurluk, antibakteriyel özellikler gibi özellikleri sebebiyle medikal uygulamalarda kullanılmak amacıyla üzerinde yoğun çalışılan bir polimerdir (Nishimura ve ark., 1984; Tanigawa ve ark., 1992; Okamoto ve ark., 1993; Mori ve ark., 1997; Tokura ve ark., 1997; Singla ve Chawla, 2001; Khor ve Lim, 2003; Jiang ve ark., 2010; Depan ve ark., 2011). Kitosan- kalsiyum fosfat bileşimleri kullanılarak hazırlanan gözenekli yapılar da özellikle kemik doku mühendisliği amacıyla ve sert doku iyileşmesinde destek malzemesi olarak kullanabilmek amacıyla üzerinde araştırmalar yapılan kompozit malzemelerdir (Zhang ve Zhang, 2002; Martino ve ark., 2005; Tanese ve ark., 2011). Kitosan ayrıca HAp ile birlikte tibyal kırıkların tedavisinde de kullanılmıştır (Kawakami ve ark., 1992).

### **1.3.1.2 Yapı İskelesi Üretim Teknikleri**

Yapı iskelelerinin şekil ve gözenekliliği, hücresel aktivitelerin devamı ve bağ dokuların oluşumu açısından oldukça önem taşıyan parametrelerdir (Benya ve Schaffer, 1982). Bir yapı iskelesinin şekli, hücre tutunmasının geometrisini ve dolayısıyla hücre yayılmasını ve oryantasyonunu doğrudan etkilemektedir. Bu sebeple, hücresel aktivitelerin kontrolünde yapı iskelesinin mimarisinin büyük önem taşıdığına inanılmaktadır.

Gözenekli yapı, üç boyutlu bir yapı iskelesinde oksijen geçişi, hücre beslenmesi, damarlaşma ve doku büyümesine etki eden önemli bir faktördür. Bu sebeple, üç boyutlu gözenekli yapılar elde etmek amacıyla çeşitli yöntemler geliştirilmiştir. Aşağıda bu yöntemler açıklanmaktadır.

#### **1.3.1.2.1 Islak Eğirme**

Doku mühendisliği amacıyla hazırlanan destek yapıların gözenekli olması büyük önem taşımaktadır ve özellikle son yıllarda çalışmalar lifli yapı iskeleleri üzerine yoğunlaşmıştır. Bu yapılar, hücre geçirgenliği, besin alışverişi ve doku büyümesi için ideal gözenekli yapıya sahip olacak şekilde tasarımılandırılabilirler.

Polimerik fiberler üç ana yöntemle elde edilebilmektedir: eriterek eğirme, kuru eğirme ve ıslak eğirme. Eriterek eğirme yönteminde, eriyik halde uygun akışkanlıktaki polimerin yüksek basınç altında sabit hızda sıkılmasıyla devamlı lifler elde edilmektedir (Buttafoco ve ark., 2004). Kuru eğirme yönteminde aynı işlem eriyik polimer yerine polimer çözeltisi kullanılarak gerçekleştirilmektedir (Lazzeri ve ark., 2005). Islak eğirme yönteminde ise polimer çözeltisi bir çöktürme banyosu içine sıkılmakta ve bu şekilde polimerik fiberler elde edilmektedir (Nelson ve ark., 2003; Funakoshi ve ark. 2005; Chung ve ark. 2005; Leonor ve ark., 2011). Son zamanlarda elektriksel potansiyel kullanarak polimer çözeltisinden fiber elde edilmesini sağlayan elektrikli eğirme metodu da sıklıkla kullanılmaya başlanmıştır. Islak eğirme ve elektrikli eğirme yöntemlerinin birleştirilmesi, doğal ekstrasellüler matrisin mikro ve makro yapısının taklit edilmesinde umut vaat eden bir yöntem olarak gösterilmiştir (Tuzlakoğlu ve ark., 2005; Santos ve ark., 2008; Puppi ve ark., 2011).

### **1.3.2 Kemik Doku Mühendisliğinde Kullanılan Büyüme Faktörleri**

Büyüme faktörleri pek çok hücre çeşidi tarafından salgılanan işaretçi moleküllerdir. Başlıca görevleri hücrel aktiviteyi düzenlemek olan büyüme faktörleri konsantrasyon ve zamana bağlı olarak aktivite göstermektedirler.

Büyüme faktörleri başarılı bir doku mühendisliği uygulamasının en önemli öğelerindendir ve kademeli bir şekilde gerçekleşen kemik rejenerasyonunu, hücrel aktiviteyi kontrol ederek yönlendirdikleri bilinmektedir. Kemik iyileşmesi ve rejenerasyonundan sorumlu olan büyüme faktörleri TGF- $\beta$  üst familyasının üyeleri olan kemik morfojenik proteinleri (BMP), insülin benzeri büyüme faktörü (IGF), fibroblast büyüme faktörü (FGF), platelet üretimi büyüme

faktörü (PDGF) ve vasküler endotelial büyüme faktörü (VEGF) dür (Allori ve ark., 2008). Hücrelerin tutunması, çoğalması ve farklılaşması için bu faktörlerin bir veya birkaçının kullanılması büyük önem taşımaktadır.

### **1.3.2.1 Kemik Morfojenik Proteinleri (BMP)**

BMPler şimdiye kadar tanımlanmış, osteoinduktif etkisi en yüksek büyüme faktörleridir (Cowan ve ark., 2005). BMPler mezenşimal kök hücrelerin in vivo ortamda osteoblastik ve kondroblastik farklılaşmalarını ve çoğalmalarını sağlayarak kemik ve kıkırdak dokusu oluşumunda önemli bir rol oynamaktadır (Urist, 1965; Wang ve ark., 1990). Kemik morfojenik proteinleri içinden BMP-2'den BMP-18'e kadar numaralandırılmış olanlar insanda tanımlanmıştır. Bunlar arasından BMP-2, 4, 6, 7 ve 9 kemik morfojenine sebep olduğu bilinen ve yüksek osteojenik özellik taşıyan büyüme faktörleridir (Bessa ve ark., 2008). BMP-2 ve BMP-7 kemik oluşumunu başlatma ve olgunlaştırma süreçlerinde yüksek etkinlik gösteren ve FDA tarafından kollajen taşıyıcılar içinde spinal füzyon uygulamalarında kullanılmak üzere onaylanmış büyüme faktörleridir (White ve ark., 2007; McKay ve ark., 2007).

BMPlerin zamana bağlı aktivitesi sebebiyle, bu büyüme faktörlerinin kombinasyonlar halinde veya salım zamanları ve aralıkları ayarlanarak sıralı şekilde vücuda verilmesi, kemik doku mühendisliğinde kullanılan geleneksel yöntemler karşısında büyük bir avantaj yaratabilir. Kullanılacak BMPnin konsantrasyonu ve salınacak dozun kontrol edilebilmesine olanak sağlayacak uygun bir taşıyıcı osteojenik potansiyeli arttırmak için azami önem taşımaktadır. Dolayısıyla, bu proje kapsamında bu iki büyüme faktörü seçilmiş ve hazırlanan desteklere yüklenerek salım kinetikleri incelenmiştir.

### **1.4 Doku Mühendisliğinde Kontrollü Büyüme Faktörü Salımı**

Daha önce de açıklandığı gibi, doku mühendisliğinde kullanılan genel strateji hücrelerin uygun bir yapı iskelesine yüklenmesi ve implantasyondan önce in vitro ortamda çoğaltılmasıdır. Fakat böyle bir sistemde araştırmacının implantasyondan önce veya sonra, hücrelerin olgunlaşma hızı ve farklılaşması üzerinde bir kontrolü bulunmamaktadır. İmplantasyona uygun bir yapı iskelesi hazırlanmasında, hücrelerin olgunlaşma hızı ve farklılaşması da en az yapının mineralleşmesi kadar önemli bir faktör olduğundan, bu

özellikler üzerinde daha fazla kontrole sahip olmak arzu edilen bir olgudur. İn vivo ortamda bu özellikler büyüme faktörleri tarafından kontrol edilmektedir. Bu büyüme faktörlerinin dozajının ve salım süresinin doğal ortamda biyolojik olarak sıkı bir şekilde kontrol edildiği bilinmektedir.

Klinik ortopedik uygulamalarda büyüme faktörleri, bir seferde ya da tekrar eden enjeksiyonlar halinde yüksek dozlarda vücuda verilmektedir. Fakat bu uygulamalarda söz konusu biyoaktif ajanın büyük bir kısmı hedef alandan sızıntı veya denatürasyon sonucu kaybedilmektedir (Lee ve Shin, 2007).

Bu sebeple, büyüme faktörlerinin koruyucu bir taşıyıcı içine hapsedilmesi, oldukça pahalı olan büyüme faktörlerinin biyoaktivitesinin ve lokal konsantrasyonunun korunması açısından büyük önem taşımaktadır. Bu faktörlerin belli bir tasarım içinde bir yapı iskelesi içine yerleştirilmesi, hem faktörlerin salım hızının hem de yapı iskelesinin toplam olarak etkinliğinin ayarlanmasına olanak verebilecek ve böylece kemik büyümesi kontrol altına alınabilecektir. Dolayısıyla, kemik doku mühendisliğinin, yapı iskeleleriyle kontrollü salım sistemlerini birleştirerek doğal ECMi taklit etmesi ve çok fonksiyonlu destek yapılar ortaya çıkarması beklenir. Taşıyıcı sistem, yapay ECM işlevi görmek yanı sıra hapsedilen büyüme faktörlerini de koruyacaktır. Ancak, özellikle protein taşıma sistemlerini üretmek, yüklem esnasında proteinlerin denatüre veya deaktive olma olasılığı sebebiyle zor bir süreçtir. Bu sebeple, taşıma sistemleri hazırlanırken ağır şartlar, güçlü çözücüler veya yüksek sıcaklık gerektirmeyen metotlar kullanmak gibi zorunluluklar bulunmaktadır.

BMPLerin kemik rejenerasyonu üzerindeki büyük etkisinin fark edilmesi üzerine (Urist, 1965), sürekli salımlarını sağlamak için pek çok strateji geliştirilmiştir. Nano ve mikro boyutlarda, genellikle sentetik malzemeler (Lee ve ark., 1994; Schrier ve ark., 2001; Kempen ve ark., 2008; Jeon ve ark., 2008; Lee ve ark., 2011); doğal polimerler (Tabata ve ark., 1998; Wang ve ark., 2003; Chen ve ark., 2007; Bessa ve ark., 2008; Patel ve ark., 2008; Haidar ve ark., 2010) ve HAp temelli parçacıklar (Matsumoto ve ark., 2004; Akazawa ve ark., 2006; Xie ve ark., 2011) taşıyıcı olarak çalışılmıştır. BMPLerin taşınmasında sıklıkla çalışılan ve kemik doku mühendisliğinde başarıları gösterilmiş önemli bir malzeme de poli(laktik glikolik asit), PLGA, dir (Lee ve ark., 1994; Schrier ve ark., 2001; Jeon ve ark., 2008).

#### 1.4.1 Nanoteknolojinin Kontrollü Salım Üzerindeki Etkisi

Nanoteknoloji alanındaki gelişmeler ve bu teknolojinin biyomedikal alandaki uygulamaları ilaç salım sistemlerinin geliştirilmesi üzerinde önemli rol oynamıştır. Nanoparçacıklar kılcal damarlarda hareket edebilme özellikleri sonucu hücreler tarafından alınabilmekte ve yoğun ESM içinde mikro boyutlu parçacıklara göre daha rahat dağılabilmektedirler. Nanoparçacıkların kullanımıyla daha önce ulaşılamayan hedef bölgelere ulaşabilmekte ve daha az ilaç kullanılarak daha etkili hedefleme yapılabilmektedir.

Farklı tanımlamalar yanında, genellikle boyutu 10-100 nm arasında değişen parçacıklara nanoparçacık denilmektedir (Brigger ve ark., 2002). Biyoaktif ajanlar nanoparçacıklarla yüzeye tutunma, bağlanma, içine hapsedilme veya ajanın doğrudan nanoparçacık içinde çözünmesi metotlarıyla birleştirilebilmektedir. Hazırlama metoduna göre katı ve oyuklu nanoküreler, nanokapsüller, nanotüpler, veya gözenekli nanoparçacıklar elde edilebilmektedir. En çok tercih edilen taşıma sistemleri, üretim aşamasında boyutları küçültülebilen mikro ve nanoküreler, mikro ve nanokapsüller, misel ve lipozomlardır. Büyüme faktörü, ilaç veya protein gibi aktif ajanlar, nanoküreler içinde düzgün dağılırken, içi oyuk nanokapsüller kullanıldığında yapının içine hapsolmaktadırlar (Sahoo ve Labhasetwar, 2003). Miseller ve dendrimerler de ilaç taşımada dikkat çeken diğer taşıyıcılardır.

Biyoyumlu ve biyobozunur polimerler olan PLGA ve PHBVnin nanoparçacıkları biyoaktif ajan taşınmasında başarısı bilimsel çalışmalarla gösterilmiştir (Kempen ve ark., 2008; Wei ve ark., 2007; Jaklenec ve ark., 2008; Kang ve ark., 2008; Kim ve ark., 2006; Baran ve ark., 2002). Bu polimerlerin kullanımıyla elde edilen değişik salım hızları, söz konusu polimerlerin farklı hidrofilik özellikleri, kristallilikleri ve bozunma hızlarından kaynaklanmaktadır. Bu parametreler daha önce de salım hızlarını kontrol etmek amacıyla kullanılmıştır (Burgess ve Hickey, 1994). Bunlara ek olarak molekül ağırlığı ve taşıyıcı karakteristikleri de ( parçacık boyutu, yükleme prosedürü) salım hızını değiştiren faktörlerdir (Lemaire ve ark., 2003; Zolnik ve ark., 2006; Cui ve ark., 2005). PHBV ile karşılaştırıldığında, benzer kimyasal yapılarına rağmen PLGA in vivo ortamda çok daha hızlı bozunmaktadır (Kök ve Hasırcı, 2003). Dolayısıyla diğer bütün değişkenler birbirine yakın olduğunda da (molekül ağırlığı, kristallikleri vb.) PLGA'in daha hızlı bozunması beklenmektedir.

#### **1.4.2 Doku Mühendisliği Amaçlı Hazırlanan Yapılardan Çoklu Büyüme Faktörü Salımı**

Doku mühendisliği amaçlı büyüme faktörü salımında en son yaklaşım, birleştirilmiş bir yapı iskelesi/ kontrollü salım sistemi ile aynı yapı iskelesinden çoklu büyüme faktörü salınmasıdır. Kemik iyileşmesinde doğayı taklit etmek etkili bir metot olsa da bu konu üzerinde literatürde çok fazla çalışma bulunmamaktadır.

Daha önce de belirtildiği gibi BMPler osteoinduktif etkisi en fazla olan ve kemik iyileşmesi ve oluşumunda fonksiyon gösteren büyüme faktörleridir. BMP-2 ve BMP-7 nin (BMP ailesinin FDA onaylı üyeleri) kemik oluşumu ve rejenerasyonu süresince sıralı olarak etkinlik gösterdikleri bilinmektedir. BMP-2, kemikte hasar oluşumundan hemen sonra ortaya çıkarken, BMP-7 hasarın 14. gününde oluşmaktadır. Bu sebeple, bu iki büyüme faktörünün sıralı salımı, doğal süreci taklit ederek kemik iyileşmesini hızlandırmada umut vaat eden bir strateji olarak görülmektedir.

#### **1.5 Çalışmanın Amacı**

Bu çalışmanın amacı doğadaki kemik iyileşme sürecini taklit ederek BMP-2 ve BMP-7 faktörlerinin sıralı salımını yapacak çok fonksiyonlu polimerik yapı iskeleleri tasarlamak ve oluşturmaktır. Bu amaç doğrultusunda BMP-2 ve BMP-7 proteinleri, bozunma hızları birbirinden farklı olan polimerik nanokapsüller içine hapsedilmiştir. Bunlardan BMP-2, bozunma hızı daha fazla olan PLGA, ve BMP-7 ise bozunma hızı daha yavaş olan PHBV nanotanecikler içine yüklenmiştir. Bu yolla, hazırlanan ilaç taşıyıcı sistemin, sıralı salım sağlayacak kinetik yapıya sahip olması sağlanmıştır. Bu şekilde hazırlanan nanotanecikler içine öncelikli olarak örnek bir protein olarak BSA yüklenmiştir, ve her iki tip nanotanecikten BMP-2 ve BMP-7'nin salım kinetiği incelenmiştir. Çalışmanın devamında ise, büyüme faktörlerinin tek tek ve birlikte farklı tip kürelere veya aynı tip kürelere yüklenmesinin salım kinetiği üzerindeki etkileri incelenmiştir. Nanoküreler ve salım kinetiği optimize edilmiş taşıyıcılar, daha sonra kitosandan hazırlanan fibroz ve gözenekli polimerik yapı iskeleleriyle iki değişik yöntem ile birleştirilmiştir. Nanotanecikler ya kitosan fiberlerin içine hazırlanış sırasında konmuş veya fiberler hazırlandıktan sonra basınç-vakum döngüsü ile eklenmiştir. Hazırlanan sistemlerden BMP-2 ve BMP-7'nin salım kinetikleri incelenmiştir.

