

**Anti-TNF Kontrollü Salım Sisteminin Romatoid
Artirit Tedavilerine Yönelik Etkilerinin Hücre
Kültüründe İncelenmesi**

Proje No: 109S104

Doç. Dr. Ayşen Tezcaner

Doç. Dr. Dilek Keskin

Prof. Dr. Seza Özen

Prof. Dr. Ali Usanmaz

Prof. Dr. Bülent Atilla

MAYIS 2012

ANKARA

Önsöz

Bu projede, romatoid artirit (RA) tedavisinde klinik olarak kullanımı yaygın bir anti-inflamatuvar ilaç olan anti-TNF α 'nın (Enbrel®) eklem içinde kontrollü ve uzun süreli salımının sağlanması için polikaprolakton (PCL) ve PEGile polikaprolakton (PEG-PCL-PEG) mikroküreler hazırlanmıştır. Geliştirilen salım sistemleri ile bu ilacın tedavide kullanımına yönelik daha önceden çalışılmamış olan yeni bir yaklaşım geliştirilmiştir. Uzun süreli anti-TNF α ilaç kullanımının sonucunda oluşan yan etkiler ve derialtı enjeksiyondan doğan rahatsızlıklar yüzünden anti-TNF α ilaç tedavisinde bazı kısıtlamalarla karşılaşılmaktadır. Projede, biyoyumlu, biyobozunur ve bozunma ürünleri asidik bir çevre oluşturmayan PCL ve PEG-PCL-PEG polimerleri ile eklem içine enjekte edilebilecek, dokuda uzun süreli olarak etkin dozlarda anti-TNF'in salımını sağlayacak mikroküre taşıma sistemleri geliştirilmiştir. Ayrıca, geliştirilen bu sistemlerin enflamasyonu uzun süreli baskılama etkisi RA'lı hastalardan alınan sinovisit hücre kültürü üzerinde in vitro olarak incelenmiştir.

Mikrokürelerin hazırlanması, in situ özelliklerinin belirlenmesi ve in vitro modelde biyoyumluluk ve biyoetkinliklerinin incelenmesi temelde ODTÜ Mühendislik Bilimleri Bölümü laboratuvarlarında ve kısmen ODTÜ Merkez Laboratuvar ve Bilkent Üniversitesi Ulusal Nanoteknoloji Araştırma Merkezi'nde hizmet alımı karşılığında yapılmıştır. PEG-PCL-PEG mikrokürelerin hazırlanmasında kullanılan kopolimer ODTÜ Kimya Bölümü Polimer Laboratuvarı'nda hazırlanmıştır. Hazırlanan PCL ve PEG-PCL-PEG mikrokürelerinin in vitro deneyler öncesindeki sterilizasyonu Türkiye Atom Enerjisi Kurumu'nda hizmet alımı karşılığında yapılmıştır. Projede, in vitro incelemelerde kullanılan sinoviyal fibroblastların izole edileceği sinoviyal membranların alınacağı RA'lı hastaların seçimi Hacettepe Üniversitesi Ortopedi Uzmanı Prof. Dr. Bülent Atilla ve Pediatri Nefroloji ve Romatoloji Uzmanı Prof. Dr. Seza Sözen tarafından yapılmıştır. Geliştirilen taşıma sistemlerinin etkisinin RA'lı hastalardan alınan sinovisit hücre kültürü üzerinde incelendiği in vitro deneyler sonucunda yapılan PCR analizleri ve gen ifadesini takibi Gen-TR Moleküller Genetik ve Biyoteknoloji firmasında hizmet alımı karşılığında yapılmıştır. Projenin tamamı TUBİTAK-SBAG tarafından desteklenmiştir.

İçindekiler

Özet	xvii
Abstract	xviii
Giriş.....	1
Genel Bilgiler	3
Çalışmanın Hipotezi	12
Projede Hedeflenen Amaçlar	12
Gereç ve Yöntem	13
Aşama 1: Polietilen glikol-Polikaprolakton (PEG-PCL) Kopolimeri Sentezlenmesi ve Karakterizasyonu.....	13
Aşama 2: Model Protein Immunoglobulin G (IgG) Yüklü Polikaprolakton (PCL) ve Polietilen glikol-Polikaprolakton-Polietilen glikol (PEG-PCL-PEG) Mikrokürelerin Hazırlanması ve Karakterizasyonu	17
Aşama 2.1. Model Protein IgG Yüklü PCL ve PEG-PCL-PEG Mikrokürelerin Hazırlanması ..	17
2.1.1. Model Protein IgG Yüklü PCL Mikrokürelerin Hazırlanması	17
2.1.2. Model Protein IgG Yüklü PEG-PCL-PEG Mikrokürelerin Hazırlanması	21
Aşama 2.2. Model Protein IgG Yüklü PCL ve PEG-PCL-PEG Mikrokürelerin Karakterizasyonu.....	24
2.2.1. Protein Yükleme Verimliliği	24
2.2.2. Yüzey Morfolojisi	24
2.2.3. Boyut Analizi	25
2.2.4. Salım Profili	26
2.2.5. IgG Biyoaktivitesi	27
2.2.6. Protein Kararlılığı	28
2.2.7. Protein Yüklü Mikroküreler için Bozunma (Degredasyon) Çalışması	30
2.2.8. Biyouyumluluk Çalışması.....	31
Aşama 3: Anti-TNF α Yüklü Polikaprolakton (PCL) ve Polietilen glikol-Polikaprolakton-Polietilen glikol (PEG-PCL-PEG) Mikrokürelerin Hazırlanması ve Karakterizasyonu.....	33
Aşama 3.1. Anti-TNF α Yüklü PCL ve PEG-PCL-PEG Mikrokürelerin Hazırlanması	33
3.1.1. Anti-TNF α Yüklü PCL Mikrokürelerin Hazırlanması	33
3.1.2. Anti-TNF α Yüklü PEG-PCL-PEG Mikrokürelerin Hazırlanması	34
Aşama 3.2. Anti-TNF α Yüklü PCL ve PEG-PCL-PEG Mikrokürelerin Karakterizasyonu.....	34
3.2.1. Protein Yükleme Verimliliği	34
3.2.2. Yüzey Morfolojisi	35
3.2.3. Boyut Analizi	35
3.2.4. Salım Profili	35
3.2.4.1. Fosfat Tampon Ortamında Salım Profili	35
3.2.4.2. Hücre Kültür Vasatı Ortamında Salım Profili	37
3.2.4.3. Sinoviyal Sıvı Ortamında Salım Profili.....	37