## 1.6 Çalışmanın Özgün Değeri

Doku mühendisliğinde yeni yaklaşım, biyoaktif ajanlar içeren çok fonksiyonlu yapı iskeleleri hazırlamaktır. Literatürdeki çalışmalarda bu tip yapı iskelelerinin genellikle büyüme faktörlerinin polimer çözeltisi içine karıştırılarak hazırlandığı görülmektedir. Fakat bu şekilde hazırlandığı takdirde, salım sistemi üzerinde herhangi bir kontrol kurulamamaktadır. Diğer bazı çalışmalarda ise, büyüme faktörleri mikroparçacıklar ile yapı iskelelerine yüklenmiş bu da iskelelerin yapısında bozulmalara sebep olmuştur. Bu proje kapsamında iki önemli osteojenik büyüme faktörü, BMP-2 ve BMP-7, bozunma hızları farklı olan iki farklı tip biyouyumlu nanokapsüller içine hapsedilmiş ve sonrasında üç boyutlu yapı iskelelerine yapıyı bozmadan yerleştirilmiştir. Böylelikle doğal iyileşme sürecini taklit edebilecek çok fonksiyonlu ve üçüncü jenerasyon yapı iskeleleri üretilmiştir.



## GEREÇ VE YÖNTEM

### 2.1 Malzemeler

Bu çalışmada kullanılan kimyasallar ve bu kimyasalların alındığı firmalar Tablo 2.1’de verilmiştir.

**Tablo 2.1** Kimyasallar

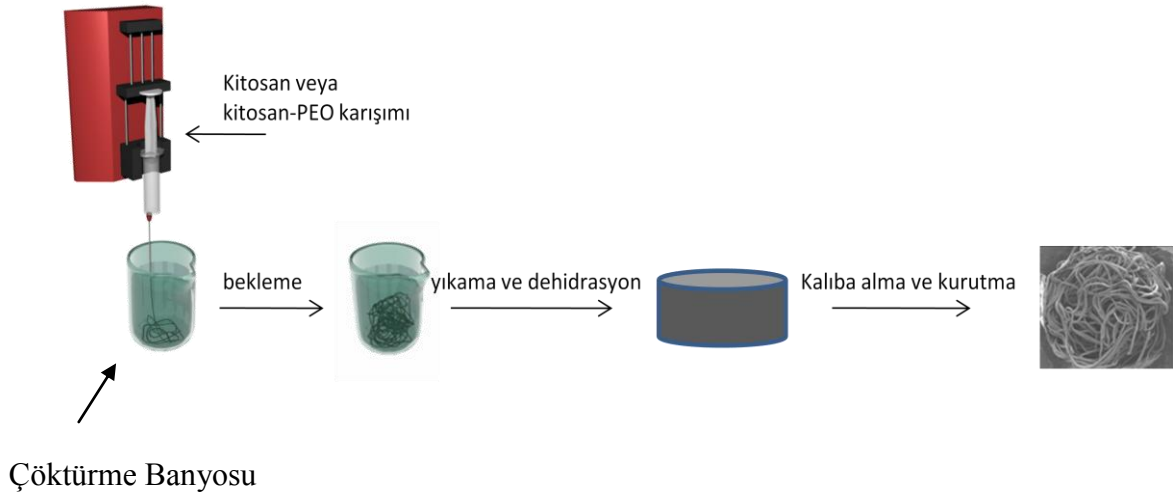
KİMYASAL	FİRMA
Polilaktik-co-glikolik asit (PLGA) (50:50) Resomer RG 503 H	Boehringer-Ingelheim (Almanya)
Polihidroksibütirat-ko-hidroksivalerat (PHBV)	Sigma-Aldrich Chemie (Almanya)
Kitosan (deasetilasyon derecesi % 90.85)	Sigma-Aldrich Chemie (Almanya)
Bovin serum albumin	Fluka (ABD)
Poli(vinil alkol) (PVA)	Fluka (ABD)
BMP-2, InductOs®	Wyeth Pharmaceuticals (ABD)
BMP-7	Prospec Tany Technogene (İsrail)
BMP-2 tayin kiti	R&D Systems (ABD)
BMP-7 Elisa kit	Ray Biotech (ABD)
Aljinik asit	Sigma-Aldrich Chemie (Almanya)
Bradford BSA tayin kiti	Pierce (ABD)
Sodyum hidroksit (NaOH)	J.T. Baker (Hollanda)
Metanol (CH <sub>3</sub> OH)	Merck (Almanya)
Sodyum sülfat (Na <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> )	Merck (Almanya)
Asetik asit (HAc)	Sigma-Aldrich Chemie (Almanya)
Kloroform	Sigma-Aldrich Chemie (Almanya)
Diklorometan	Sigma-Aldrich Chemie (Almanya)
Tris-HCl	Sigma-Aldrich Chemie (Almanya)

## 2.2. Yöntem

### 2.2.1 Kemik Doku Mihendisliği Amaçlı Yapı İskelelerinin Hazırlanması

#### 2.2.1.1 Kitosan bazlı dağılık fiber ağ yapıda üç boyutlu doku desteğinin hazırlanması

Dağılık fiber ağ yapılar, saf kitosan veya kitosan-PEO karışımı kullanılarak, ıslak eğirme yöntemiyle hazırlanmıştır (Şekil 2.1). Kısaca, kitosan veya kitosan-PEO (2:1) karışımı asetik asit içinde % 4 lük kitosan ve % 2 lik PEO çözeltisi oluşturacak şekilde çözülmüş ve 0.6 mL çözelti, 0.5 mm çaplı bir iğne ucuyla, şırınga pompası kullanılarak saatte 5 mL hızla çöktürme banyosunun içine enjekte edilmiştir. Çöktürme banyosu, belli bir tuz karışımı içeren bazik ortam ( $\text{Na}_2\text{SO}_4$  (0.5 M):NaOH (1.0 M):distile su = 3:1:6, v/v) olarak hazırlanmıştır. Kitosan bazlı fiberler çöktürme banyosu içinde bir gece bekletildikten sonra distile su ile yıkanmış ve dehidrasyon için bir saat boyunca % 50 lik metanol, devamında ise üç saat boyunca %100 lük metanol içinde bekletilmiştir. Elde edilen fiberler, 1.2 cm çapında ve 0.8 cm yüksekliğinde plastik kalıplarda 4 saat boyunca 60°C de kurutulularak şekillendirilmiştir. Elde edilen doku desteklerinin çapı 0.6 cm, yüksekliği 0.4 cm olarak ölçülmüştür.



Şekil 2.1 Islak eğirme yöntemiyle kitosan bazlı fiber yapıların hazırlanması

Optimum özelliklere sahip doku destekleri elde etmek amacıyla çözelti içindeki kitosan derişimi, PEO oranı ve asetik asit (HAc) derişimi değiştirilerek farklı örnekler hazırlanmıştır (Tablo 2.1). Hazırlanan doku destekleri donma-kurutma sonrası karbon bantlara tutturulmuş ve yapıları Taramalı Elektron Mikroskopisi (SEM, Quanta 400F Field Emission SEM, the Netherlands) ile analiz edilmiştir.

**Tablo 2.2** Kitosan bazlı doku desteği hazırlanmasında kullanılan çözelti içeriği

Örnek kodu	Çözelti içerisindeki derişim		
	CHI (%, w/v)	PEO (%, w/v)	HAc (%, v/v)
CHI4-HAc2	4	-	2
CHI6-HAc2	6	-	2
CHI4-PEO2-HAc2	4	2	2
CHI4-PEO2-HAc5	4	2	5

### 2.2.1.2 Kitosan Bazlı Çift Katmanlı Doku Desteklerinin Hazırlanması

Kitosan bazlı çift katmanlı doku destekleri kitosan doku desteklerinin yukarıda tarif edilen şekilde hazırlanmasından sonra aljinat ile kaplanmasıyla üretilmiştir. Hazırlanan kitosan doku destekleri oda sıcaklığında kurutulduktan sonra 0.3 mL %2'lik aljinat çözeltisi vakum-basınç döngüsü ile doku desteklerinin üzerine eklenmiş ve %10'luk kalsiyum klorür çözeltisi kullanılarak aljinat katmanı doku destekleri üzerine çapraz bağlanma ile stabilize edilmiştir. Son olarak, hazırlanan yapılar saf suyla yıkanmış ve oda sıcaklığında vakum altında kurutulmuştur.

### 2.2.2 Büyüme Faktörlerini Taşıyacak Nanokapsüllerin Hazırlanması

Model protein BSA ve büyüme faktörleri BMP-2 ve BMP-7 yüklenecek PLGA and PHBV bazlı nanopartiküller çift emülsiyon yöntemiyle hazırlanmıştır (Şekil 2.2). Kısaca, biyoaktif moleküllerin sıvı çözeltileri (2 mg BSA veya 1 µg BMP-2 veya BMP-7, 0.1 mL distile su içinde) diklorometan (0.6 mL) içinde hazırlanan PLGA veya PHBV çözeltisinde (5, 10 ve 20% w/v) prob sonikasyonu ile 50 W güçte 15 s boyunca emülsifiye edilmiştir. İlk emülsiyon

(w<sub>1</sub>/o), su içinde hazırlanan PVA çözeltisine (2 mL, 4% w/v) eklenerek w<sub>1</sub>/o/w<sub>2</sub> sistemi elde edilmiştir. Bu çift emülsiyon daha sonra 50 mL PVA çözeltisine (0.3% w/v) eklenmiş ve karışım bir gece boyunca manyetik karıştırıcıyla karıştırılarak ortamdaki organik çözücü uçurulmuştur.

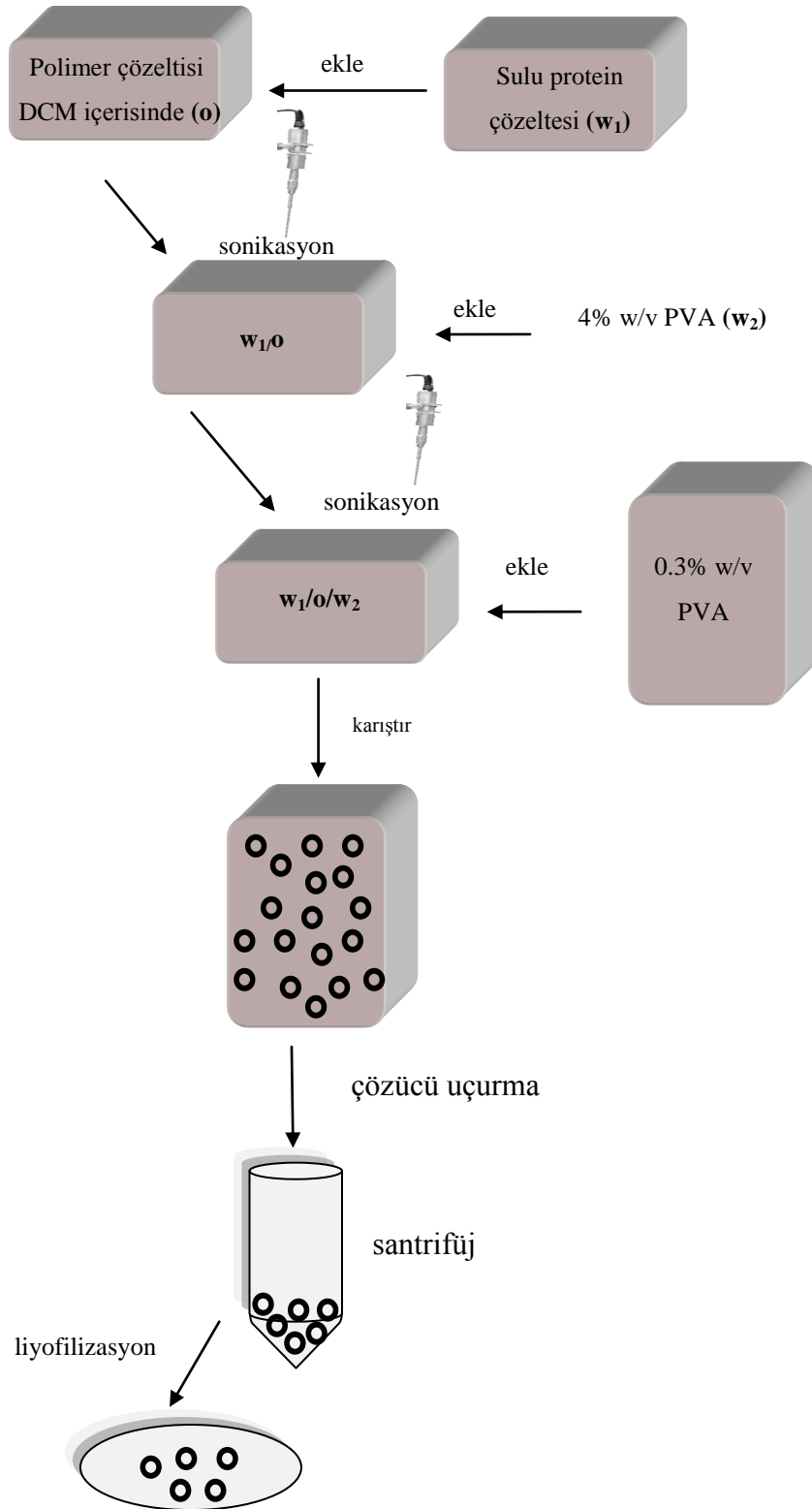
Elde edilen nanopartiküller, 15000 rpm hızda 10 dakika santrifüj yapılarak toplanmış, Tris-HCl (pH 7.4) ile yıkanmış ve en son olarak tampon çözeltide dağıtılarak liyofilizasyon yöntemiyle kurutulmuştur. In situ salım deneylerinden önce BSA yüklü nanopartiküller 4°C’de saklanmıştır.

### **2.2.3. Nanokapsüllerin Doku Desteklerine Yüklenmesi**

İçlerinde biyoaktif ajanlar içeren PLGA ve PHBV nanokapsüller, kitosan fiber ağ yapılı doku desteklerine, ya fiberlerin içine (NP-IN) veya fiberlerin üstüne (NP-ON) olmak üzere iki farklı şekilde yüklenmiştir.

#### **2.2.3.1 Nanokapsüllerin Kitosan Doku Desteklerinin İçine Yüklenmesi (NP-IN)**

Yapısında nanokapsül içeren kitosan fiberler, BSA yüklü PLGA ve PHBV nanokapsüllerin, kitosan polimer çözeltisinin içine çöktürme banyosuna enjekte edilmeden önce eklenmesiyle elde edilmiştir. Kısaca, BSA taşıyan 2 mg PLGA ve 10 mg PHBV nanokapsüller asetik asit çözeltisi içinde hazırlanmış 0.6 mL kitosan çözeltisiyle karıştırılmış ve bu karışım çöktürme banyosu içine enjekte edilmiştir. Devamında uygulanan prosedür kitosan fiber ağ yapılı desteklerin hazırlanması için kullanılan prosedürün aynısıdır. Doku desteği başına 2 mg PLGA ve 10 mg PHBV nanokapsül kullanılmıştır. Son olarak elde edilen yapılar etilen oksit ile sterilize edilmiştir.



**Şekil 2.2** Çift emülsiyon yöntemi ile PLGA ve PHBV nanopartiküllerinin hazırlanması

### **2.2.3.2 Nanokapsüllerin kitosan doku desteklerinin üstüne yüklenmesi (NP-ON)**

Nanopartiküllerin kitosan doku desteklerinden sıralı salımı için ikinci olarak NP-ON metodu kullanılmıştır. Nanokapsüllerin kitosan doku desteklerinin üstüne yüklenmesi, 20 mg/mL lik PLGA ve 100 mg/mL lik PHBV nanokapsül süspansiyonundan 100 µL alınarak doku desteklerinin üstüne eklenmesi ve süspansiyonun doku desteklerinin içine girmesini ve dağılmasını sağlamak amacıyla vakum-basınç uygulaması yapılması ile sağlanmıştır. Doku destekleri daha sonra bir gece boyunca vakum fırınında oda sıcaklığında kurutulmuştur. Son olarak elde edilen yapılar etilen oksit ile sterilize edilmiştir.

### **2.2.3.3 Çift Katmanlı Kitosan Bazlı Doku Desteklerine BSA eklenmesi**

Çift katmanlı yapılara BSA, kitosan tabakası içine (Ch-IN) ve aljinat tabakası içine (Alg-IN) olmak üzere iki farklı şekilde yüklenmiştir. Ch-IN yüklemesinde, her bir doku desteği için 50 µg BSA kullanılan %4'lük kitosan çözeltisi içine karıştırılmış ve daha sonra ıslak eğirme yapılmıştır. Alg-IN yüklemesinde de aynı şekilde her doku desteği için 50 µg BSA %2'lik 0.3 mL aljinat çözeltisi içine karıştırılmış ve bu çözelti vakum-basınç döngüsü kullanılarak kitosan yapılar üzerine kaplanmıştır.

## **2.2.4 Karakterizasyon**

Tüm hazırlanan nanotaneceklerin, destek fiber yapıların ve oluşturulan kompozit desteklerin değişik özellikleri aşığıda belirtilen farklı teknikler ile incelenmiştir.

### **2.2.4.1 Taramalı Elektron Mikroskopisi**

Taramalı Elektron Mikroskopisi (SEM) analizi sonucunda hazırlanan nanopartiküllerin boyut ve yapıları incelenmiştir. Örnekleri SEM analizine hazırlamak için PLGA ve PHBV nanokapsül çözeltilerinden 50 şer µL alınmış ve karbon bantlar üzerinde oda sıcaklığında kurutulmuştur. Daha sonra altın ile kaplanan örneklerin SEM fotoğrafları alınmış ve şekil incelemeleri yapılmıştır.

#### **2.2.4.2 Parçacık Boyutu Analizi**

PLGA and PHBV bazlı nanopartiküllerin parçacık boyutları Zeta Potansiyel ve Mobilite Ölçüm Cihazı (Malvern Nano ZS90, UK) kullanılarak belirlenmiştir.

#### **2.2.4.3 İn Situ Bozunmanın Değerlendirilmesi**

##### **2.2.4.3.1 PLGA ve PHBV Nanokapsüllerin Bozunması**

Hazırlanan nanokapsüllerin in situ bozunmasını tayin etmek için, BSA yüklü PLGA ve PHBV nanokapsüllerden 5 mg alınmış ve 37°C de steril PBS çözeltisi (1 mL, 10 mM, pH 7.4) içine konularak orbital karıştırıcıda inkübe edilmiştir. 3, 10, 15 ve 21. günlerde örnekler santrifüj edilmiş, saf suyla yıkanmış, liyofilize edilmiştir ve SEM ile incelenmiştir. Nanokapsüllerin bozunmayla ortaya çıkan asidik ürünlerinin miktarını belirlemek amacıyla çözücü ortamın pH değeri ölçülmüştür (CyberScan 510 pH, Eutech Instruments, USA).

##### **2.2.4.3.2 Doku Desteklerinin Su Tutma ve Bozunma Karakteristiklerinin İncelenmesi**

Kitosan doku desteklerinin fiziksel özelliklerindeki (fiber kalınlığı, örnek ağırlığı, yüzey özellikleri vb.) değişimleri incelemek amacıyla örnekler 37°C de steril PBS çözeltisi (1 mL, 10 mM, pH 7.4) içine orbital karıştırıcıda 6 hafta boyunca inkübe edilmiştir. Belirlenen zaman aralıklarında (1, 2, 3 ve 6. haftalar) örnekler alınmış, kurutulmuş ve SEM analizi ile yüzeylerindeki değişimler incelenmiştir.

Her zaman aralığında örnekler inkübasyondan çıkarılmış, liyofilize edilmiş ve kütle kaybını belirlemek için tartılmıştır. Tartılan örnekler tekrar inkübe edilmiştir. Altı hafta sonunda örneklerin boyutları mikrometre ile ölçülmüştür. Fiber kalınlıklarındaki değişimler ise floresan mikrografi (Leica TCS SPE, Germany) ile belirlenmiştir.

##### **2.2.4.4 Mikrobilgisayarlı Tomografi ( $\mu$ -CT)**

Üç boyutlu (3-D) kitosan ve kitosan/PEO doku desteklerinin ortalama gözenekliliği ve gözeneklilik dağılımı mikro-CT cihazı ( $\mu$ -CT 20, Scanco Medicals, Switzerland) ile belirlenmiştir. Doku destekleri, 7  $\mu$ m kalınlığındaki ve 200 dilimler halinde taranmış olup,

elde edilen görüntüler CT Analizatörü ve CT Vol Realistic 3-D Visualization (SkyScan, Belgium) yazılımları ile 3-D görüntülere dönüştürülmüştür.

## 2.2.5 İn Situ Salım Çalışmaları

### 2.2.5.1 Serbest Halde ve Doku Desteği İçine Yerleştirilmiş Nanokapsüllerden BSA Salımı

PLGA ve PHBV nanokapsüllerin enkapsüle etme verimliliği ve salım kinetikleri model protein olarak bovin serum albumin (BSA) kullanılarak çalışılmıştır. Salınan protein miktarı Coomassie Plus Bradford tayininin mikro protokolü kullanılarak saptanmıştır. PLGA ve PHBV nanokapsüllerden BSA salımı, 5 mg nanokapsülün PBS çözeltisine konularak (1 mL, pH 7.4) eppendorf tüp içinde 37°C de inkübe edilmesiyle incelenmiştir. Çeşitli zaman aralıklarında (3 s ve 1, 2, 4, 6, 8, 10, 15, 21, 28, 36 and 45. günler) örnekler santrifüj edilmiş ve inkübasyon ortamında bulunan ve ortama geçen protein miktarı Bradford tayini kullanılarak saptanmıştır. Kısaca, üst fazdan 150 µL alınarak 96 kuyucuklu kaba konulmuş ve üstüne 150 µL Bradford belirteci eklenmiştir. Örnekte bulunan proteinler Coomassie boyasına bağlanarak kırmızımsı kahverengiden ( $\lambda_{\max}$  465 nm) maviye ( $\lambda_{\max}$  610 nm) giden bir spektral kaymaya sebep olmuştur. Oda sıcaklığında 10 dakika bekledikten sonra, boyanın iki formu arasındaki soğurma farkının en yüksek olduğu 595 nm de soğurma, plaka okuyucu (plate reader) kullanılarak saptanmıştır. Kalibrasyon eğrisi kullanılarak soğurma ile protein konsantrasyonu arasında bir korelasyon sağlanmıştır. Kalan çökeltinin üstüne 1 mL taze PBS çözeltisi eklenerek inkübasyona devam edilmiştir. PLGA ve PHBV nanokapsüllerin enkapsüle etme verimliliği nanokapsüller dikloro metan içinde çözülerek bulunmuştur. Bunun için, 5 mg PLGA ve ya PHBV nanokapsül cam test tüplere konulmuş ve üstüne 2 mL diklorometan eklenerek ortam vortekslenmiştir. Daha sonra nanokapsüllerdeki proteinleri ayırmak için çözeltiliye 2 mL su eklenmiş ve ortam tekrar vortekslenmiştir. Bu işlemin birkaç kez tekrar edilmesinden sonra su fazı ayrılmış ve içindeki protein miktarı daha önce belirtilen tayin yöntemi ile saptanmıştır. Kitosan yapıları konulan nanokapsüllerden protein salımı, BMPleri temsilen BSA kullanılarak çalışılmıştır. BSA yüklü 2 mg PLGA ve/veya 10 mg PHBV nanokapsül eklenmiş yapı iskeleleri 24 kuyucuklu kaplara konularak üstlerine 1 mL PBS çözeltisi eklenmiş ve 37°C de inkübe edilmiştir. Değişik zaman aralıklarında (1, 3, 5, 10, 15 ve 25. günler) sıvı kısım ortamdaki uzaklaştırılmış ve içerisindeki protein miktarı Coomassie Plus tayini kullanılarak spektrofotometrik olarak hesaplanmıştır. Devamında her



örneğin üstüne 1 mL PBS eklenerek inkübasyona devam edilmiştir. Deneyle 3 er kez tekrar edilmiş ve ortalama değerler alınmıştır.

#### **2.2.5.2. Serbest Haldeki Nanokapsüllerden BMP Salımı**

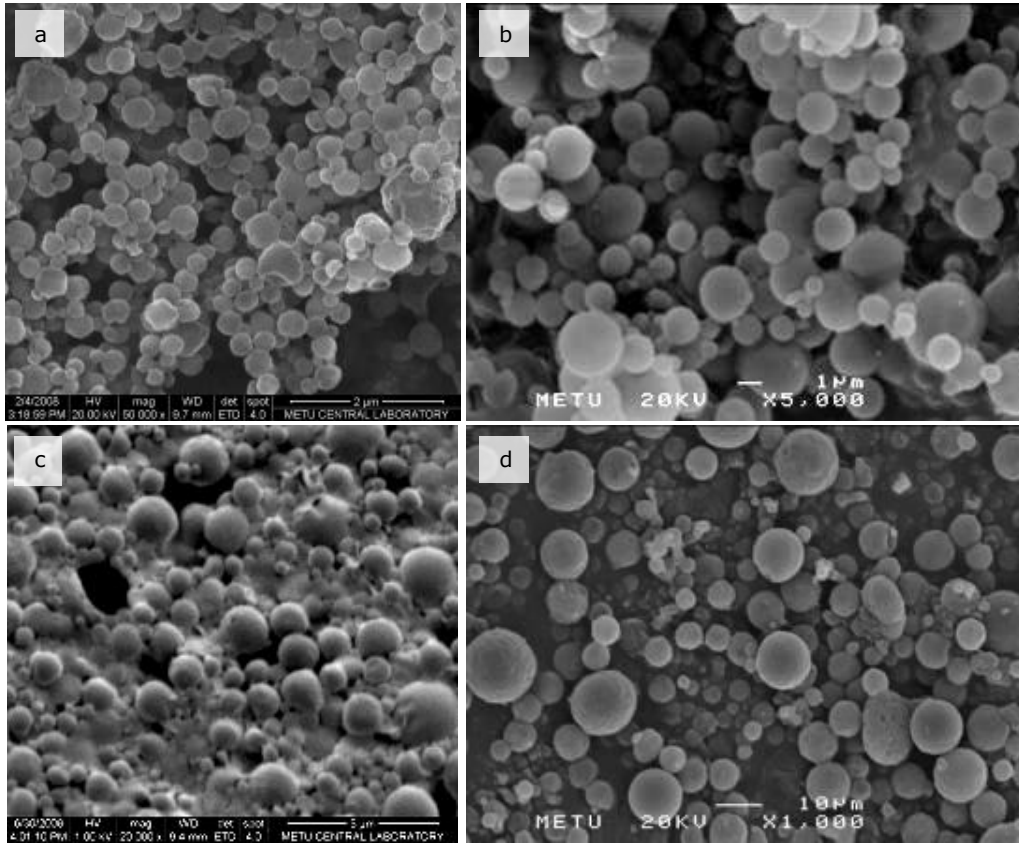
Yükleme verimliliği ve salım karakteristiklerinin BSA kullanarak optimize edilmesinden sonra, BMP-2 ve BMP-7 yüklü nanokapsüllerin salım kinetikleri ilgili ELİSA kitler kullanılarak belirlenmiştir. Bu amaçla BMP-2 yüklü PLGA ve BMP-7 yüklü PHBV nanokapsüllerden 2 şer mg alınarak eppendorf tüpler içinde 37°C de 1 mL steril PBS ile inkübe edilmiştir. Belirli zaman aralıklarında (1, 3, 10, 15 ve 21. günler) örnekler santrifüj edilmiş ve üst faz alınarak yerine taze PBS çözeltisi (1 mL) konulmuştur. Ortama geçen BMP miktarları ilgili ELİSA kitleri kullanılarak tayin edilmiştir.

## SONUÇLAR

### 3.1. Nanoparçacıklı Sıralı Salım Sistemlerinin Hazırlanması

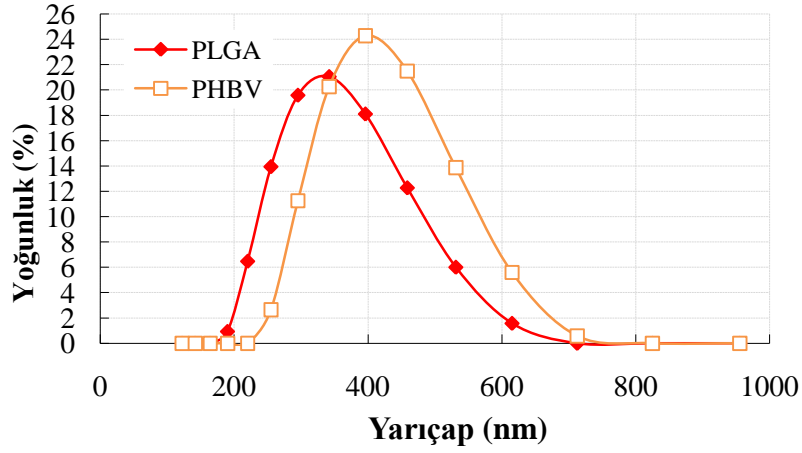
#### 3.1.1. Parçacık Şekli ve Boyutu

PLGA ve PHBV nanopartiküller, farklı bozunma hızlarına sahip olmaları nedeniyle taşıdıkları proteinlerin farklı zamanlarda ve sıralı olarak salımını gerçekleştirirler. Bu çalışmada, PHBV'ye göre daha hızlı biyobozunma hızına sahip olan PLGA nanopartiküller, sıralı salım sisteminin “erken dönem salım” basamağını, ve daha uzun sürede biyobozunma özelliğine sahip olan PHBV nanopartikülleri ise “uzun dönem salım” basamağını oluşturacak şekilde hazırlanmıştır. Söz konusu polimerlerin %5, %10 ve %20 derişimdeki çözeltileri hazırlanmış ve polimer derişiminin partikül oluşumu üzerindeki etkisi incelenmiştir. Bu çözeltiler içinde, %5 derişimde hazırlanan polimer çözeltilerinde nanopartikül oluşumu gözlemlenmemiştir ve dolayısıyla bu çalışmalara konsantrasyonda devam edilmemiştir. Nanoparçacıklar için optimum boyut değerleri %10 ve %20 derişimindeki çözeltiler kullanılarak elde edilmiştir. SEM analizi sonucunda polimer derişiminin arttırılmasıyla nanopartiküllerin daha küçük çaplı bir şekilde üretilebildiği gözlemlenmiştir (Şekil 3.1). Buna ek olarak, aynı koşullarda üretilen PLGA nanopartiküllerin PHBV nanopartiküllere göre daha küçük ve boyut dağılımı açısından daha homojen ve bir örnek olduğu belirlenmiştir. Ayrıca, SEM mikrografları incelendiğinde, üretilen nanoparçacık çapının 400 nm - 900 nm aralığında olduğu, kapsül duvar kalınlığının 200 nm civarında olduğu gözlemlenmiştir (Şekil 3.1).



**Şekil 3.1** BSA yüklü nanokapsüller (a) PLGA: 10% (x50,000), (b) PLGA: 20% (x5,000), (c) PHBV: 10% (x20,000), (d) PHBV: 20% (x1,000).

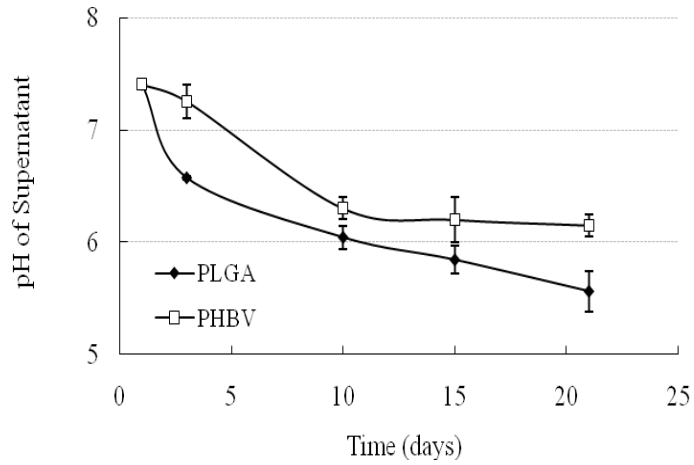
Zeta Potansiyel ve Mobilite Ölçüm Cihazı ile, %10 PLGA ve %10 PHBV çözeltilerinden hazırlanan nanopartiküllerin parçacık boyutları belirlenmiş olup, PLGA nanopartiküllerin ortalama tanecik büyüklüğü 327 nm (190 - 615 nm) ve PHBV nanopartiküllerin ortalama tanecik büyüklüğü 438 nm (255-712 nm) olarak belirlenmiştir. Bu nanoparçacıklar için parçacık boyutu dağılımı Şekil 3.2’de verilmiştir.