Aşama 4: Anti-TNF α Yüklü PCL veya PEG-PCL-PEG Mikrokürelerin Romatoid Artritli (RA) Hastalardan Alınmış Sinovisit Hücreleri Üzerindeki Etkilerinin İncelenmesi	38
Aşama 4.1. Romatoid Artritli (RA) Hastaların Total Eklem Replasmanı Operasyonu Sırasında Çıkarılan Sinoviyal Membranlardan Sinovisit Hücrelerinin İzolasyonu	39
Aşama 4.2. Anti-TNF α Yüklü PCL veya PEG-PCL-PEG Mikrokürelerin Romatoid Artritli (RA) Hastalardan Alınmış Sinovisit Hücreler ile Etkileştirilmesi	39
4.2.1. Anti-TNF α Yüklü PCL veya PEG-PCL-PEG Mikrokürelerin Romatoid Artritli (RA) Hastalardan Alınmış Sinovisit Hücreler Üzerindeki Etkilerinin İncelenmesi	43
4.2.1.1. Anti-TNF α Yüklü PCL veya PEG-PCL-PEG Mikroküreler ile Etkileştirilen Sinovisit Hücrelerin Hücre Sayısı ve Canlılığı Özelliklerindeki Değişimlerin İncelenmesi	43
4.2.1.2. Anti-TNF α Yüklü PCL veya PEG-PCL-PEG Mikroküreler ile Etkileştirilen Sinovisit Hücrelerin Proinflamatuvar Sitokin ve Metalloproteaz Düzeylerindeki Değişimlerin	45
4.2.1.3. Anti-TNF α Yüklü PCL veya PEG-PCL-PEG Mikroküreler ile Etkileştirilen Sinovisit Hücrelerin Gen İfadelerindeki Değişimlerin PCR Yöntemi ile İncelenmesi.....	46
İstatistiksel Analizler.....	48
Bulgular ve Tartışma	49
Aşama 1: Polietilen glikol-Polikaprolakton (PEG-PCL) Kopolimeri Sentezlenmesi ve Karakterizasyonu.....	49
Aşama 2: Model Protein Immunoglobulin G (IgG) Yüklü Polikaprolakton (PCL) ve Polietilen glikol-Polikaprolakton-Polietilen glikol (PEG-PCL-PEG) Mikrokürelerin Hazırlanması ve Karakterizasyonu	63
Aşama 2.1. Model Protein IgG Yüklü PCL Mikrokürelerin Hazırlama Koşullarının Optimizasyonu ile İlgili Bulgular	63
Aşama 2.2. Model Protein IgG Yüklü PEG-PCL-PEG Mikrokürelerin Hazırlama Koşullarının Optimizasyonu ile İlgili Bulgular	67
Aşama 2.3. Model Protein IgG Yüklü PCL ve PEG-PCL-PEG Mikrokürelerin Karakterizasyonu 71	
2.3.1. Protein Yükleme Verimliliği	71
2.3.2. Yüzey Morfolojisi	73
2.3.3. Boyut Analizi	75
2.3.4. Salım Profili	78
2.3.5. IgG Biyoaktivitesi	86
2.3.6. Protein Kararlılığı	93
2.3.7. Protein Yüklü Mikroküreler için Bozunma (Degredasyon) Çalışması	99
2.3.8. Biyouyumluluk Çalışması.....	113
Aşama 3: Anti-TNF α Yüklü Polikaprolakton (PCL) ve Polietilen glikol-Polikaprolakton-Polietilen glikol (PEG-PCL-PEG) Mikrokürelerin Hazırlanması ve Karakterizasyonu.....	117
Aşama 3.1. Anti-TNF α Yüklü PCL ve PEG-PCL-PEG Mikrokürelerin Hazırlanması	117
Aşama 3.2. Anti-TNF α Yüklü PCL ve PEG-PCL-PEG Mikrokürelerin Karakterizasyonu.....	118

3.2.1. Protein Yükleme Verimliliği	118
3.2.2. Yüzey Morfolojisi	120
3.2.3. Boyut Analizi	121
3.2.4. Salım Profili	123
3.2.4.1. Fosfat Tampon Ortamında Salım Profili	123
3.2.4.2. Hücre Kültür Vasatı Ortamında Salım Profili	140
3.2.4.3. Sinoviyal Sıvı Ortamında Salım Profili.....	145
Aşama 4. Anti-TNF α Yüklü PCL veya PEG-PCL-PEG Mikrokürelerin Romatoid Artiritli (RA)	
Hastalardan Alınmış Sinovisit Hücreleri Üzerindeki Etkilerinin İncelenmesi	152
Aşama 4.1. Romatoid Artiritli (RA) Hastaların Total Eklem Replasmanı Operasyonu Sırasında	
Çıkarılan Sinoviyal Membranlardan Sinovisit Hücrelerinin İzolasyonu	153
Aşama 4.2. Anti-TNF α Yüklü PCL veya PEG-PCL-PEG Mikrokürelerin Romatoid Artiritli (RA)	
Hastalardan Alınmış Sinovisit Hücreler ile Etkileştirilmesi	155
4.2.1. Anti-TNF α Yüklü PCL veya PEG-PCL-PEG Mikrokürelerin Romatoid Artiritli (RA)	
Hastalardan Alınmış Sinovisit Hücreler Üzerindeki Etkilerinin İncelenmesi	164
4.2.1.1. Anti-TNF α Yüklü PCL veya PEG-PCL-PEG Mikroküreler ile Etkileştirilen Sinovisit	
Hücrelerin Hücre Sayısı ve Canlılığı Özelliklerindeki Değişimlerin İncelenmesi	164
4.2.1.2. Anti-TNF α Yüklü PCL veya PEG-PCL-PEG Mikroküreler ile Etkileştirilen Sinovisit	
Hücrelerin Proinflamatuvar Sitokin ve Metalloproteaz Düzeylerindeki Değişimlerin	
İncelenmesi	166
4.2.1.3. Anti-TNF α Yüklü PCL veya PEG-PCL-PEG Mikroküreler ile Etkileştirilen Sinovisit	
Hücrelerin Gen İfadelerindeki Değişimlerin PCR Yöntemi ile İncelenmesi.....	175
Sonuç ve Öneriler.....	183
Referanslar.....	186
Ekler.....	202
EK 1	202
EK 2	205
EK 3	207
EK 4	212
EK 5	215
EK 6	220
EK 7	225