Şekil 3.2 PLGA ve PHBV nanoparçacıklar için tanecik büyüklüğü dağılımı

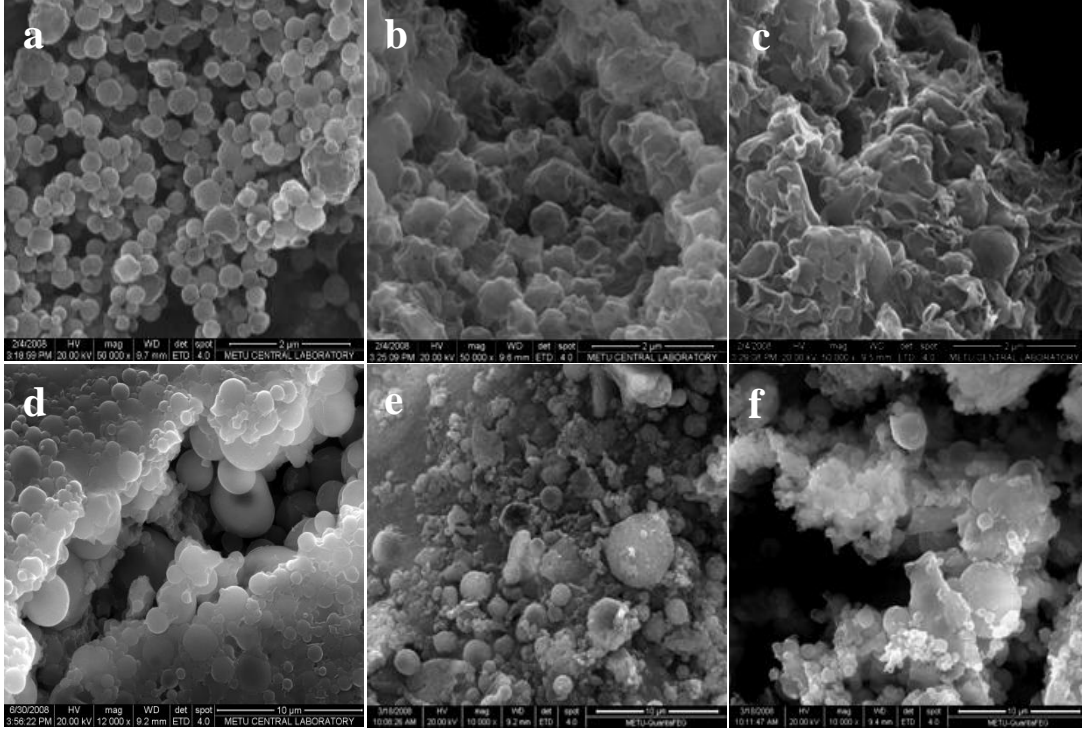
### 3.1.2. Yüklü PLGA ve PHBV Nanokapsüllerin Bozunması

Biyoaktif ajanların taşıyıcılardan salımı nanokapsüllerin bozunmasına da bağlı olduğundan, PLGA ve PHBV nanokapsüllerin in situ ortamda bozunma karakteristikleri incelenmiştir. Bozunmanın bir işaretçisi olarak ortam (PBS) pH'sı 21 günlük inkübasyon süresince kaydedilmiştir (Şekil 3.3). Ortam pH'sının zamanla azaldığı gözlemlenmiş ve bu sonuç nanokapsüllerin hidrolitik bozunmaya uğramasıyla ortaya çıkan asidik ürünlerle ilişkilendirilmiştir. Ortam pH'sındaki düşüş inkübasyonun ilk günlerinde daha hızlı olmuştur, bu da PLGA'nın bozunma hızının fazla olmasına bağlıdır.



Şekil 3.3 PLGA ve PHBV nanokapsüllerin inkübasyonu süresince ortamın pH değişimi.

PLGA ve PHBV nanokapsüllerin in situ ortamda bozunmaları SEM analizi ile de takip edilmiştir. İnkübasyon süresinin 21. gününde, PLGA nanokapsüllerin bütünlüğünde fazla miktarda kayıp ve bozunma gözlemlenmiştir. PLGA nanokapsüllerdeki bozunma PHBV kapsüllere göre çok daha fazladır (Şekil 3.4). Bu sonuçlarda PLGA'nın hızlı, PHBV'nin yavaş salım için seçilmesinin doğruluğunu desteklemektedir.



**Şekil 3.4.** BSA yüklü nanokapsüllerin 37°C de steril PBS (pH 7.4) içinde bozunması (a) PLGA, gün 0 (x50,000), (b) PLGA, gün 15 (x50,000), (c) PLGA, gün 21 (x50,000), (d) PHBV, gün 0 (x10,000), (e) PHBV, gün 15 (x10,000), (f) PHBV, gün 21 (x10,000).

### 3.1.3 Enkapsülasyon Etkinliği ve Salım Kinetikleri

Değişik derişimlerinde (%5, %10 ve %20) hazırlanan PLGA ve PHBV nanopartiküllerin BSA ile yüklenebilme etkinliği ve BSA salım kinetikleri incelenmiştir. Üretilen nanopartiküllerin içerisine yüklenebilen maksimum protein miktarı, proteinin su ile ekstrakte edilmesi ve tümünün nanokürelerden ayrıştırılması sonrasında belirlenmiştir. Hem PLGA hem de PHBV nanokapsül kullanımında BSA'nın maksimum yüklenebilme etkinliği için optimum polimer derişimi %10 olarak belirlenmiştir (Tablo 2).

Polimer konsantrasyonunun %10 olduğu çözeltilerden hazırlanan tanecikler içinde, PLGA nanopartiküllerin BSA'yı yükleyebilme etkinliğinin, PHBV 'ye göre hemen hemen 5 kat daha fazla olduğu saptanmıştır. Bu değerler, PLGA için  $84.75 \pm 1.47$  ve PHBV için  $16.72 \pm 1.06$  olarak bulunmuştur.

Bu nedenle, en yüksek protein yükleme yüzdesinin elde edilebilmesi için optimal koşulun %10 derişime sahip polimer çözeltisi kullanılması olduğu belirlenmiştir.

**Tablo 3.1.** BSA nın hapsedilme etkinliği

Polimer konsantrasyonu (%, w/v)	Yükleme etkinliği	
	PLGA	PHBV
5	$74.30 \pm 2.33$	$12.55 \pm 0.12$
10	$84.75 \pm 1.47$	$16.72 \pm 1.06$
20	$70.66 \pm 1.34$	$12.06 \pm 0.53$

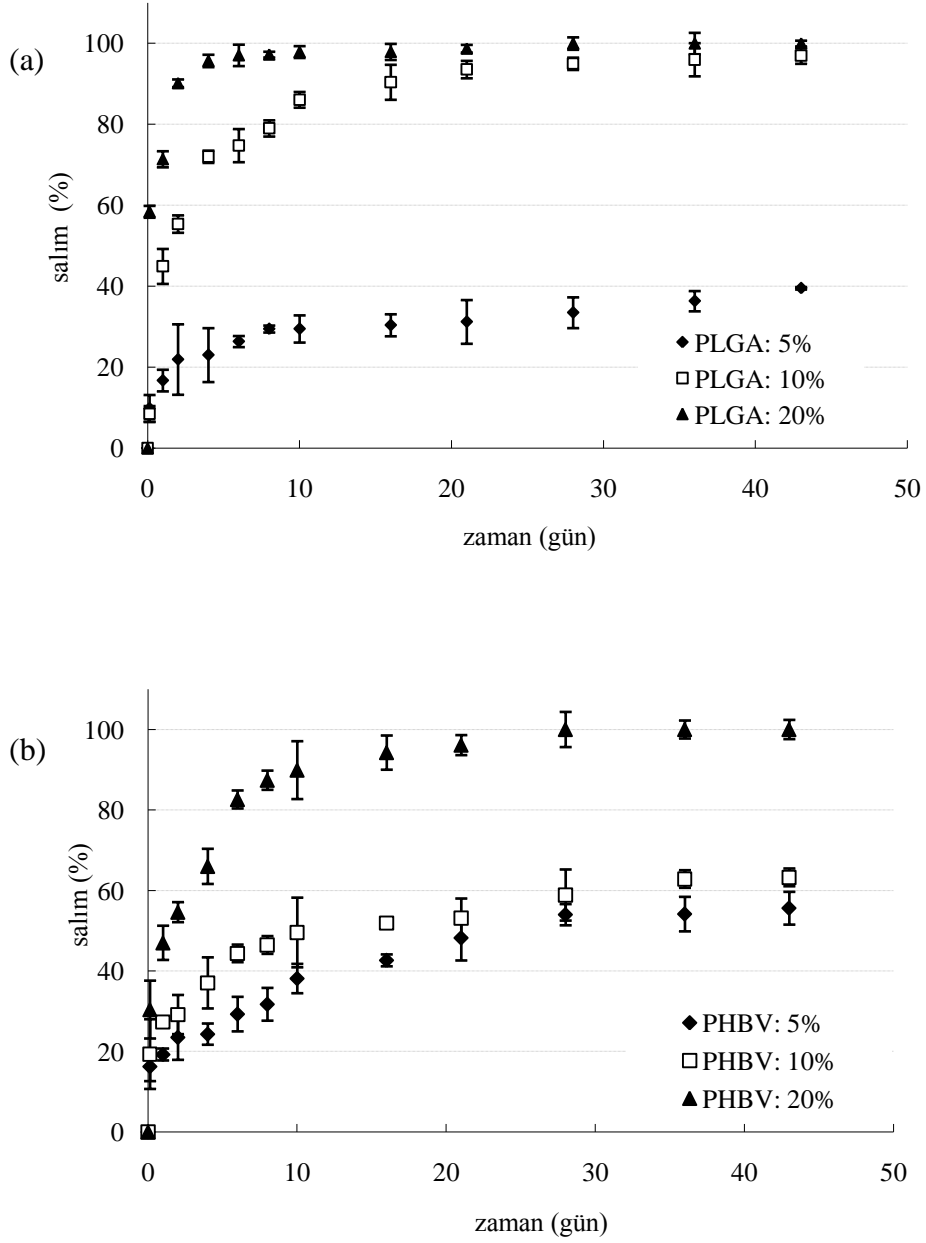
Salımların kinetik hesaplamaları en uygun şekilde Higuchi model ile hesaplanmıştır. Higuchi modelde kullanılan eşitlik  $Mt/M_0 = k.t^{1/2}$  olarak verilir. Bu modele yönelik hesaplanan değerler, Tablo 3.2 de verilmiştir. Higuchi hız sabitinin (k) değeri,  $Mt/M_0$  değerlerinin  $t^{1/2}$  değerlerine karşı çizilmesi ile elde edilen salım profilinin ilk eğiminden hesaplanmıştır. Nanopartiküllere ait salım grafikleri Şekil 3.5 de verilmiştir.

**Tablo 3.2** Higuchi Modeline göre BSA proteinin PLGA ve PHBV nanopartiküllerinden salım kinetik değerleri

Polimer Çeşidi ve Başlangıç Polimer Konsantrasyonu (w/v)	Kapsul İçeriği	$k_H$	$r^2$
PLGA, 5%	BSA	0.0306	0.9454
PLGA, 10%	BSA	0.0908	0.9842
PLGA, 20%	BSA	0.0924	0.9141
PHBV, 5%	BSA	0.0754	0.9834
PHBV, 10%	BSA	0.0789	0.9869
PHBV, 20%	BSA	0.1081	0.9289
PLGA, 10%	BMP-2	0.0987	0.9525
PHBV, 10%	BMP-7	0.0636	0.9941

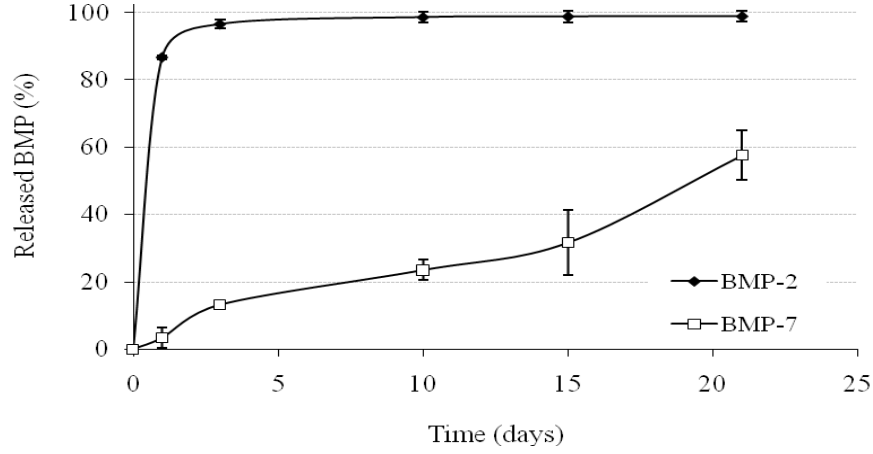
Salım kinetiği, hapsedme etkinliği ve parçacıkların boyut dağılımı göz önüne alındığında, %10 luk polimer çözeltisiyle hazırlanan PLGA nanokapsüllerin hızlı salım elemanı, %10 luk polimer çözeltisiyle hazırlanan PHBV nanokapsüllerin ise yavaş salım elemanı olarak kullanılmasına karar verilmiştir.

Nanotaneçiklerden BMP-2 için gözlemlenen salım profile de, BSA ile olan salıma göre biraz daha hızlı olması dışında büyük benzerlik göstermektedir. Bunun yanında BMP-7 nin salım profilinin de BSA ya göre daha yavaş olduğu gözlemlenmiş ve bu iki büyüme faktörü birleştirildiğinde sıralı bir salım sisteminin ortaya çıkacağı öngörülmüştür.



**Şekil 3.5** Değişen konsantrasyonlarda polimer çözeltileriyle hazırlanan nanokapsüllerden BSA salımı, (a) PLGA kapsüller, (b) PHBV kapsüller.





**Şekil 3.6** Polimerik nanokapsüllerden BMP salımı (BMP-2, %10luk PLGA nanokapsüllerden; BMP-7, %10luk PHBV nanokapsüllerden).

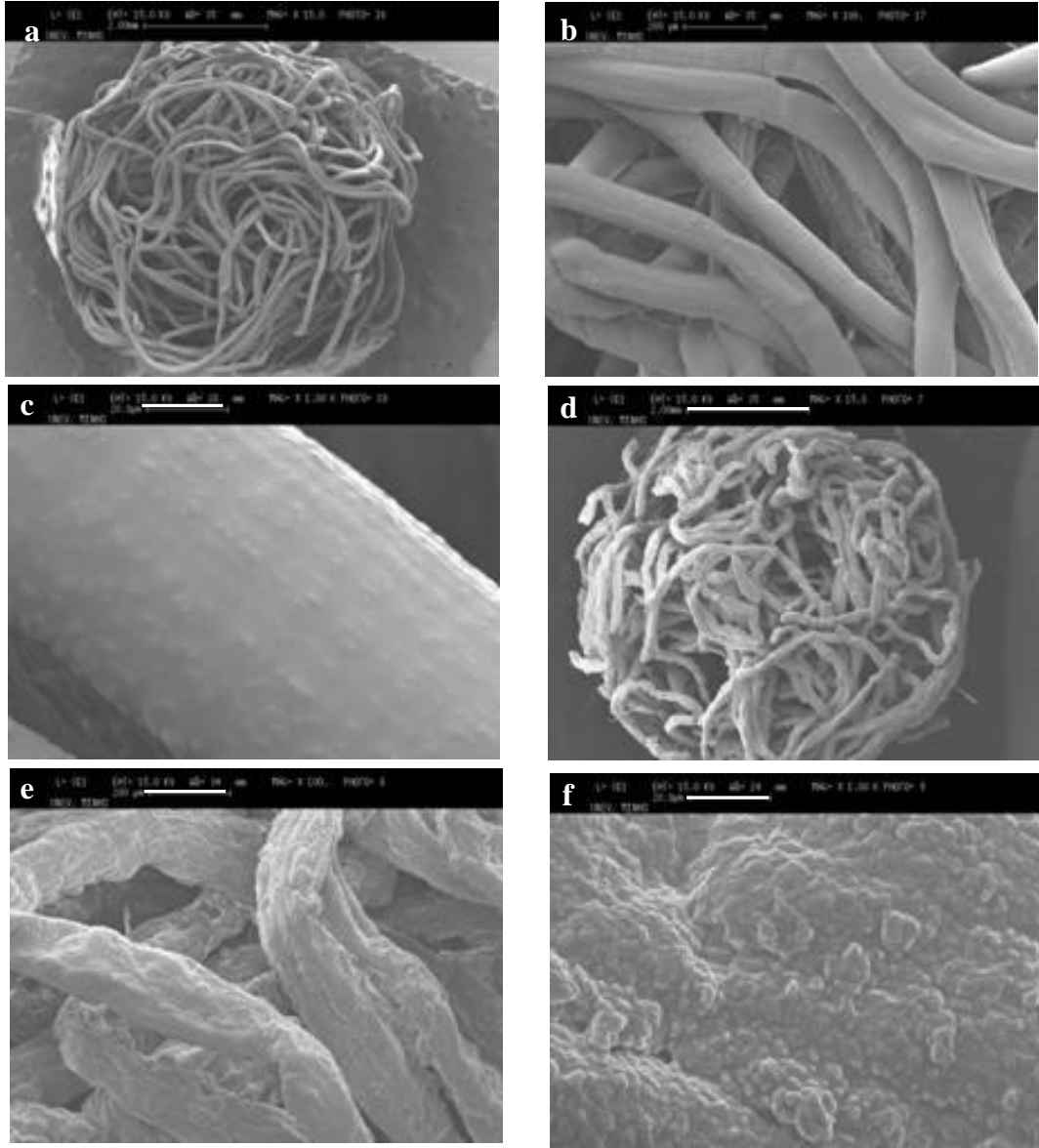
### 3.2 Kitosan Doku Desteklerinden Büyüme Faktörü Salımı

#### 3.2.1 Fiber Ağ Yapıda Kitosan Doku Desteklerinin Hazırlanması

Üç boyutlu (3-D) fiber kitosan doku destekleri, ıslak eğirme yöntemiyle hazırlanmıştır. Destek hazırlanmasında, çözelti içerisindeki kitosan miktarının, PEO ve asetik asit derişimlerinin, fiberlerin yapıları üzerine etkisi çalışılmıştır.