Tablo Listesi

Tablo 1. Romatizmal hastalıklarda görülen MMP türleri (CLOSE, 2001)	6
Tablo 2. RA'de sitokin ve sitokin inhibitörlerinin kullanıldığı terapi türleri	7
Tablo 3. PEG-PCL veya MPEG-PCL diblok kopolimerlerin sentez denemelerinde değiştirilen parametreler	16
Tablo 4. PEG-PCL-PEG diblok kopolimerlerin sentez denemelerinde değiştirilen parametreler	16
Tablo 5. Optimizasyon için Hazırlanan Mikroküreler	19
Tablo 6. Farklı koşullarla hazırlanmış IgG yüklü PEG-PCL-PEG mikroküreler (A) İç Faz Özellikleri, (B) Dış Faz özellikleri ve (C) Karıştırma hızları	23
Tablo 7. Sentez aşamalarında kullanılan monomer ve oligomerler ile sentezlenen kopolimer, homopolimerin erime sıcaklığı (T_m) ve füzyon entalpileri (ΔH).....	53
Tablo 8. Sentezlenen homopolimer ve kopolimerin sayıca ortalama molekül ağırlıkları (M_n), ağırlıkça ortalama ağırlıkları (M_w) ve polidispersite indeksleri (M_w/M_n).....	61
Tablo 9. Farklı hazırlama yöntemleriyle hazırlanmış IgG yüklü PCL mikrokürelerin protein yükleme verimliliğinin karşılaştırılması	66
Tablo 10. Gama sterilizasyonu yapılmamış ve yapılmış IgG yüklü PCL ve PEG-PCL-PEG mikrokürelerin SEM görüntülerinden elde edilen parçacık boyut ölçüm değerleri.....	78
Tablo 11. Gama sterilizasyonu yapılmış ve yapılmamış PCL ve PEG-PCL-PEG mikrokürelerden farklı zamanlarda ortama çıkan BCA yöntemi ile belirlenen IgG miktarları.....	84
Tablo 12. Gama sterilizasyonu yapılmış ve yapılmamış PCL ve PEG-PCL-PEG mikrokürelerden farklı zamanlarda ortama çıkan ELİZA yöntemi ile belirlenen IgG miktarları.....	90
Tablo 13. Gama sterilizasyonu yapılmış ve yapılmamış PCL ve PEG-PCL-PEG mikrokürelerden farklı zamanlarda ortama çıkan biyoaktif IgG miktarının (ELİZA yöntemiyle belirlenen) toplam salınan protein miktarına (BCA yöntemiyle belirlenen) oranı	92
Tablo 14. Bozunma çalışması öncesinde ve sonrasında gama sterilizasyonu yapılmış veya yapılmamış IgG yüklü PCL mikrokürelerin parçacık boyutları	103
Tablo 15. Bozunma çalışması öncesinde ve sonrasında gama sterilizasyonu yapılmış veya yapılmamış IgG yüklü PCL veya PEG-PCL-PEG mikrokürelerin parçacık boyutları ...	105

Tablo 16. Bozunma çalışması öncesinde ve sonrasında gama sterilizasyonu yapılmış veya yapılmamış IgG yüklü PCL veya PEG-PCL-PEG mikrokürelerin sayıca ortalama moleküler ağırlıkları (Mn) ve ağırlıkça ortalama molekül ağırlıkları (Mw)	111
Tablo 17. Farklı miktarlarda anti-TNF α yüklü PCL ve 25 mg/ml anti-TNF α yüklü PEG-PCL-PEG mikrokürelerin protein yükleme verimliliği.....	120
Tablo 18. Gama sterilizasyonu yapılmış anti-TNF α yüklü PCL ve PEG-PCL-PEG mikrokürelerin SEM görüntülerinden elde edilen parçacık boyut ölçüm değerleri	122
Tablo 19. Farklı zamanlarda gama sterilizasyonu yapılmış PCL mikrokürelerden ortama çıkan IgG ve anti-TNF α BCA yöntemi ile belirlenen miktarları	126
Tablo 20. Farklı zamanlarda gama sterilizasyonu yapılmış PCL mikrokürelerden ortama çıkan biyoaktif IgG ve anti-TNF α ELİZA yöntemi ile belirlenen miktarları	129
Tablo 21. PCL mikrokürelerden ortama çıkan biyoaktif anti-TNF α miktarının(ELIZA yöntemiyle belirlenen) toplam salınan protein miktarına (BCA yöntemiyle belirlenen) oranı	130
Tablo 22. Farklı zamanlarda gama sterilizasyonu yapılmamış PCL mikrokürelerden ortama çıkan anti-TNF α 'in BCA yöntemi ile belirlenen miktarları	132
Tablo 23. Farklı zamanlarda gama sterilizasyonu yapılmamış PCL mikrokürelerden ortama çıkan anti-TNF α 'in ELİZA yöntemi ile belirlenen miktarları	133
Tablo 24. Gama sterilizasyonu yapılmamış farklı miktarlarda anti-TNF α yüklü PCL mikrokürelerden ortama çıkan biyoaktif anti-TNF miktarının (ELIZA yöntemiyle belirlenen) toplam salınan protein miktarına (BCA yöntemiyle belirlenen) oranı	134
Tablo 25. Gama sterilizasyonu yapılmış 25 mg/ml anti-TNF α yüklü PCL ve PEG-PCL-PEG mikrokürelerden farklı zamanlarda ortama çıkan anti-TNF α 'nın BCA yöntemi ile belirlenen miktarları	137
Tablo 26. Gama sterilizasyonu yapılmış 25 mg/ml anti-TNF α yüklü PCL ve PEG-PCL-PEG mikrokürelerden farklı zamanlarda ortama çıkan anti-TNF α 'nın ELİZA yöntemi ile belirlenen miktarları	139
Tablo 27. Gama sterilizasyonu yapılmış 25 mg/ml anti-TNF α yüklü PCL ve PEG-PCL-PEG mikrokürelerden farklı zamanlarda ortama çıkan biyoaktif anti-TNF α miktarının (ELIZA yöntemiyle belirlenen) toplam salınan protein miktarına (BCA yöntemiyle belirlenen) oranı	140
Tablo 28. Farklı zamanlarda gama sterilizasyonu yapılmış farklı miktarlarda anti-TNF α yüklü PCL mikrokürelerden %5 serum içeren hücre kültür vasatı ortamına çıkan anti-TNF α 'in ELİZA yöntemi ile belirlenen miktarları.....	143

Tablo 29. Gama sterilizasyonu yapılmış 25 mg/ml anti-TNF α yüklü PCL ve PEG-PCL-PEG mikrokürelerden %5 serum içeren hücre kültür vasatı ortamına farklı zamanlarda çıkan anti-TNF α 'in ELİZA yöntemi ile belirlenen miktarları.....	145
Tablo 30. Gama sterilizasyonu yapılmış 25 mg/ml anti-TNF α yüklü PCL ve PEG-PCL-PEG mikrokürelerden sağlıklı veya RA'li hastalardan alınan sinoviyal sıvı ortamına 7. ve 14. günde çıkan toplam biyolojik olarak aktif anti-TNF α 'in ELİZA yöntemi ile belirlenen miktarları.....	150
Tablo 31. Gama sterilizasyonu yapılmış 25 mg/ml anti-TNF α yüklü PCL ve PEG-PCL-PEG mikrokürelerin, sağlıklı ve RA'li hastalardan alınan sinoviyal sıvı ortamında yapılan salım çalışmasının 7. gün sonunda ortama salınan toplam biyolojik olarak aktif anti-TNF α miktarları ile PBS ortamında yapılan salım çalışmasının ve %5 serum içeren hücre kültür vasatı ortamında yapılan salım çalışmasının 7. günündeki ortama salınan toplam biyolojik olarak aktif anti-TNF α miktarlarının karşılaştırılması	151
Tablo 32. Çalışmada kullanılan sinoviyal fibroblast hücrelerin izolasyonunun yapıldığı sinoviyal membranların alındığı hastaların genel bilgileri	152
Tablo 33. Çalışmada kullanılan sinoviyal fibroblast hücrelerin izolasyonunun yapıldığı sinoviyal membranların alındığı hastaların genel bilgileri ve hasta kodları	176
Tablo 34. Her hasta için her zaman noktasında TNF- α gen ifadesi değerlerindeki değişimler .	178

Şekil Listesi

Şekil 1. PEG-PCL ve MPEG-PCL kopolimer sentez şeması	14
Şekil 2. PEG-PCL-PEG triblok kopolimer sentez şeması	14
Şekil 3. PEG-PCL-PEG kopolimer sentez aşamasında kullanılan deney düzeneği	15
Şekil 4. Enzime bağlı immünosorban (ELİZA) kiti çalışma basamakları	28
Şekil 5. Sitotoksite deneylerinde PCL veya PEG-PCL-PEG mikrokürelerin ile 3T3 fibroblastik hücreler ile aynı ortamda inkubasyonunda kullanılan deney düzeneği	32
Şekil 6. IgG veya anti-TNF α yüklü PEG-PCL-PEG mikrokürelerin hazırlanmasında kullanılan, sentez parametrelerinden süre değiştirilerek yeniden sentezlenen 1:200 MPEG: ϵ -CL monomer oranına sahip PEG-PCL-PEG triblok kopolimerinin DSC termogramı	51
Şekil 7. IgG veya anti-TNF α yüklü PEG-PCL-PEG mikrokürelerin hazırlanmasında kullanılan, sentez parametrelerinden süre değiştirilerek yeniden sentezlenen 1:200 MPEG: ϵ -CL monomer oranına sahip PEG-PCL-PEG triblok kopolimerinin TGA termogramı	54
Şekil 8. PEG ve PCL homopolimerleri ve IgG veya anti-TNF α yüklü PEG-PCL-PEG mikrokürelerin hazırlanmasında kullanılan, sentez parametrelerinden süre değiştirilerek yeniden sentezlenen 1:200 MPEG: ϵ -CL monomer oranına sahip PEG-PCL-PEG triblok kopolimerinin diferansiyel termogram eğrileri.....	54
Şekil 9. IgG veya anti-TNF α yüklü PEG-PCL-PEG mikrokürelerin hazırlanmasında kullanılan, sentez parametrelerinden süre değiştirilerek yeniden sentezlenen 1:200 MPEG: ϵ -CL monomer oranına sahip PEG-PCL-PEG triblok kopolimerinin FT-IR spektrumu	57
Şekil 10. IgG ve anti-TNF α yüklü PEG-PCL-PEG mikrokürelerin hazırlanmasında kullanılan, sentez parametrelerinden süre değiştirilerek yeniden sentezlenen 1:200 MPEG: ϵ -CL monomer oranına sahip PEG-PCL-PEG triblok kopolimerinin NMR spektrumu	59
Şekil 11. IgG veya anti-TNF α yüklü PEG-PCL-PEG mikrokürelerin hazırlanmasında kullanılan, sentez parametrelerinden süre değiştirilerek yeniden sentezlenen 1:200 MPEG: ϵ -CL monomer oranına sahip PEG-PCL-PEG triblok kopolimerinin GPC kromatogramı	60
Şekil 12. HPLC yöntemi ile IgG kantitatif tayini için oluşturulan kalibrasyon eğrisi.....	64
Şekil 13. Diklorometan ile inkübe edilen IgG çözeltisinin (10 ug/ml) (A) ve 40 ug/ml IgG standart çözeltisinin (B) HPLC kromatogramı	64
Şekil 14. BCA Analizi ile protein yükleme verimliliği bulunması için kullanılan IgG kalibrasyon eğrisi.....	65

Şekil 15. A) 1:100 MPEG: ϵ -CL monomer mol oranına sahip PEG-PCL-PEG kopolimer kullanılarak; B) 1:200 MPEG: ϵ -CL monomer mol oranına sahip PEG-PCL-PEG kopolimeri kullanılarak hazırlanan IgG yüklü PEG-PCL-PEG taşıyıcı sistemlerin SEM görüntüleri	68
Şekil 16. Farklı koşullarla hazırlanmış IgG yüklü PEG-PCL-PEG mikrokürelerin SEM görüntüleri	70
Şekil 17. Hazırlanan IgG yüklü PCL ve PEG-PCL-PEG mikrokürelerin SEM görüntüleri A) Gama sterilizasyonu yapılmamış PCL mikrokürelerin genel görüntüsü; B) Gama sterilizasyonu yapılmamış PEG-PCL-PEG mikrokürelerin genel görüntüsü; C) Gama sterilizasyonu yapılmamış PCL mikrokürenin yüzey görüntüsü; D) Gama sterilizasyonu yapılmış PCL mikrokürenin yüzey görüntüsü; E) Gama sterilizasyonu yapılmamış PEG-PCL-PEG mikrokürelerin yüzey görüntüsü; F) Gama sterilizasyonu yapılmış PEG-PCL-PEG mikrokürelerin yüzey görüntüsü	74
Şekil 18. IgG yüklü PCL mikrokürelerin parçacık boyut dağılımı (A) Gama sterilizasyonu yapılmamış mikroküreler, (B) Gama sterilizasyonu yapılmış mikroküreler.....	76
Şekil 19. Gama sterilizasyonu yapılmamış (A) ve gama sterilizasyonu yapılmış (B) IgG yüklü PCL mikroküreler ve gama sterilizasyonu yapılmamış (C) ve gama sterilizasyonu yapılmış (D) IgG yüklü PEG-PCL-PEG mikrokürelerin parçacık boyut dağılımını gösteren histogram ve %kümülatif mikroküre eğrileri	77
Şekil 20. Salım çalışmaları için HPLC yöntemi ile oluşturulan IgG kalibrasyon eğrisi	79
Şekil 21. Farklı konsantrasyonlarda ve salım çalışması sonrası gözlemlenen HPLC kromatogramları	80
Şekil 22. Salım çalışmaları için BCA analizinde kullanılan IgG kalibrasyon eğrisi.....	81
Şekil 23. IgG yüklü PCL ve PEG-PCL-PEG mikrokürelerin BCA yöntemi ile incelenen 3 aylık salım profilleri Δ gama sterilizasyonu yapılmamış IgG yüklü PCL mikroküreler; o gama sterilizasyonu yapılmış IgG yüklü PCL mikroküreler; \blacktriangle gama sterilizasyonu yapılmamış IgG yüklü PEG-PCL-PEG mikroküreler; \bullet gama sterilizasyonu yapılmış IgG yüklü PEG-PCL-PEG mikroküreler.....	82
Şekil 24. IgG yüklü PEG-PCL-PEG mikrokürelerin BCA yöntemi ile incelenen 3 aylık mg mikroküre başına ortama çıkan μ g ilaç salım profilleri Δ gama sterilizasyonu yapılmamış IgG yüklü PCL mikroküreler; o gama sterilizasyonu yapılmış IgG yüklü PCL mikroküreler; \blacktriangle gama sterilizasyonu yapılmamış IgG yüklü PEG-PCL-PEG mikroküreler; \bullet gama sterilizasyonu yapılmış IgG yüklü PEG-PCL-PEG mikroküreler .	83