İlk olarak, farklı kitosan konsantrasyonlarının (%4; CHI4-HAc2 örneği; ve %6 ; CHI6-HAc2 örneği) fiber yapılara etkisi incelenmiştir. Kitosan konsantrasyonunun düşük olduğu durumlarda, örneğin %4'ün altında hazırlanan kitosan çözeltilerinde fiber yapıların düzgün oluştuğu gözlemlenmiştir. %4'lük hazırlanan kitosan çözeltisinin, %6'lık hazırlanan kitosan çözeltisine göre daha iyi viskositeye sahip olduğu ve hazırlanan fiberlerin yüzeylerinin daha pürüzsüz olduğu gözlemlenmiştir (Şekil 3.7). Diğer taraftan, %8'lik hazırlanan kitosan çözeltisinin düzgün fiber yapılar oluşturmadığını tespit edilmiştir.

Optimum konsantrasyon olarak %4'lük kitosan çözeltisi seçilmiştir ve kitosan çözeltisi %2'lik PEO ile 2:1 oranında karıştırılarak, kitosan (4%) / PEO (2%) destekleri (CHI4-PEO2-HAc2) hazırlanmıştır (Şekil 3.8).

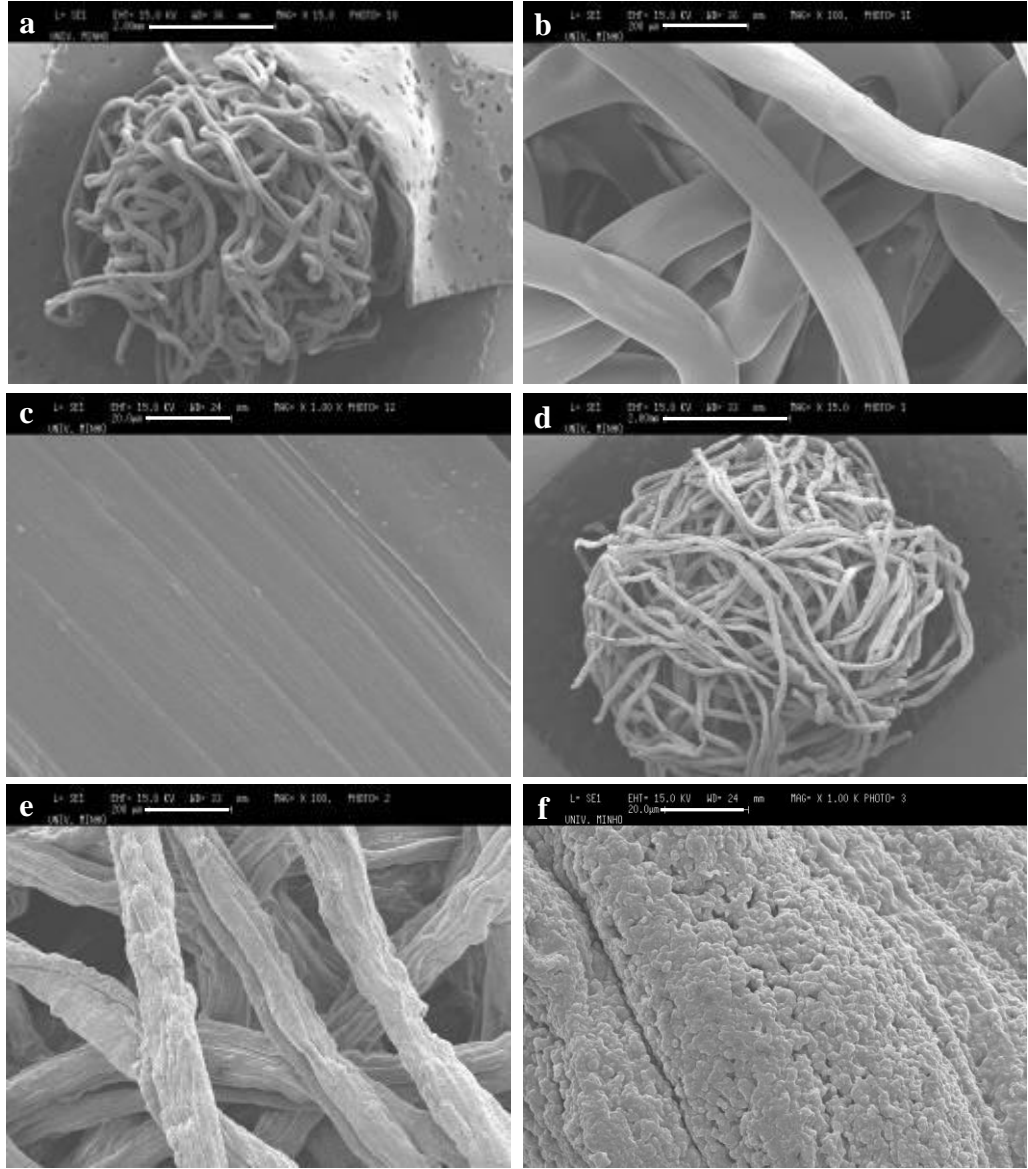


**Şekil 3.7** Desteklerin SEM fotoğrafları a-c: CHI4-HAc2 fiber ağ yapılı doku destekleri, (a) x15, (b) x100, (c) x1,000; d-f: CHI6-HAc2 fiber ağ yapılı doku destekleri (d) x15, (e) x100, (f) x1,000. Ölçek çubuğu (a, d) 2 mm, (b, e) 200  $\mu$ m, (c, f) 20  $\mu$ m.

Kitosan çözeltilere PEO eklenmesinin, ıslak eğirme yöntemi ile elde edilen kitosan doku desteklerinin yapısal özelliklerini geliştirdiği gözlenmiştir. PEO derişiminin %2'nin üzerine çıktığında ise ıslak eğirme yapılamayacak kadar viskoz çözeltiler elde edilmiştir. Şekil 3.7 ve Şekil 3.8'de, kitosana PEO eklenmesi ile elde edilen yapıların SEM görüntüleriyle, sunulmuştur. Kitosana PEO eklenmesi, fiber yüzeylerinin pürüzlülüğünde herhangi bir

değişime yol açmasa da, fiber kalınlıklarında artışa neden olmuştur. Fiber yüzey özelliklerine polimer derişimlerin etkisinin yanı sıra, çözücü konsantrasyonun etkisi de incelenmiştir. Bu amaçla, kitosan çözeltisi %2 ve %5 asetik asit içerisinde hazırlanmıştır. %2'lik asetik asitle hazırlanan çözeltilerle elde edilen fiberlerin yüzeylerinin daha düzgün ve pürüzsüz olduğu gözlemlenmiştir (Şekil 3.8)

Yüzey özelliklerinin hücre-malzeme ilişkisini değiştirebileceği için, farklı koşullarda hazırlanan doku destekleri arasından, yüzey pürüzlülüğü en az olan CHI4-HAc2 ve belirgin bir yüzey pürüzlülüğüne sahip olan CHI4-PEO2-HAc5 seçilerek karakterizasyon çalışmalarına devam edilmiştir.



**Şekil 3.8** Desteklerin SEM fotoğrafları

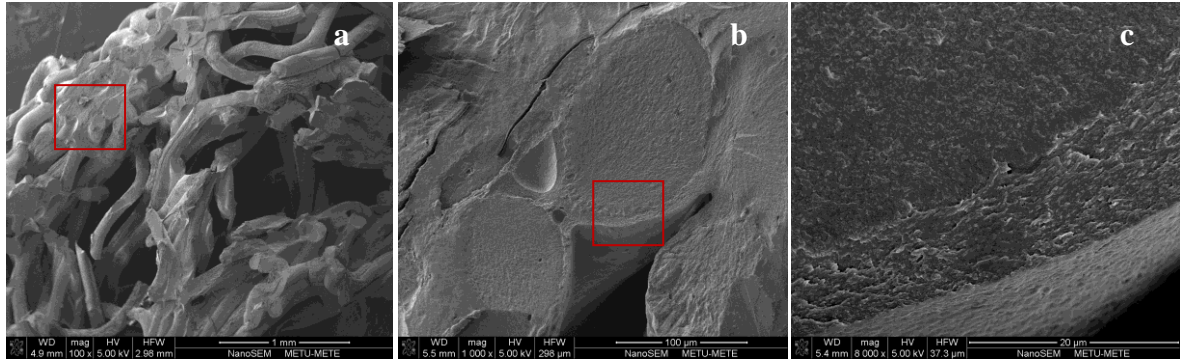
a-c: CHI4-PEO2-HAc2 fiber ağ yapılı doku destekleri, (a) x15, (b) x100, (c) x1,000;  
d-f: CHI4-PEO2-HAc5 fiber ağ yapılı doku destekleri, (d) x15, (e) x100, (f) x1,000.  
Ölçek çubuğu (a, d) 2 mm, (b, e) 200  $\mu$ m, (c, f) 20  $\mu$ m.

### 3.2.2 Kitosan Bazlı Çift Katmanlı Doku Desteklerinin Hazırlanması

Kitosan doku desteklerinin yukarıda anlatıldığı şekilde hazırlanmasından sonra, fiber yüzeylerinin aljinat ile kaplanması ve nanokürelerin aljinat ile fiber yüzeylerine konulmasına karar verilmiş, ve bu tür eklemenin salım hızına etkisi incelenmiştir. Bu amaçla, %2 ve

%4'lük aljinat çözeltileri hazırlanmıştır. %4'lük aljinat çözeltisinin viskozitesinin çok yüksek olması sebebiyle, vakum-basınç döngüsü ile desteklere eklenmesinin etkin olarak yapılamadığı gözlemlenmiş ve çalışmanın devamında %2'lik aljinat çözeltisi kullanılmıştır. Kitosan yüzeyleri bu çözeltiler ile kaplanmıştır.

Kitosan ve aljinatın kimyasal yapılarında bulunan zıt kutuplu fonksiyonel gruplar, bu iki polimer arasında polielektrolit kompleks oluşumuna sebebiyet vermektedir. Böylece, çift katmanlı yapıların oluşumu sağlanmış ve bu yapı SEM görüntüleriyle açıkça gözlemlenmiştir (Şekil 3.9).



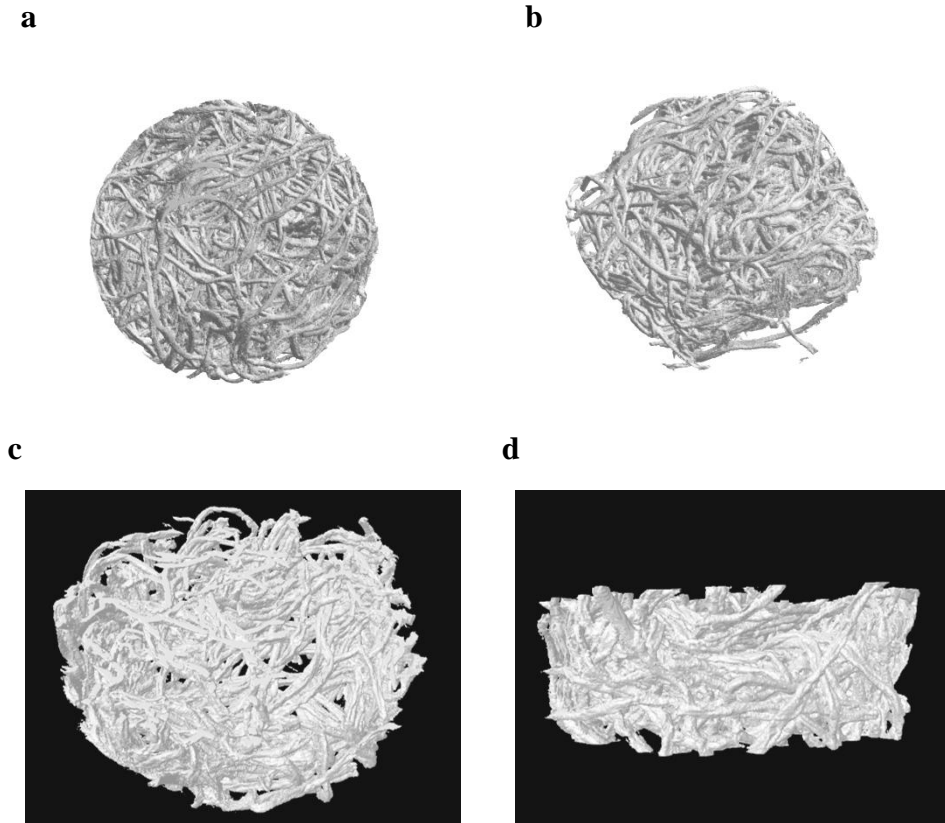
**Şekil 3.9** Hazırlanan çift katmanlı doku desteklerinin kesit SEM mikroagrafları. (a) x100, (b) x1000, (c) x8000

Nanokapsüllerle sağlanan sıralı salım sisteminin, kitosan doku desteklerinde, çift katmanlı yapıda katmanlarda kullanılan değişik polimerlerin bozunma hızlarındaki fark ile sağlanması ve bu katmanların salım kinetiği üzerine etkileri de incelenmiştir.

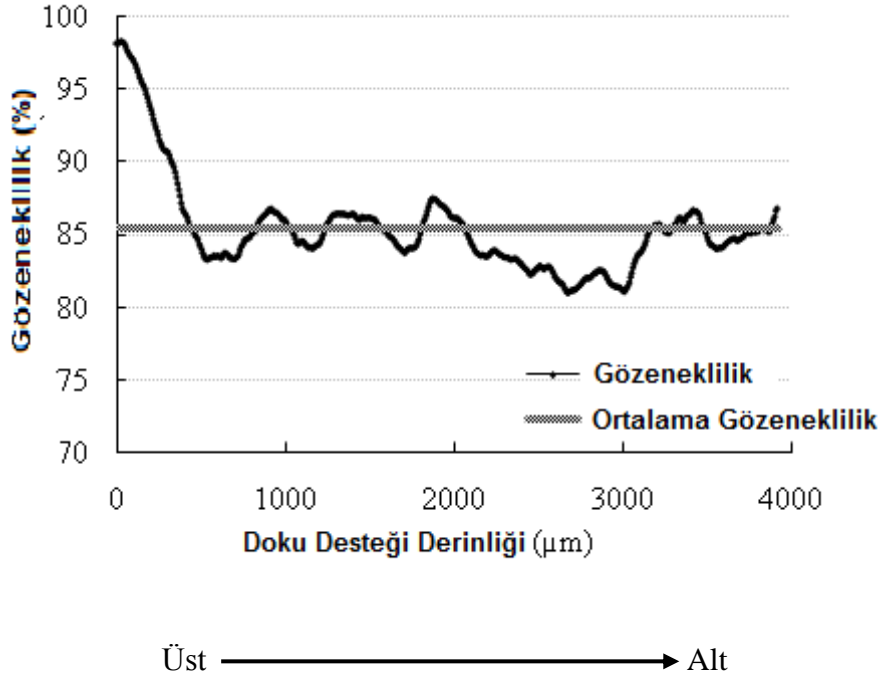
### 3.2.3 Doku Desteklerinin Karakterizasyonu

Seçilen doku desteklerinin (CHI4-HAc2 ve CHI4-PEO2-HAc5) yapılarında,  $\mu$ -CT analiziyle elde edilen 3-D görüntülerinde belirgin bir değişiklik gözlemlenmemiştir (Şekil 3.10). CHI4-HAc2 ve CHI4-PEO2-HAc5 doku desteklerinin gözeneklilik değerleri sırasıyla  $85.4 \pm 3.5$  % ve  $86.7 \pm 4.8$  % olarak tespit edilmiştir. CHI4-HAc2 doku desteklerinin her tarafında devamlı

ve düzenli gözeneklilik dağılımı gözlemlenmiştir (Şekil 3.11). Buna ek olarak, yapı üzerinde ve altında gözenekliliğin belirgin şekilde değişmediği ve doku desteğinin üst kısımlarında %98'e ulaştığı, alt kısımlarına doğru %85 değerine düştüğü gözlemlenmiştir. Elde edilen kitosan doku desteklerinin devamlı ve düzenli gözeneklilik dağılımı, bu destek dokularının içine doğru yeterli oksijen ve besin taşınabilmesi ve destek doku içerisinde yeterli hücre yoğunluğuna ulaşılabilmesi açısından oldukça önemli bulgulardır.