Şekil 25. IgG yüklü PCL ve PEG-PCL-PEG mikrokürelerin ELİZA yöntemi ile incelenen 3 aylık salım profilleri Δ gama sterilizasyonu yapılmamış IgG yüklü PCL mikroküreler; o gama sterilizasyonu yapılmış IgG yüklü PCL mikroküreler; ▲ gama sterilizasyonu yapılmamış IgG yüklü PEG-PCL-PEG mikroküreler; ● gama sterilizasyonu yapılmış IgG yüklü PEG-PCL-PEG mikroküreler.....	87
Şekil 26. IgG yüklü PEG-PCL-PEG mikrokürelerin ELİZA yöntemi ile incelenen 3 aylık mg mikroküre başına ortama çıkan µg ilaç salım profilleri Δ gama sterilizasyonu yapılmamış IgG yüklü PCL mikroküreler; o gama sterilizasyonu yapılmış IgG yüklü PCL mikroküreler; ▲ gama sterilizasyonu yapılmamış IgG yüklü PEG-PCL-PEG mikroküreler; ● gama sterilizasyonu yapılmış IgG yüklü PEG-PCL-PEG mikroküreler .	88
Şekil 27. Floresans Spekturumu (o: IgG stadard çözeltisi; Δ: Tween 20 içeren salım ortamı; ▽: protein içeren salım ortamı (6. saat))	94
Şekil 28. 50 µg/ml IgG standard çözeltisinin (▼),1 µg/ml IgG standard çözeltisinin(■),50 ng/ml IgG standard çözeltisinin ve Tween 20 içermeyen salım ortamının (▲) floresans spektrumları.....	95
Şekil 29. Tween 20 içermeyen salım ortamının (▲) ve gama sterilizasyonu yapılmamış mikrokürelerin bekletildiği 6 saatlik salım ortamının (n=3; □, Δ,▽) floresans spektrumları.....	96
Şekil 30. Tween 20 içermeyen salım ortamının (▲) ve gama sterilizasyonu yapılmış mikrokürelerin bekletildiği 6 saatlik salım ortamının (n=3; x, +, o) floresans spektrumları.....	96
Şekil 31. FTIR Spektrumları (A) Boş salım ortamı, (B) Gama sterilizasyonu yapılmamış PCL mikrokürelerin bekletildiği 6 saatlik salım ortamı, (C) Gama sterilizasyonu yapılmış PCL mikrokürelerin bekletildiği 6 saatlik salım ortamı	98
Şekil 32. Mikrokürelere yüklenen proteinin ikincil yapısındaki değişimlerin incelenmesi için gama sterilizasyonu yapılmış ve yapılmamış PCL ve PEG-PCL-PEG mikrokürelere ekstrakte edilen protein örneklerinin, pozitif ve negatif kontrolün amid I bölgesindeki ikincil türev grafikleri	99
Şekil 33. Hazırlanan IgG yüklü PCL mikrokürelerin bozunma çalışması öncesinde ve sonrasında SEM görüntüleri: A) Gama sterilizasyonu yapılmamış mikrokürelerin bozunma çalışması öncesinde yüzey görüntüsü, B) Gama sterilizasyonu yapılmış mikrokürelerin bozunma çalışması öncesinde yüzey görüntüsü, C) Gama sterilizasyonu yapılmamış mikrokürelerin bozunma çalışması sonrasında yüzey görüntüsü, D) Gama	

sterilizasyonu yapılmış mikrokürelerin bozunma çalışması sonrasında yüzey görüntüsü	101
Şekil 34. Hazırlanan IgG yüklü PEG-PCL-PEG mikrokürelerin bozunma çalışması öncesinde ve sonrasında SEM görüntüleri: A) Gama sterilizasyonu yapılmamış mikrokürelerin bozunma çalışması öncesinde yüzey görüntüsü, B) Gama sterilizasyonu yapılmış mikrokürelerin bozunma çalışması öncesinde yüzey görüntüsü, C) Gama sterilizasyonu yapılmamış mikrokürelerin bozunma çalışması sonrasında yüzey görüntüsü, D) Gama sterilizasyonu yapılmış mikrokürelerin bozunma çalışması sonrasında yüzey görüntüsü	102
Şekil 35. IgG yüklü PCL mikrokürelerin yarıçap boyut dağılımı (A) Gama sterilizasyonu yapılmamış mikroküreler, (B) Gama sterilizasyonu yapılmış mikroküreler.....	104
Şekil 36. Hazırlanan IgG yüklü PCL mikrokürelerin bozunma çalışması öncesinde ve sonrasında FTIR spektrumları: Bozunma çalışması öncesinde A) Gama sterilizasyonu yapılmamış, B) Gama sterilizasyonu yapılmış mikrokürelerin FTIR spektrumları, Bozunma çalışması sonrasında C) Gama sterilizasyonu yapılmamış, D) Gama sterilizasyonu yapılmış mikrokürelerin FTIR spektrumları.....	108
Şekil 37. Hazırlanan IgG yüklü PEG-PCL-PEG mikrokürelerin bozunma çalışması öncesinde ve sonrasında FTIR spektrumları: Bozunma çalışması öncesinde A) Gama sterilizasyonu yapılmamış, B) Gama sterilizasyonu yapılmış mikrokürelerin FTIR spektrumları bozunma çalışması sonrasında C) Gama sterilizasyonu yapılmamış, D) Gama sterilizasyonu yapılmış mikrokürelerin FTIR spektrumları	109
Şekil 38. Degradasyon çalışması süresi boyunca salım ortamının pH değişimi ■ mikrokürelerle inkübe edilmemiş fosfat tampon, o gama sterilizasyonu yapılmamış PCL mikrokürelerin bekletildiği fosfat tampon, ● gama sterilizasyonu yapılmış PCL mikrokürelerin bekletildiği fosfat tampon, Δ gama sterilizasyonu yapılmamış PEG-PCL-PEG mikrokürelerin bekletildiği fosfat tampon, ▲ gama sterilizasyonu yapılmış PEG-PCL-PEG mikrokürelerin bekletildiği fosfat tampon.....	113
Şekil 39. Kontrol grubu ve 2 gün boyunca PCL veya PEG-PCL-PEG mikroküreler ile inkübe edilmiş 3T3 hücrelerinin 10x ve 20x büyütmelede faz kontrast mikrografileri	114
Şekil 40. Kontrol grubu ve 2 gün boyunca PCL veya PEG-PCL-PEG mikroküreler ile inkübe edilmiş 3T3 hücrelerinin OD değerleri	115
Şekil 41. DNA miktarlarını belirleyebilmek için belli derişimlerde sığır DNA'sı ile oluşturulan kalibrasyon eğrisi.....	116

Şekil 42. 2 günlük inkübasyon sonunda kontrol grubunda ve PCL veya PEG-PCL-PEG mikroküreler ile inkübe edilmiş grupta 3T3 hücre sayıları.....	116
Şekil 43. Anti-TNF α yüklü PCL ve PEG-PCL-PEG mikrokürelerin protein yükleme verimliliğinin belirlenmesi için BCA analizi ile oluşturulan anti-TNF α kalibrasyon eğrisi	119
Şekil 44. Gama sterilizasyonu yapılmış anti-TNF α yüklü PCL (A) ve PEG-PCL-PEG (B) mikrokürelerin genel SEM görüntüsü	121
Şekil 45. Gama sterilizasyonu yapılmış anti-TNF α yüklü PCL (A) ve PEG-PCL-PEG (B) mikrokürelerin parçacık boyut dağılımını gösteren histogram ve % kümülatif mikroküre eğrileri.....	122
Şekil 46. Salım çalışmaları için BCA analizinde kullanılan anti-TNF α kalibrasyon eğrisi	123
Şekil 47. Gama sterilizasyonu yapılmış anti-TNF α yüklü PCL mikrokürelerin BCA yöntemi ile incelenen 3 aylık salım profili (n=4).....	125
Şekil 48. Gama sterilizasyonu yapılmış anti-TNF α yüklü PCL mikrokürelerin BCA yöntemi ile incelenen 3 aylık mg mikroküre başına ortama çıkan μ g ilaç salım profili (n=4)	125
Şekil 49. Salım çalışmaları için ELİZA analizinde kullanılan anti-TNF α kalibrasyon eğrisi	127
Şekil 50. Gama sterilizasyonu yapılmış anti-TNF α yüklü PCL mikrokürelerin ELİZA yöntemi ile incelenen 3 aylık salım profili (n=3).....	128
Şekil 51. Gama sterilizasyonu yapılmış anti-TNF α yüklü PCL mikrokürelerin ELİZA yöntemi ile incelenen 3 aylık mg mikroküre başına ortama çıkan μ g ilaç salım profili (n=3)	129
Şekil 52. Gama sterilizasyonu yapılmış anti-TNF α yüklü PCL mikrokürelerin ELİZA yöntemi ile incelenen 3 aylık salım profili (n=3).....	131
Şekil 53. Gama sterilizasyonu yapılmış anti-TNF α yüklü PCL mikrokürelerin ELİZA yöntemi ile incelenen 3 aylık salım profili (n=3).....	133
Şekil 54. Gama sterilizasyonu yapılmamış farklı miktarlarda anti-TNF α yüklü PCL mikrokürelerin BCA yöntemi ile incelenen 7 günlük mg mikroküre başına ortama çıkan μ g ilaç salım profili (n=3). ○ 10 mg/ml, ▲ 25 mg/ml ve ● 50 mg/ml anti-TNF α yüklü PCL mikroküreler.....	136
Şekil 55. Gama sterilizasyonu yapılmış 25 mg/ml anti-TNF α yüklü PCL ve PEG-PCL-PEG mikrokürelerin BCA yöntemi ile incelenen 3 aylık mg mikroküre başına ortama çıkan μ g ilaç salım profili (n=4).....	136
Şekil 56. Gama sterilizasyonu yapılmış 25 mg/ml anti-TNF α yüklü PCL ve PEG-PCL-PEG mikrokürelerin ELİZA yöntemi ile incelenen 3 aylık salım profili (n=3) ● 25 mg/ml	

anti-TNF α yüklü PCL ve ▲ 25 mg/ml anti-TNF α yüklü PEG-PCL-PEG mikroküreler	138
Şekil 57. Gama sterilizasyonu yapılmış 25 mg/ml anti-TNF α yüklü PCL ve PEG-PCL-PEG mikrokürelerin ELİZA yöntemi ile incelenen 3 aylık mg mikroküre başına ortama çıkan μ g ilaç salım profili (n=4) ● 25 mg/ml anti-TNF α yüklü PCL ve ▲ 25 mg/ml anti-TNF α yüklü PEG-PCL-PEG mikroküreler	139
Şekil 58. Gama sterilizasyonu yapılmış farklı miktarlarda anti-TNF α yüklü PCL mikrokürelerin % 5 serum içeren hücre kültür vasatı içerisinde ELİZA yöntemi ile incelenen 2 aylık mg mikroküre başına ortama çıkan μ g ilaç salım profili (n=3).○ 10 mg/ml, x 25 mg/ml ve ▲ 50 mg/ml anti-TNF α yüklü PCL mikroküreler	142
Şekil 59. Anti-TNF α yüklü PCL ve PEG-PCL-PEG mikrokürelerin %5 serum içeren hücre kültür vasatı içerisinde ELİZA yöntemi ile incelenen 60 günlük mg mikroküre başına ortama çıkan μ g ilaç salım profili (n=4) ▲ 25 mg/ml anti-TNF α yüklü PCL ve ● 25 mg/ml anti-TNF α yüklü PEG-PCL-PEG mikroküreler.....	144
Şekil 60. Sağlıklı ve RA'li hastalardan alınan sinoviyal sıvılara eklenen belli konsantrasyondaki anti-TNF ilacın zamanla konsantrasyonunda değişim (n=3) ▲ sağlıklı sinoviyal sıvı ortamına eklenen anti-TNF ilaç, ● RA'li hastalardan alınan sinoviyal sıvı ortamına eklenen anti-TNF ilaç.....	146
Şekil 61. Sağlıklı veya RA'li hastalardan alınan sinoviyal sıvı ortamında bekletilen 10 mg/ml anti-TNF α yüklü PCL mikrokürelerin ELİZA yöntemi ile incelenen 2 haftalık mg mikroküre başına ortama çıkan μ g ilaç salım profilleri (n=3) ▲ sağlıklı sinoviyal sıvı ortamında bekletilen anti-TNF α yüklü mikroküreler, ● RA'li hastalardan alınan sinoviyal sıvı ortamında bekletilen anti-TNF α yüklü mikroküreler	147
Şekil 62. Sağlıklı veya RA'li hastalardan alınan sinoviyal sıvı ortamında bekletilen 25 mg/ml anti-TNF α yüklü PCL ve PEG-PCL-PEG mikrokürelerin ELİZA yöntemi ile incelenen 2 haftalık mg mikroküre başına ortama çıkan μ g ilaç salım profilleri (n=3) ▲ sağlıklı sinoviyal sıvı ortamında bekletilen 25 mg/ml anti-TNF α yüklü PCL mikroküreler, Δ RA'li hastalardan alınan sinoviyal sıvı ortamında bekletilen 25 mg/ml anti-TNF α yüklü PCL mikroküreler,● sağlıklı sinoviyal sıvı ortamında bekletilen 25 mg/ml anti-TNF α yüklü PEG-PCL-PEG mikroküreler, o RA'li hastalardan alınan sinoviyal sıvı ortamında bekletilen 25 mg/ml anti-TNF α yüklü PEG-PCL-PEG mikroküreler	148
Şekil 63. RA'li hastaların sinoviyal membranlarından izole edilen sinoviyal fibroblast hücrelerin faz kontrast mikrografileri	154