**Şekil 3.10** Doku desteklerinin  $\mu$ -CT kullanılarak elde edilmiş 3-D görüntüleri (a, b) CHI4-HAc2; (c, d) CHI4-PEO2-HAc5.



**Şekil 3.11** CHI4-HAc2 doku desteğinin gözeneklilik dağılımı

CHI4-HAc2 ve CHI4-PEO2-HAc5 doku desteklerinin fiziksel değişimleri, doku desteklerinin PBS (10 mM, pH 7.4) tampon çözeltisi içerisinde 37°C’de 21 gün süre boyunca inkübe edilerek ve inkübasyonun 7, 14 ve 21. günlerinde donma-kurutma ile elde edilen kuru hallerine göre fiziksel boyut değişimi, ve fiber boyutu ile ağırlık değişimleri belirlenerek gözlemlenmiştir. Islak fiberlerin boyutları ve ağırlıkları 21. gün sonunda belirgin bir şekilde değişmiştir (Tablo 3.3).

21. gün sonunda, her iki doku desteğinin ağırlıklarının kütlece % 500-600 kadar arttığı gözlemlenmiştir. Her iki doku desteğinin, fiberlerinin kalınlığındaki artışın % 55, yüksekliğindeki artışın % 20 olduğu görülmüştür.

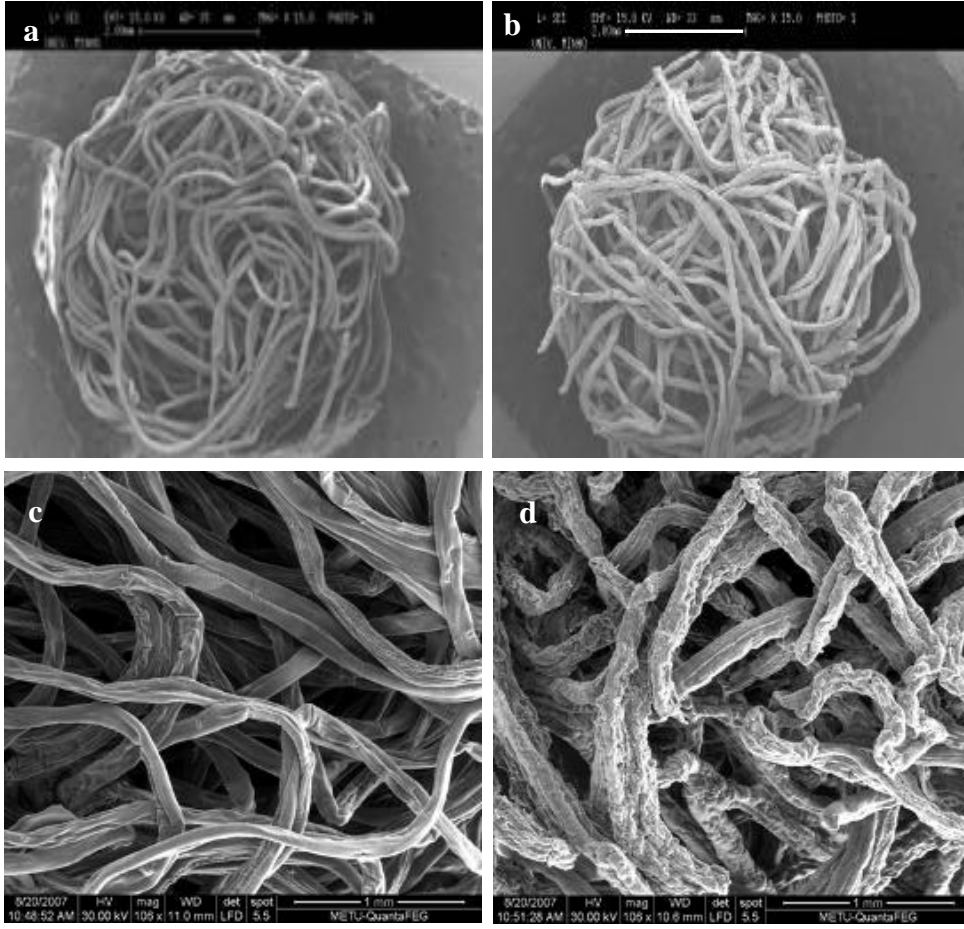
**Tablo 3.3** Kitosan doku desteklerinin özelliklerinin PBS içinde 21 gün inkübasyon sonrası değişimi

	CHI4-HAc2	CHI4-PEO2-HAc5
Fiber Kalınlığı (%)	53	59
Doku Desteği Yarıçapı (%)	18	29
Doku Desteği Yüksekliği (%)	25	29
Doku Desteği Ağırlığı (%)	600	500

Kitosan-bazlı doku desteklerinin bozunma mekanizmasının incelenmesi amacıyla, PBS tampon çözeltisi içerisinde 37°C’ de 21 gün süre boyunca inkübe edilen ve inkübasyonun 21. gününün sonunda alınan destekler donma-kurutma tekniği ile kurutulmuş ve fiber yüzey yapılarındaki değişimler SEM ile analiz edilmiştir. Ayrıca, başlangıçta ve 21 gün inkübasyon sonrası tartılan örnekler arasındaki ağırlık farkından gravimetrik olarak bozulan miktar belirlenmiştir.

Gravimetrik analize göre kitosan doku desteklerinde, 3 hafta sonunda belirgin bir ağırlık farkı gözlemlenmemiştir. CHI4-HAc2 doku desteklerinin fiber yapılarında belirgin bir değişim gözlemlenmemiş olup (Şekil 3.12 a,c), CHI4-PEO2-HAc5 doku desteklerinde ise yüzeydeki PEO’in çözünmesinden dolayı yüzey pürüzlülüğünün, ilk güne göre arttığı görülmüştür (Şekil 3.12 b,d). Aslında kitosanın çok sağlam bir yapısı olması ve kristallenebilme özelliği, sulu ortamlarda ona büyük dayanım sağlamaktadır. Ancak, in vivo şartlarda, vücut içinde bulunan enzimlerin etkileri sonucu kitosanın degradasyon hızının artması beklenmektedir.





**Şekil 3.12** İnkübasyon öncesi ve PBS içinde 21 gün inkübasyon sonrası fiber desteklerin SEM görüntüleri.

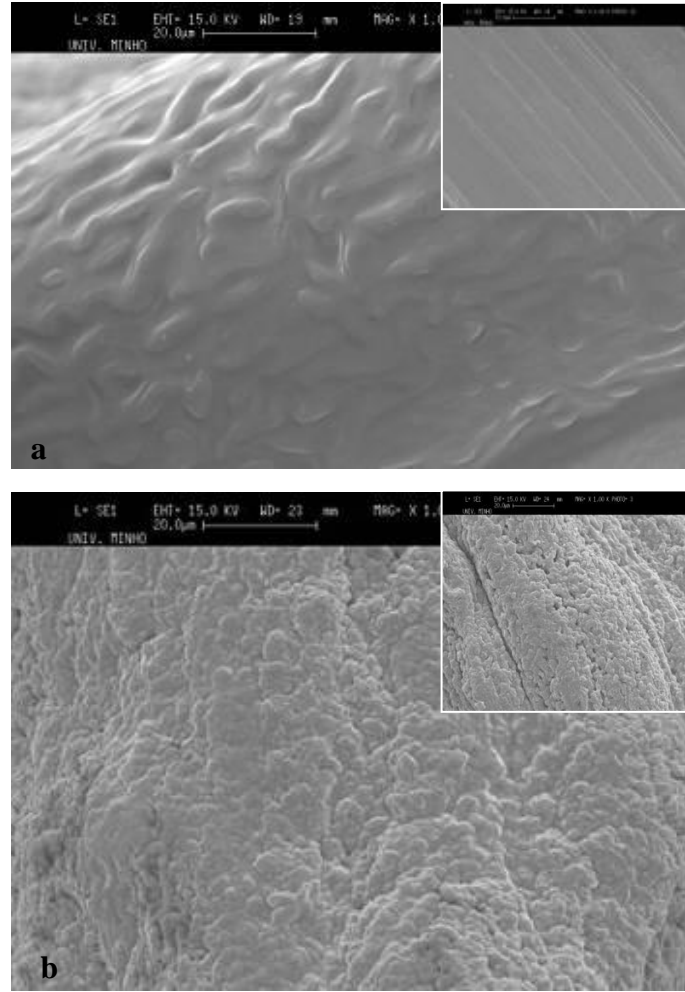
İnkübasyon öncesi, (a) CHI4-HAc2, (b) CHI4-PEO2-HAc5;

İnkübasyon sonrası 21. gün, (c) CHI4-HAc2, (d) CHI4-PEO2-HAc5.

### 3.2.4 Nanoparçacıkların Kitosan Doku Desteklerine Yüklenmesi

PLGA ve PHBV nanokapsüller, hazırlanan kitosan fiber ağ yapılı doku desteklerinin içerisine (NP-IN) ve üstüne (NP-ON) olmak üzere iki farklı yöntemle yüklenmiştir. NP-IN yöntemiyle hazırlanan nanokapsül yüklü CHI4-HAc2 ve CHI4-PEO2-HAc5 doku destekleri, PHBV ve PLGA nanokapsüllerin kitosan ve kitosan/PEO çözeltilerinin içerisine eklenerek ıslak eğirme yöntemiyle elde edilmiştir. PHBV ve PLGA nanokapsülleri içeren CHI4-HAc2 fiberleri, nanokapsül yüklü olmayan CHI4-HAc2 fiberlerle karşılaştırıldığında yüzey pürüzlülüğündeki

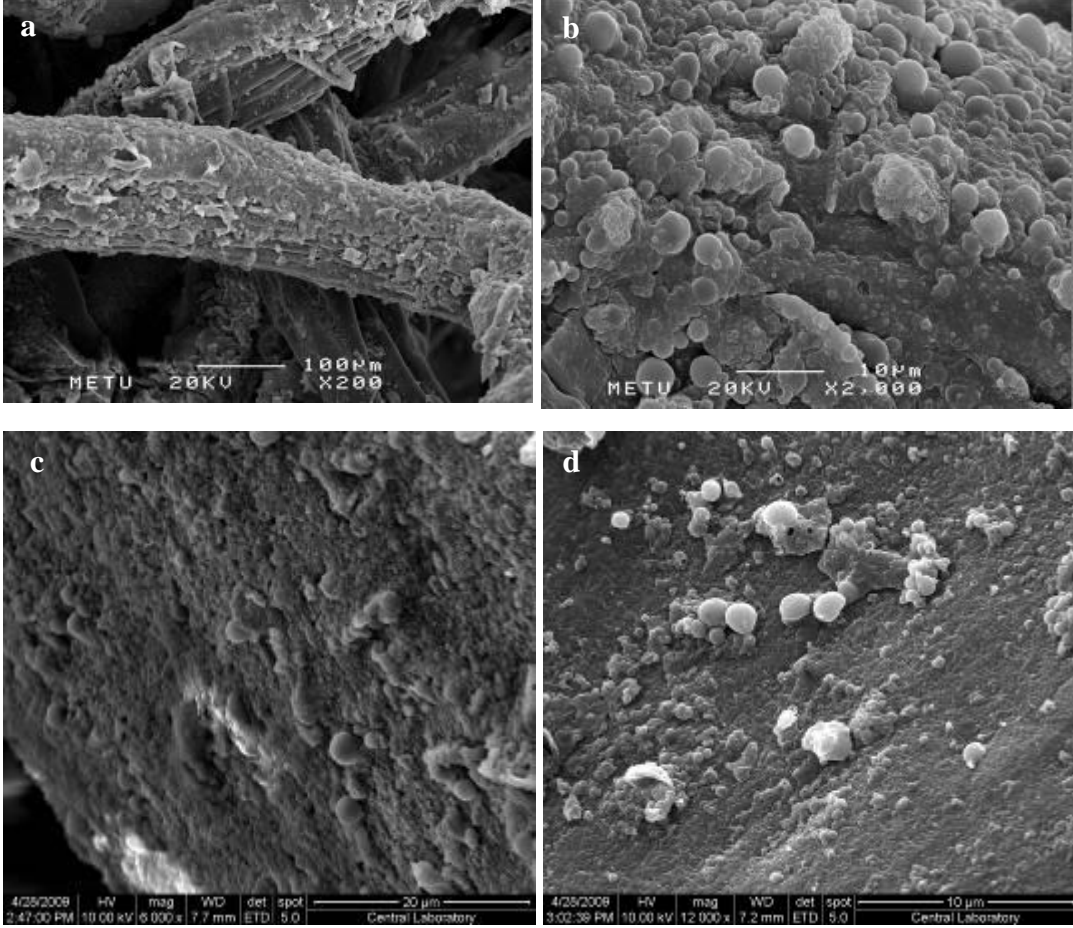
farklılık açıkça görülmektedir. CHI4-PEO2-HAc5 doku desteklerinde ise, nanokapsül içermeyen fiberlerin de yüzeyleri pürüzlü olduğu için, önemli bir farklılık gözlenmemiştir (Şekil 3.13).



**Şekil 3.13** PLGA nanokapsül yüklenmiş (NP-IN) doku desteklerinin SEM mikrografları (a) CHI4-HAc2 fiber, (b) CHI4-PEO2-HAc5 fiber (x1,000, küçük mikrograflar dahil).

İkinci metotta, PLGA ve PHBV nanokapsüller CHI4-HAc2 doku desteklerinin üzerine ekilmiştir (Şekil 3.14 a,b). Nanokapsüllerin zamanla fiberler üzerindeki durumu 21 gün süresince SEM mikrografları ile hücre kültür ortamı (DMEM 20% fetal bovine serum (FBS),

100 µg/mL penisilin and 100 µg/mL streptomycin) (37°C, % 5 CO<sub>2</sub>) içerisinde değerlendirilmiştir. SEM mikrograflarında (Şekil 3.14 c, d) nanokapsüllerin 21. gün sonunda halen fiberler üzerinde bulunduğu gözlenmiştir.

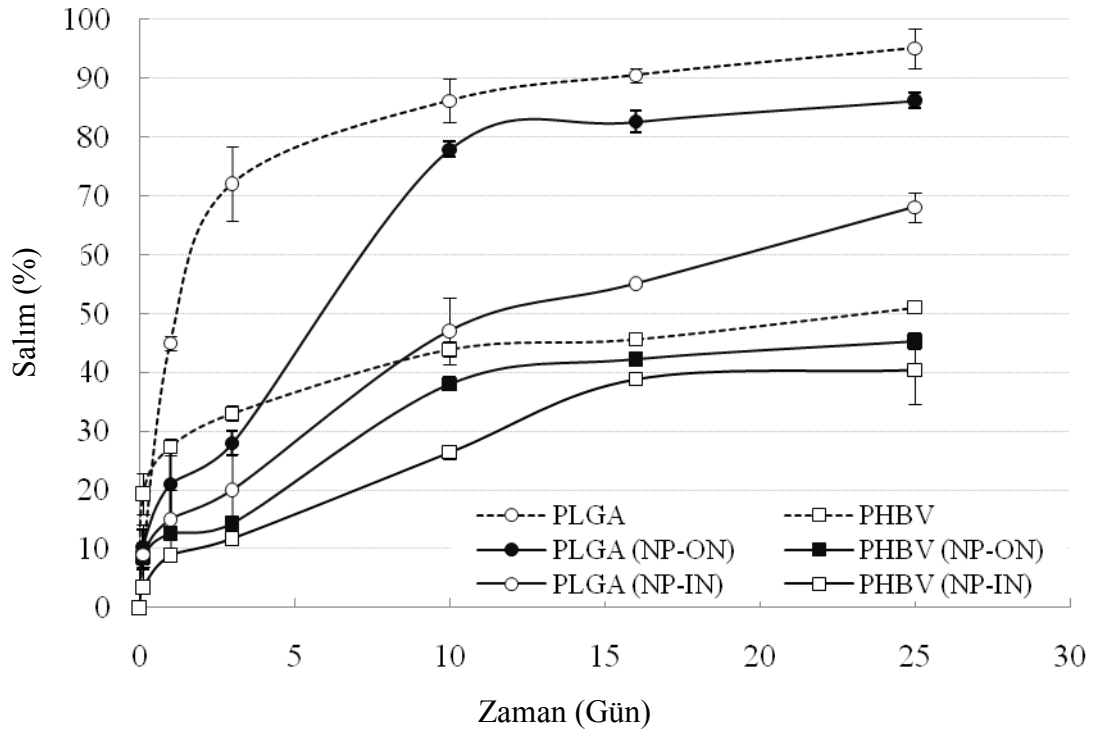


**Şekil 3.14** NP-ON yöntemiyle hazırlanan CHI4-HAc2 doku desteklerinin üzerine yüklenmiş PLGA ve PHBV nanokapsüllerin SEM mikrografları (a) x200; ilk gün, (b) x2,000; ilk gün, (c) x6,000; 21.gün, (d) x12,000; 21.gün.