Şekil 64. RA'li hastaların sinoviyal membranlarından izole edilen sinoviyal fibroblast hücrelerin faz kontrast mikrografileri	155
Şekil 65. Çeşitli pasajlardaki sinoviyal hücrelerde TNF α düzeyleri (n=2).....	156
Şekil 66. Farklı konsantrasyonlarda interlekün-1 β eklenmiş ve eklenmemiş sinoviyal fibroblast hücrelerden ortama salınan TNF- α miktarları.....	157
Şekil 67. Farklı konsantrasyonlarda interlekün-1 β ve IL-1 β ve TNF- α birlikte eklenmiş ve eklenmemiş sinoviyal fibroblast hücrelerden ortama salınan TNF- α miktarları	158
Şekil 68. Yeniden düzenlenen farklı konsantrasyonlarda interlekün-1 β ve IL-1 β ve TNF- α birlikte eklenmiş ve eklenmemiş sinoviyal fibroblast hücrelerden ortama salınan TNF- α miktarları.....	158
Şekil 69. Sürekli 0.1 ve 1 ng/ml interlekün-1 β eklenmiş ve eklenmemiş sinoviyal fibroblast hücrelerden ortama salınan TNF- α miktarları.....	159
Şekil 70. Anti-TNF α yüklü PCL ve PEG-PCL-PEG mikroküreler ile etkileştirilen ve mikrokürelerle etkileştirilmemiş RA sinoviyal fibroblast hücrelerden 10 gün boyunca ortama salınan TNF- α miktarları.....	160
Şekil 71. 5-10. döngülerde amplifiye olan normal ve RA'li hücrelerden elde edilen cDNA örnekleri ile beta aktin gen ifadesi.....	162
Şekil 72. Anti-TNF α yüklü PCL ve PEG-PCL-PEG mikrokürelerin %5 serum içeren hücre kültür vasatı içerisinde ELİZA yöntemi ile incelenen 1 aylık mg mikroküre başına ortama çıkan μ g ilaç salım profili ●25 mg/ml anti-TNF α yüklü PCL ve ▲ 25 mg/ml anti-TNF α yüklü PEG-PCL-PEG mikroküreler	163
Şekil 73. Serbest anti-TNF α ilaç ve 25 mg/ml anti-TNF α yüklü PEG-PCL-PEG ve PCL mikroküreler eklenmiş veya eklenmemiş sinovisit hücrelerin hücre sayıları.....	165
Şekil 74. Serbest anti-TNF α ilaç ve 25 mg/ml anti-TNF α yüklü PEG-PCL-PEG ve PCL mikroküreler ile etkileştirilen sinovisit hücrelerin mikroküre veya serbest ilaç ile etkileştirilmeyen sinovisit hücrelerin canlılığına oranları	166
Şekil 75. 25 mg/ml anti-TNF α yüklü PCL ve PEG-PCL-PEG mikroküreler ve serbest anti-TNF α ile etkileştirilmiş sinoviyal fibroblast hücrelerin negatif kontrol grubuna göre % TNF- α üretimi	167
Şekil 76. Fizyolojik olarak aktif TNF- α miktarlarının belirlenebilmesi için belirli konsantrasyonlarda insan TNF- α standart çözeltilerinin Wehi-164 hücre hattına eklenmesi sonucu MTT canlılık analizinde abzorbans değişimleri ile oluşturulan kalibrasyon eğrisi.....	168

Şekil 77. 25 mg/ml anti-TNF α yüklü PCL ve PEG-PCL-PEG mikroküreler ve serbest anti-TNF α ile etkileştirilmiş sinoviyal fibroblast hücrelerin negatif kontrol grubuna göre fizyolojik olarak aktif %TNF- α üretimi	170
Şekil 78. 25 mg/ml anti-TNF α yüklü PCL ve PEG-PCL-PEG mikroküreler ve serbest anti-TNF α ile etkileştirilmiş sinoviyal fibroblast hücrelerin negatif kontrol grubuna göre %IL-6 üretimi	171
Şekil 79. 25 mg/ml anti-TNF α yüklü PCL ve PEG-PCL-PEG mikroküreler ve serbest anti-TNF α ile etkileştirilmiş sinoviyal fibroblast hücrelerin negatif kontrol grubuna göre %IL-17 üretimi.....	172
Şekil 80. 25 mg/ml anti-TNF α yüklü PCL ve PEG-PCL-PEG mikroküreler ve serbest anti-TNF α ile etkileştirilmiş sinoviyal fibroblast hücrelerin negatif kontrol grubuna göre % IFN- γ üretimi.....	173
Şekil 81. 25 mg/ml anti-TNF α yüklü PCL ve PEG-PCL-PEG mikroküreler ve serbest anti-TNF α ile etkileştirilmiş sinoviyal fibroblast hücrelerin negatif kontrol grubuna göre %MMP-3 üretimi.....	174
Şekil 82. 25 mg/ml anti-TNF α yüklü PCL ve PEG-PCL-PEG mikroküreler ve serbest anti-TNF α ile etkileştirilmiş sinoviyal fibroblast hücrelerin negatif kontrol grubuna göre %MMP-13 üretimi.....	175
Şekil 83. Serbest ilaç ve PCL ve PEG-PCL-PEG mikrokürelerle etkileştirilen RA'li sinoviyal fibroblast hücreler ve tedavi görmemiş RA'li sinoviyal fibroblast hücrelerin (negatif kontrol) zamana bağlı IL-6'ya özgü gen ifadelerindeki değişim	180
Şekil 84. Serbest ilaç ve PCL ve PEG-PCL-PEG mikrokürelerle etkileştirilen RA'li sinoviyal fibroblast hücreler ve tedavi görmemiş RA'li sinoviyal fibroblast hücrelerin (negatif kontrol) zamana bağlı MMP-3'e özgü gen ifadelerindeki değişim.....	181
Şekil 85. Serbest ilaç ve PCL ve PEG-PCL-PEG mikrokürelerle etkileştirilen RA'li sinoviyal fibroblast hücreler ve tedavi görmemiş RA'li sinoviyal fibroblast hücrelerin (negatif kontrol) zamana bağlı MMP-13'e özgü gen ifadelerindeki değişim.....	182

Özet

Romatoid artrit tedavisinde kullanılan anti-TNF α ilaçlar, TNF α ve diğer proinflamatuvar sitokinlerin üretimini belirgin olarak düşürdüğünden, iltihaba karşı tedavide kapsamlı etki göstermektedirler. Fakat, uzun süreli ilaç kullanımı ve toksik etkiler yüzünden anti-TNF α ilaç tedavisinde bazı kısıtlamalarla karşılaşılmaktadır.

Projede, intraartiküler uygulanabilecek ve 3 aydan daha uzun anti-TNF α salımını sağlayacak polikaprolakton (PCL) ve pegile-polikaprolakton (PEG-PCL-PEG) mikroküreler hazırlanmış ve tedavi etkinlikleri in vitro hücre kültür deneyleri ile incelenmiştir. PEG-PCL-PEG kopolimeri PEG-PCL diblok kopolimerlerinden bağlayıcı ajan isoforone diisosiyanat kullanılarak sentezlenmiştir. Immunoglobulin G optimizasyon çalışmalarında kullanılmıştır. Anti-TNF α yüklü PCL ve PEG-PCL-PEG mikrokürelerin 5 μ m boyutunda ve yüksek protein yükleme verimliliğine (sırasıyla % 65.37 \pm 1.80 ve % 75.91 \pm 1.16) sahip olduğu gözlemlenmiştir. Ayrıca, her iki mikroküre grubunda da 3 ay boyunca biyolojik olarak aktif ilaç salımı olmuştur.