### 3.2.5 Salım Karakteristiği

#### 3.2.5.1 Kitosan Doku Desteklerinin Salım Karakteristiği

Salım kinetiği çalışmaları için, serbest nanokapsüllerden BSA salım grafikleri ile NP-ON and NP-IN olmak iki şekilde hazırlanan CHI4-HAc2 doku desteklerinden BSA salım grafikleri karşılaştırılarak yükleme basamağının etkileri incelenmiştir. PLGA ve PHBV nanokapsüllerin CHI4-HAc2 doku desteklerine eklenmesinin ani ve hızlı salınımı yavaşlattığı tespit edilmiştir (şekil 3.15).



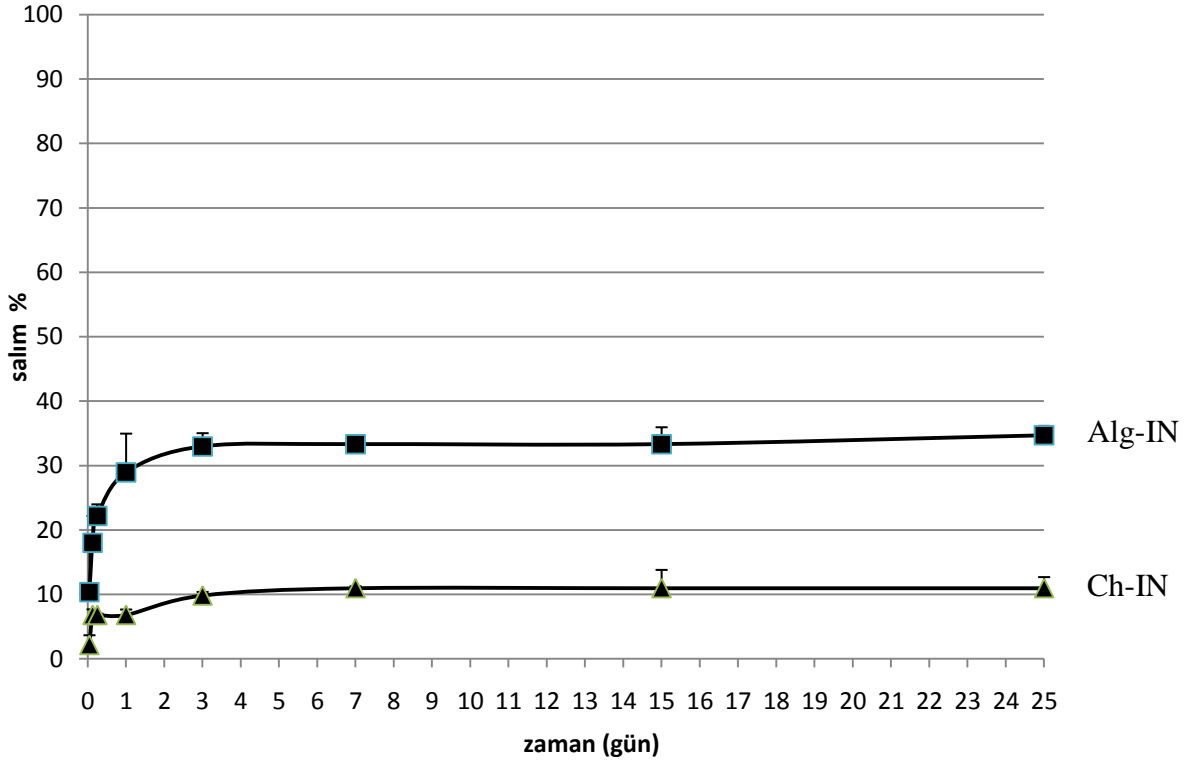
şekil 3.15 PLGA ve PHBV nanokapsüllerden ve bu kapsüllerle yüklü doku desteklerinden BSA salım grafikleri.

PLGA ve PHBV nanokapsüllerden salım oranları arasındaki farklılıklar ilk 3 gün içerisinde gözlenmiştir. Daha nce, PLGA nanokapsüllerin, en yüksek protein taşıma yüzdesine sahip olmasının yanı sıra en yüksek protein salım hızına sahip olmaları nedeniyle sıralı bir salım sisteminin kısa dönem salım parçası olarak kullanılması optimal koşul olarak belirlenmişti.

İnkübasyonun 21. gününün sonunda, PLGA nanokapsüllerine yüklenmiş BSA proteininin tamamının salındığı gözlenmesine rağmen, PHBV nanokapsüllerine yüklenmiş BSA proteininin tamamının salınmadığı tespit edilmiştir. Bununla birlikte, NP-IN yöntemiyle hazırlanan CHI4-HAc2 doku desteklerinin içerisinde yüklenen PLGA ve PHBV nanokapsüllerinin salım hızının, NP-ON yöntemiyle hazırlanan yüklü doku desteklerine göre çok daha yavaş olduğu tespit edilmiştir. 25. gün sonunda, NP-IN yöntemiyle hazırlanan doku destekleri içerisinde bulunan PLGA ve PHBV nanokapsüllerin sırasıyla BSA salım miktarlarının % 70 ve % 40 olduğu gözlenmiştir. Bu bulgulara ek olarak, salım miktarlarının ve dolayısıyla salım kinetiğinin, nanokapsülün bulunduğu yere (NP-IN veya NP-ON) göre değiştiği açıkça görülmektedir. Hazırlanan doku desteklerinin salım miktarlarında, nanokapsüller fiberler üzerinde bulunduğu (NP-ON), BSA model proteininin katlanmasına bağlı olarak sadece difüzyonel kısıtlama söz konusu iken nanokapsüller fiber yapısı içerisinde hazırlandığında (NP-IN) fiber yapısından kaynaklı ek bir engelden de etkilendiği düşünülebilir.

### **3.2.5.2 Kitosan Bazlı Çift Katmanlı Doku Desteklerinin Salım Karakteristiği**

Çift katmanlı doku desteklerine BSA yüklenmesi, ıslak eğirme yöntemi ile hazırlanan kitosan fiberlerin içine (Ch-IN) veya kitosan fiberler hazırlandıktan sonra aljinat ile kaplanırken bu tabakanın içine (Alg-IN) olmak üzere iki farklı katmandan da gerçekleştirilmiştir. Bu durumda, nanotanecek kullanılmadan BSA direk kitosan veya aljinat içine yüklenmiştir. Bu iki tip yükleme sonucu elde edilen salım karakteristiği söz konusu sistemin nanoparçacık kullanılmasına gerek kalmadan sıralı salım yapabileceğini göstermektedir (Şekil 3.16). Bu tür bir sistem de daha ekonomik bir uygulama için ayrıca önerilmektedir.



Şekil 3.16 Çift katmanlı doku desteklerinden BSA salımı

## SONUÇ

Çift katmanlı veya multi katmanlı fiber yapılar ve değişik biyoaktif ajanlar ile yüklenmiş farklı yapıdaki nanotanecekler, amaca uygun olarak bir araya getirilerek çok değişik kompozit sistemler hazırlanabilir. Bu sistemlerin içlerinde bulunan aktif ajanları doğada olduğu gibi farklı hızda, farklı sürede, ve farklı düzeyde salması sağlanabilir. Diğer taraftan doku destek malzemesi biyobozunur kimyasallar ile hazırlanırsa, destek yok olurken doku kendini yenilemiş olacaktır. Bu şekilde hazırlanacak ilaç taşıyıcılar doku mühendisliği amaçlı olduğu gibi tedavi edici taşıyıcı cihazlar olarakta önem taşımaktadır.

## KAYNAKLAR

ABARRATEGÍ, A., López-Morales, Y., Ramos, V., Civantos, A., López-Duñ, L., Marco, F., López-Lacomba, J.L. Chitosan scaffolds for osteochondral tissue regeneration. *J Biomed Mater Res* 2010;95A:1132-1141.

AGRAWAL C.M., Ray R.B. Biodegradable polymeric scaffolds for musculoskeletal tissue engineering. *J Biomed Mater Res* 2001; 55: 141–150.

AKAZAWA T., Murata M., Sasaki T., Tazaki J., Kobayashi M., Kanno T., Nakamura K., Arisue M. Biodegradation and bioabsorption innovation of the functionally graded bovine bone–originated apatite with blood permeability. *J Biomed Mater Res* 2006; 76A: 44 –51.

ALLORÍ A.C., Sailon A.M., Warren S.M. Biological Basis of Bone Formation, Remodeling, and Repair- Part I: Biochemical Signaling Molecules. *Tissue Eng Part B* 2008; 14(3): 259-273.

BARAN E.T., Ozer N., Hasirci V. In vivo half life of nanoencapsulated L-asparaginase. *J Mater Sci Mater Med* 2002; 13: 1113-1121.

BENYA P.D., Schaffer J.D. Dedifferentiated chondrocytes reexpress the differentiated collagen phenotype when cultured in agarose gels. *Cell* 1982; 30: 215-224.

BESSA P.C., Casal M., Reis R.L. Bone morphogenetic proteins in tissue engineering: the road from the laboratory to the clinic, part I (basic concepts). *J Tissue Eng Regen Med* 2008; 2: 1–13.

BOCCACCINI A.R., Roether J.A., Hench L.L., Maquet V., Jerome R.A. composites approach to tissue engineering. *Ceram Eng Sci Proc* 2002; 23: 805–816.

BRIGGER I., Dubernet C., Couvreur P. Nanoparticles in cancer therapy and diagnosis. *Adv Drug Deliv Rev* 2002; 54: 631-651.

BUCKWALTER J.A., Glimcher M.J., Cooper R.R, Recker R. Bone biology Part II: Formation, form, modeling, remodeling, and regulation of cell function. *J Bone Joint Surg* 1995; 77-A:1276-1283.

BURGESS D.J., Hickey A.J. Microsphere technology and applications. In: Swarbrick, Boylan, editors. *Encyclopedia of Pharmaceutical Technology*. New York:Marcel Dekker; 1994. p 1–29.

BUTTAFOCO L., Boks N.P., Poot A.A., Dijkstra P.J., Vermes I., Feijen J. Melt spinning and fibre winding of Trimethylenecarbonate (TMC)-based polymers for tissue engineering small diameter blood vessels. *Transactions - 7th World Biomaterials Congress 2004*; 711.

CARANO R.A.D., Filvaroff E.H. Angiogenesis and bone repair. *Drug Discovery Today* 2003; 8: 980-989.

CHAU A.M.T., Mobbs R.J. Bone graft substitutes in anterior cervical discectomy and fusion. *Eur Spine J* 2009; 18: 449–464.

CHEN F.M., Zhao Y.M., Zhang R., Jin T., Sun H.H., Wu Z.F., Jin Y. Periodontal regeneration using novel glycidyl methacrylated dextran (Dex- GMA)/gelatin scaffolds containing microspheres loaded with bone morphogenetic proteins. *J Contr Release* 2007; 121: 81-90.

CHO T.J., Gerstenfeld L.C., Einhorn T.A. Differential temporal expression of members of the transforming growth factor beta superfamily during murine fracture healing. *J Bone Miner Res* 2002; 17: 513–520.

CHUNG Y.S., Kang S.I., Kwon O.W., Shin D.S., Lee S.G., Shin E.J., Min B.G., Lyoo W.S. Preparation of hydroxyapatite/poly(vinyl alcohol) composite fibers by wet spinning and their characterization. *J App Polym Sci* 2007; 106(5): 3423-3429.

COWAN C.M., Aghaloo T., Chou Y.F., Walder B., Zhang X., Soo C., Ting K., Wu B. MicroCT evaluation of three-dimensional mineralization in response to BMP-2 doses in vitro and in critical sized rat calvarial defects. *Tissue Eng* 2007; 13(3): 501-512.



CUI F., Cun D., Tao A., Yang M., Shi K., Zhao M., Guan Y. Preparation and characterization of melittin-loaded poly(DL-lactic acid) or poly(DL-lactic-co-glycolic acid) microspheres made by the double emulsion method. *J Contr Release* 2005; 107: 310–319.

DEPAN, D., Venkata Surya, P.K.C., Girase, B., Misra, R.D.K. Organic/inorganic hybrid network structure nanocomposite scaffolds based on grafted chitosan for tissue engineering. *Acta Biomater* 2011;7:2163-2175.

DRURY J.L., Mooney D.J. Hydrogels for tissue engineering: scaffold design variables and applications. *Biomaterials* 2003; 24: 4337-4351.

EBRAHEİM N.A., Elgafy H., Xu R. Bone-Graft Harvesting From Iliac and Fibular Donor Sites: Techniques and Complications. *J Am Acad Orthop Surg* 2001; 9(3): 210-218.

FREYMAN T.M., Yannas I.V., Gibson L.J. Cellular materials as porous scaffolds for tissue engineering. *Prog in Mater Sci* 2001; 46: 273-282

FUNAKOSHĪ T., Majima T., Iwasaki N., Yamane S., Masuko T., Minami A., Harada K., Nishimura S.I. Novel chitosan-based hyaluronan hybrid polymer fibers as a scaffold in ligament tissue engineering. *J Biomed Mater Res* 2005; 74A(3): 338-346

GRAY, H. *Anatomy of the Human Body*. Twentieth ed. Revised and re-edited by Lewis W.H., Lea & Febiger, New York, USA, 2000.

GONALVES, A., Costa, P., Rodrigues, M.T., Dias, I.R., Reis, R.L., Gomes, M.E. Effect of flow perfusion conditions in the chondrogenic differentiation of bone marrow stromal cells cultured onto starch based biodegradable scaffolds. *Acta Biomater* 2011;7:1644-1652.

HAİDAR, Z.S., Hamdy, R.C., Tabrizian, M. Biocompatibility and safety of a hybrid core-shell nanoparticulate OP-1 delivery system intramuscularly administered in rats. *Biomaterials* 2010;31:2746-2754.

HAUSCHKA P.V., Mavrakos A.E., Iafrazi M.D., Doleman S.E., Klagsbrun M. Growth Factors in Bone Matrix. *J Biol Chem* 1986; 261(27): 12665-12674.

HENCH L., Polak J. Third generation biomedical materials. *Science* 2002; 295: 1014–1017.

HENCH L.L. *Biomaterials*. *Science* 1980; 208: 826–831.

HUTMACHER D., Hurzeler M.B., Schliephake H. A review of material properties of biodegradable and bioresorbable polymer for GTR and GBR. *J Oral Maxillofac Implants* 2000; 11: 667–678.

JAKLENEC A., Hinckfuss A., Bilgen B., Ciombor D.M., Aaron R., Mathiowitz E. Sequential release of bioactive IGF-I and TGF- $\beta$ 1 from PLGA microsphere-based scaffolds. *Biomaterials* 2008; 29: 1518-1525.

JEON O., Song S.J., Yang H.S., Bhang S.H., Kang S.W., Sung M.A., Lee J.H., Kim B.S. Long-term delivery enhances in vivo osteogenic efficacy of bone morphogenetic protein-2 compared to short-term delivery. *Biochem Biophys Res Comm* 2008; 369: 774-780.

JIANG, T., Nukavarapu, S.P., Deng, M., Jabbarzadeh, E., Kofron, M.D., Doty, S.B., Abdel-Fattah, W.I., Laurencin, C.T. Chitosan-poly(lactide-co-glycolide) microsphere-based scaffolds for bone tissue engineering: In vitro degradation and in vivo bone regeneration studies. *Acta Biomater* 2010;6:3457-3470.

KANG S.W., Lim H.W., Seo S.W., Jeon O., Lee M., Kim B.S. Nanosphere-mediated delivery of vascular endothelial growth factor gene for therapeutic angiogenesis in mouse ischemic limbs. *Biomaterials* 2008; 29: 1109-1117.

KATO K., Eika Y., Ikada Y. Deposition of hydroxiapatite thin layer onto a polymer surface carrying grafted phosphate polymer chains. *J Biomed Mater Res* 1996; 32: 687–691.

KAWAKAMI T., Antoh M., Hasegawa H., Yamagishi T., Ito M., Eda S. Experimental study on osteoconductive properties of a chitosan-bonded hydroxyapatite self-hardening paste. *Biomaterials* 1992; 13: 759–763.

KE, Y., Wang, Y.J., Ren, L., Zhao, Q.C., Huang, W. Modified PHBV scaffolds by in situ UV polymerization: Structural characteristic, mechanical properties and bone mesenchymal stem cell compatibility. *Acta Biomater* 2010;6:1329-1336.

KEMPEN D.H.R., Lu L., Hefferan T.E., Creemers L.B., Maran A., Classic K.L., Dhert W.J.A., Yaszemski M.J. Retention of in vitro and in vivo BMP-2 bioactivities in sustained delivery vehicles for bone tissue engineering. *Biomaterials* 2008; 29: 3245–3252.

KHAN S.N., Fraser J.F., Sandhu H.S., Cammisa F.P., Girardi F.P., Lane J.M. Use of Osteopromotive Growth Factors, Demineralized Bone Matrix, and Ceramics to Enhance Spinal Fusion. *J Am Acad Orthop Surg* 2005; 13(2): 129-137.

KHOR E., Lim L.Y. Implantable applications of chitin and chitosan. *Biomaterials* 2003; 24(13): 2339-2349.

KIM H.K., Chung H.J., Park T.G. Biodegradable polymeric microspheres with “open/closed” pores for sustained release of human growth hormone. *J Contr Release* 2006; 112: 167–174.

KOK F., Hasirci V. Polyhydroxybutyrate And Its Copolymers: Applications In The Medical Field. In: Yaszemski, Trantolo, Lewandrovski, Hasirci, Altobelli, Wise, editors. *Tissue Engineering and Novel Delivery Systems*. CRC Press; 2003. p 543-562.

KOLAMBKAR, Y.M., Dupont, K.M., Boerckel, J.D., Huebsch, N., Mooney, D.J., Hutmacher, D.W., Guldberg, R.E. An alginate-based hybrid system for growth factor delivery in the functional repair of large bone defects. *Biomaterials* 2011;32:65-74.

LANGER R., Vacanti J.P. Tissue engineering. *Science* 1993; 260: 920-926.

LAURENCİN C, Khan Y., El-Amin S.F. Bone graft substitutes. *Expert Rev Med Devices* 2006; 3(1): 49-57.

LAZZERI L., Cascone M.G., Quiriconi S., Morabito L., Giusti P. Biodegradable hollow microfibres to produce bioactive scaffolds. *Polymer International* 2005; 54(1): 101-107.

LEE S.C., Shea M., Battle M.A., Kozitza K., Ron E., Turek T., Schaub R.G., Hayes W.C. Healing of large segmental defects in rat femurs is aided by RhBMP-2 in PLGA matrix. *J Biomed Mater Res* 1994; 28: 1149-1156.

LEE S.H., Shin H. Matrices and scaffolds for delivery of bioactive molecules in bone and cartilage tissue engineering. *Adv Drug Deliv Rev* 2007; 59: 339–359.

LEE, J.W., Kang, K.S., Lee, S.H., Kim, J.-Y., Lee, B.-K., Cho, D.-W. 1 Bone regeneration using a microstereolithography-produced customized poly(propylene fumarate)/diethyl fumarate photopolymer 3D scaffold incorporating BMP-2 loaded PLGA microspheres . *Biomaterials* 2011;32:744-752.

LEMAIRE V., Belair J., Hildgen P. Structural modeling of drug release from biodegradable porous matrices based on a combined diffusion/erosion process. *Int J Pharm* 2003; 258: 95–107.

LEONOR, I.B., Rodrigues, M.T., Gomes, M.E., Reis, R.L. In situ functionalization of wet-spun fibre meshes for bone tissue engineering. *J Tissue Eng Regen Med* 2011;5:104-111.

LYONS, F.G., Al-Munajjed, A.A., Kieran, S.M., Toner, M.E., Murphy, C.M., Duffy, G.P., O'Brien, F.J. The healing of bony defects by cell-free collagen-based scaffolds compared to stem cell-seeded tissue engineered constructs. *Biomaterials* 2010;31:9232-9243.

MA Z., Gao C., Gong Y., Ji J., Shen J. Immobilization of natural macromolecules on poly-l-lactic acid membrane surface in order to improve its cytocompatibility. *J Biomed Mater Res* 2002; 63: 838–847.

MAATZ R., Bauermeister A., A Method of Bone Maceration: Results in Animal Experiments. *J Bone Joint Surg Am* 1957; 39: 153-166.

MCKAY W.F., Peckham S.M., Badura J.M. A comprehensive clinical review of recombinant human bone morphogenetic protein-2 (INFUSE® Bone Graft). *Int Orthop* 2007; 31: 729-734.

MANKIN H.J., Springfield D.S., Gebhardt B.C., Tomford W. Current status of allografting for bone tumors. *Orthopedics* 1992; 15: 1147-1154.

MARIEB E.N., Hoehn K. *Human Anatomy & Physiology* 7th Edition, San Francisco, Benjamin Cummings, 2007.

MARTINO A.D., Sittinger M., Risbud M.V. Chitosan: a versatile biopolymer for orthopaedic tissue-engineering. *Biomaterials* 2005; 26: 5983–5990.

MATSUMOTO T., Okazaki M., Inoue M., Yamaguchi S., Kusunose T., Toyonaga T., Hamada Y., Takahashi J. Hydroxyapatite particles as a controlled release carrier of protein. *Biomaterials* 2004; 25: 3807-3812.

MORI T., Okumura M., Matsuura M., Ueno K., Tokura S., Okamoto Y. Effects of chitin and its derivatives on the proliferation and cytokine production of fibroblasts in vitro. *Biomaterials* 1997; 18: 947–951.

NAVARRO M., Michiardi A., Castano O., Planell J.A. Biomaterials in orthopaedics. *R Soc Interface* 2008; 5: 1137–1158.

NELSON K.D., Romero A., Waggoner P., Crow B., Borneman A., Smith G.M. Technique Paper for Wet-Spinning Poly(L-lactic acid) and Poly(DL-lactide-co-glycolide) Monofilament Fibers. *Tissue Eng* 2003; 9(6): 1323-1330.

NISHIMURA K., Nishimura S., Nishi N., Saiki I., Tokura S., Azuma I. Immunological activity of chitin and its derivatives. *Vaccine* 1984; 2: 93–99.

NYSTROM E., Ahlqvist J., Legrell P.E., Kahnberg K.E. Bone graft remodelling and implant success rate in the treatment of the severely resorbed maxilla: a 5-year longitudinal study. *Int J Oral Maxillofac Surg* 2002; 31(2): 158-164.

OKAMOTO Y., Minami S., Matsushashi A., Sashiwa H., Saimoto H., Shigemasa Y. Polymeric N acetyl-d-glucosamine (Chitin) induces histionic activation in dogs. *J Vet Med Sci* 1993; 55: 739–742.

PATEL Z.S., Young S., Tabata Y., Jansen J.A., Wong M.E.K., Mikos A.G. Dual delivery of an angiogenic and an osteogenic growth factor for bone regeneration in a critical size defect model. *Bone* 2008b; 43: 931–940.

PETERSON B., Whang P.G., Iglesias R., Wang J.C., Lieberman J.R. Osteoinductivity of Commercially Available Demineralized Bone Matrix. *J Bone Joint Surg Am* 2004; 86: 2243-2250.

PUPPI, D., Piras, A.M., Chiellini, F., Chiellini, E., Martins, A., Leonor, I.B., Neves, N., Reis, R. Optimized electro- and wet-spinning techniques for the production of polymeric fibrous scaffolds loaded with bisphosphonate and hydroxyapatite. *J Tissue Eng Regen Med* 2011;5: 253-263.

SAEIDI, N., Sander, E.A., Zareian, R., Ruberti, J.W. Production of highly aligned collagen lamellae by combining shear force and thin film confinement. *Acta Biomater* 2011;7:2437-2447.

SAHOO S.K., Labhasetwar V. Nanotech approaches in drug delivery and Imaging. *Drug Discovery Today* 2003; 8(24): 1112-1120.

SANTOS M.I., Tuzlakoglu K., Fuchs S., Gomes M.E., Peters K., Unger R.E., Piskin E., Reis R.L., Kirkpatrick C.J., Endothelial cell colonization and angiogenic potential of combined nano- and micro-fibrous scaffolds for bone tissue engineering. *Biomaterials* 2008; 29(32): 4306-4313.

SCHRIER J.A., Fink B.F., Rodgers J.B., Vasconez H.C., DeLuca P.P. Effect of a Freeze-Dried CMC/PLGA Microsphere Matrix of rhBMP-2 on Bone Healing. *AAPS PharmSciTech* 2001; 2: article 18.

SENGUPTA, S., Park, S.-H., Patel, A., Carn, J., Lee, K., Kaplan, D.L. Hypoxia and amino acid supplementation synergistically promote the osteogenesis of human mesenchymal stem cells on silk protein scaffolds. *Tissue Eng* 2010;16A:3623-3634.

Singla A.K., Chawla M. Chitosan: some pharmaceutical and biological aspects—an update. *Pharm Pharmacol* 2001; **53**: 1047–1067.

SPAANS C.J., Belgraver V.W., Rienstra O., de Groot J.H., Veth R.P.H., Pennings A.J. Solvent-free fabrication of micro-porous polyurethane amide and polyurethane-urea scaffolds for repair and replacement of the knee-joint meniscus. *Biomaterials* 2000; 21: 2453–2460.

SUTHERLAND D., Bostrom M., *Grafts and Bone Graft Substitutes, from Bone regeneration and Repair: Biology and Clinical Applications*. Ed. Lieberman J.B., Friedlaender G.E, Humana Press, USA, 133-156. 2005.

TABATA Y., Yamada K., Miyamoto S., Nagata I., Kikuchi H., Aoyama I., Tamura M., Ikada Y. Bone regeneration by basic fibroblast growth factor complexed with biodegradable hydrogels. *Biomaterials* 1998; 19: 807-815.

TANASE, C.E., Popa, M.I., Verestiuc, L. Biomimetic bone scaffolds based on chitosan and calcium phosphates. *Mater Lett* 2011;65:1681-1683.

TANIGAWA T., Tanaka Y., Sashiwa H., Saimoto H., Shigemasa Y. Various biological effects of chitin derivatives. In: C.J. Brine, P.A. Sandford and J.P. Zikakis, Editors, *Advances in chitin and chitosan*, Elsevier, pp. 206–215, 1992.

TEMENOFF J.S., Mikos A.G. Tissue engineering for regeneration of articular cartilage. *Biomaterials* 2000; 21: 431–440.

TOKURA S., Ueno K., Miyazaki S., Nishi N. Molecular weight dependent antimicrobial activity by chitosan. *Macromol Symp* 1997; 120: 1–9.

TUZLAKOGLU K., Bolgen N., Salgado A.J., Gomes M.E., Piskin E., Reis R.L. Nano- and micro-fiber combined scaffolds: A new architecture for bone tissue engineering. *J Mater Sci Mater Med* 2005; 16: 1099-1104.

URİST MR. Bone: Formation by autoinduction. *Science* 1965;150:893–899.  
van Meekeren, J. Heel-en Geneeskonstige Aanmerkingen. Commelijjn, 1668.

WANG E.A., Rosen V., D'Alessandro J.S., Bauduy M., Cordes P., Harada T., Israel D.I., Hewick R.M., Kerns K.M., LaPan P., Luxenberg D.P., McQuaid D., Moutsatsos I.K., Nove J., Wozney J.M. Recombinant human bone morphogenetic protein induces bone formation. *Proc Natl Acad Sci USA* 1990; 87: 2220-2224.

WANG L., Shelton R.M., Cooper P.R., Lawson M., Triffitt J.T., Barralet J.E. Evaluation of sodium alginate for bone marrow cell tissue engineering. *Biomaterials* 2003; 24(20): 3475-3481.

WANG, G., Zheng, L., Zhao, H., Miao, J., Sun, C., Ren, N., Wang, J., (...), Tao, X. In vitro assessment of the differentiation potential of bone marrow-derived mesenchymal stem cells on genipin-chitosan conjugation scaffold with surface hydroxyapatite nanostructure for bone tissue engineering. *Tissue Eng* 2011;17A:1341-1349.

WEI G., Jin Q., Giannobile W.V., Ma P.X. The enhancement of osteogenesis by nano-fibrous scaffolds incorporating rhBMP-7 nanospheres. *Biomaterials* 2007; 28: 2087–2096.

WEI, K., Li, Y., Kim, K.-O., Nakagawa, Y., Kim, B.-S., Abe, K., Chen, G.-Q., Kim, I.-S. Fabrication of nano-hydroxyapatite on electrospun silk fibroin nanofiber and their effects in osteoblastic behavior. *J Biomed Mater Res* 2011;97A:272-280.

WHITE A.P., Vaccaro A.R., Hall J.A., Whang P.G., Friel B.C., McKee M.D. Clinical applications of BMP-7/OP-1 in fractures, non-unions and spinal fusion. *Int Orthop* 2007; 31: 735-741.

XIE, G., Sun, J., Zhong, G., Liu, C., Wei, J. Hydroxyapatite nanoparticles as a controlled-release carrier of BMP-2: Absorption and release kinetics in vitro. *J Mater Sci Mater Med* 2010;21:1875-1880.

YOUNGER E.M., Chapman M. Morbidity at bone graft donor sites. *J Orthop Trauma* 1989; 3: 192-195.

ZHANG K., Zhang M. Calcium phosphate/chitosan composite scaffolds for controlled in vitro antibiotic drug release. *J Biomed Mater Res* 2002; 62: 378–786.



ZOLNÍK B.S., Leary P.E., Burgess D.J. Elevated temperature accelerated release testing of PLGA microspheres. *J Contr Release* 2006; 112: 293–300.

**TÜBİTAK**  
**PROJE ÖZET BİLGİ FORMU**

<b>Proje No: 108T805</b>
<b>Proje Başlığı:</b> Kemik Doku Mühendisliğine Yönelik Büyüme Faktörlerinin Sıralı Salımını Sağlayan Nanopartikül Hazırlanması ve Kitosan Yapılara Eklenerek Kompozit Doku Destekleri Oluşturulması
<b>Proje Yürütücüsü ve Araştırmacılar:</b> <b>Yürütücü:</b> Prof. Dr. Nesrin HASIRCI <b>Araştırmacılar:</b> Prof. Dr. Vasıf HASIRCI Dr. Pınar YILGÖR Elif VARDAR Aysel KIZILTAY
<b>Projenin Yürütüldüğü Kuruluş ve Adresi:</b> Orta Doğu Teknik Üniversitesi Kimya Bölümü İnönü Bulvarı 06531, Ankara
<b>Destekleyen Kuruluş(ların) Adı ve Adresi:</b>
<b>Projenin Başlangıç ve Bitiş Tarihleri:</b> 01.06.2009- 01.06.2011
<b>Öz (en çok 70 kelime)</b> Bu projede amaç, kemik doku mühendisliğinde kullanılmak üzere, sıralı büyüme faktörü salımı yapabilen nanoparçacıklar hazırlamak ve bunları doku destekleri içine yerleştirerek fonksiyonel kompozitler elde etmektir. Proje kapsamında, büyüme faktörlerini taşıyacak polimerik nanoparçacıklar üretilmiş ve bunlar daha sonra ıslak eğirme yöntemiyle hazırlanan doku desteklerine yerleştirilmiştir. Amaç, doğal süreci taklit edebilen ve bu yolla kemik dokuda iyileşmeyi teşvik edecek bir sistem oluşturmaktır.
<b>Anahtar Kelimeler:</b> Kemik Doku Mühendisliği, Nanopartiküller, Islak Eğirme
<b>Fikri Ürün Bildirim Formu Sunuldu mu?</b> Evet <input type="checkbox"/> Gerekli Değil <input checked="" type="checkbox"/> Fikri Ürün Bildirim Formu'nun tesliminden sonra 3 ay içerisinde patent başvurusu yapılmalıdır.
<b>Projeden Yapılan Yayınlar:</b> Yayınlar: P. Yilgor, R.A. Sousa, R.L Reis, N. Hasirci, V. Hasirci, Effect of scaffold architecture and BMP2- BMP7 delivery on in vitro bone regeneration, J Mater Sci Mater Med., 21(11):2999-3008, 2010

P.Yilgor, N.Hasirci, V.Hasirci, Sequential BMP-2/BMP-7 Delivery from Polyester Nanocapsules, J of Biomed Mater Res: Part A, JBMR-PartA, 93, 2, 528-536, 2010

P. Yilgor, K. Tuzlakoglu, R.L. Reis, N. Hasirci, V. Hasirci, Incorporation of a sequential BMP-2/BMP-7 delivery system into chitosan-based scaffolds for bone tissue engineering, Biomaterials 30 35513559, 2009

**Konferanslar:**

E. Vardar , V. Hasirci, N. Hasirci, Cell Adhesion, Proliferation and Diffusion in Semi-IPN Agarose Hydrogels Containing Chitosan and Alginic Acid, TissueEngineering and Regenerative Medicine International Society, TERMIS-2010, 13-17 June 2010, Galway, Ireland

C. Işıklı, T. Endogan, A. Kiziltay, V. Hasirci, N. Hasirci, Dogal Polimer Temelli Kompozit Filmlerin Sert Doku Mühendisliğine Yonelik Hazirlanmasi ve Karakterizasyonu, Biyomedikal Mühendisliği Ulusal Toplantısı-BİYOMUT 2010, 21-24 April 2010, Antalya

P.Yilgor, N.Hasirci, V.Hasirci, Sequential BMP-2/BMP-7 Delivery from Polyester Nanocapsules, The 15th International Biomedical Science and TechnologySymposium, August 16-19, 2009, Cyprus

**Ekte Bulunan “ARDEB Başarı Öyküsü Formu”, “Kazanımlar” Bölümünde Belirtilen Kriterlere Göre Proje Çıktılarınızın Başarı Öyküsü Niteliği Taşındığını Düşünüyorsanız “ARDEB Başarı Öyküsü Formu”nu doldurunuz.**