Anti-TNF α yüklü mikroküreler ile serbest anti-TNF α ilaç RA'li hasta kaynaklı sinoviyal fibroblast hücreler ile 1 ay inkübe edilerek proinflamatuvar sitokinler (TNF- α , IL-6, IL-17 ve IFN- γ) ve matris metaloproteaz (MMP) 3 ve 13'ün zamana bağlı ortamdaki miktar ve mRNA ekspresyon seviyelerindeki değişimler sırasıyla ELİZA ve PCR yöntemleriyle incelenmiştir. Anti-TNF α yüklü mikrokürelerle etkileştirilen sinoviyal fibroblast hücrelerden salgıladığı sitokin ve MMP miktarları serbest anti-TNF α ile etkileştirilen hücrelerden çıkanlara göre belirgin olarak düşük bulunmuştur. Mikrokürelerle etkileştirilen hücrelerin MMP-3 ve IL-6 gen ifadelerinde 2. haftada, serbest ilaçla etkileştirilen hücrelerin MMP-13 gen ifadesinde 3. haftada en belirgin artış gözlemlenmiştir. Diğer haftalarda belirgin bir değişiklik gözlemlenmemiştir. Elde edilen sonuçlar PCL ve PEG-PCL-PEG kontrollü salım sistemlerinin klinikte uygulama potansiyellerinin yüksek olduğunu göstermektedir.

Anahtar Kelimeler: Romatoid Artrit, anti-TNF α , poli(kaprolakton), pegile polikaprolakton, kontrollü salım sistemleri

Abstract

Anti-TNF α drugs for rheumatoid arthritis treatment show comprehensive effect against inflammation with their ability to reduce significantly TNF α and other proinflammatory cytokine production. However, there are some restrictions for anti-TNF α treatment because of long-term usage and toxic effects.

Intraarticularly injectable polycaprolactone (PCL) and PEGylated polycaprolactone (PEG-PCL-PEG) microspheres releasing anti-TNF α for more than 3 months, were prepared and their effectiveness in treatment were examined with in vitro studies. PEG-PCL-PEG was synthesized from PEG-PCL diblock copolymer using coupling agent. Immunoglobulin G was used for optimization studies. Particle size of anti-TNF α loaded PCL and PEG-PCL-PEG microspheres was 5 μ m and microspheres had high encapsulation efficiencies (65.37 ± 1.80 % and 75.91 ± 1.16 %, respectively). Biologically active drug release during 3 months was observed for each group.

Anti-TNF α loaded microspheres and free anti-TNF α were incubated with synoviocytes isolated from RA patients for 1 month and time-dependent changes in the quantity and mRNA expression levels of the proinflammatory cytokines (TNF- α , IL-6, IL-17 ve IFN- γ) and matrix metalloproteases (MMP) 3 and 13 were investigated by ELISA and PCR methods. Levels of cytokines and MMPs released from synoviocytes incubated with anti-TNF α loaded microspheres were significantly lower than that of released free anti-TNF α group. MMP-3 and IL-6 gene expressions of synoviocytes incubated with microspheres were upregulated at week2 whereas MMP-13 gene of synoviocytes incubated with free drug was upregulated at week3. At other time points, no change was observed. According to the results, potential usage of PCL and PEG-PCL-PEG controlled release systems in clinical applications is high.

Keywords: Romatoid Arthritis, anti-TNF, poly(caprolactone), pegylated poly(captolactone), microsphere, controlled release systems

Giriş

Romatoid Artrit (RA) toplumda sık rastlanılan, deformite bırakabilen, kronik bir hastalıktır. Ayrıca sakatlıktan ölüme varan riskleri de içermektedir. Sistemik ve kronik bir hastalık olan RA, eklemlerde sabah tutukluğu, ağrı, şişlik, deformite ve hareket kısıtlamalarına neden olarak hastaların günlük aktiviteleri hastalıktan etkilemektedir. Bunun yanında, yaşanan fonksiyonel kısıtlamalar ve sonrasındaki kalıcı sakatlıklar iş kayıplarına da neden olmaktadır. Hatta bazı ilaçların kullanımı hayat boyu sürmektedir.

Yapılan araştırmalar sinoviyal membran tarafından salgılanan proinflatuar sitokinlerin romatoid artrit'te (RA) önemli bir role sahip olduklarını göstermiştir. Klinikte kullanılan TNF- α karşıtı (anti-TNF α) özellikteki ilaçlar, TNF α 'nin yanı sıra diğer proinflatuar sitokinlerin üretimini de belirgin olarak düşürdüğünden, iltihaba karşı tedavide kapsamlı etki göstermektedirler. Anti-TNF α tedavisi klinikte iki haftada bir derialtına enjeksiyonuyla yapılmaktadır. Vücuda düzenli ilaç enjeksiyonu, hastada rahatsızlık ve acı oluşturmakta ve sistemik yüksek doz kullanımı da toksik reaksiyonlara neden olmaktadır. Bu yan etkilerden dolayı hastaların yakın takibi de gerekmektedir. Yan etkiler ve yüksek maliyet yüzünden bu tedavinin kullanımında kısıtlamalar yaşanmaktadır. Bu kısıtlamaları gidererek anti-TNF α tedavisinin klinik kullanımdaki potansiyelini arttırmak için son yıllarda ilacın eklem içine enjeksiyonu ile ilgili önlinik çalışmaları mevcuttur. Kullanılan dozlar ilacın etkinlik süresinin arttırılması için derialtına uygulananlar kadar yüksek dozlarda yapılmaktadır. İlk etki yönünden bu uygulamalarda başarı gözlenmişse de enjeksiyon aralıklarının uzatılmasında çok fazla başarılı olunamamış ve bazı durumlarda enjeksiyon bölgelerinde reaksiyonlar görülmüştür.

Projede, biyoyumlu, biyobozunur ve bozunma ürünleri asidik bir çevre oluşturmeyen polikaprolakton ve polietilen glikol- polikaprolakton kopolimeri ile eklem içine tek seferde enjekte edilebilecek, dokuda uzun süreli olarak etkin dozlarda anti-TNF α 'in salımını sağlayacak mikroküreler hazırlanması ve bunların enflamasyonu uzun süreli baskılama etkisinin RA'lı hastalardan alınan sinovisit hücre kültürü üzerinde in vitro olarak gösterilmesi amaçlanmıştır. Literatürde protein bazlı ilaç salım sistemleri üzerine birçok çalışma vardır. Ancak anti-TNF α ilaç salım sistemleri ile ilgili bir çalışma yoktur.

Geliştirilen PCL ve PEG-PCL-PEG mikroküre sistemlerle yüksek dozlarda iki haftada bir tekrarlanması gereken derialtı enjeksiyonlar veya son yıllarda önlinik çalışmaları gerçekleştirilen ve 1 aydan fazla etkinliği olmadığı gözlenen anti-TNF α 'in intraartiküler enjeksiyonlarda karşılaşılan biyolojik aktivitenin korunamama, yüksek doza bağlı akut

reaksiyonların ve enflamasyon görülme sıklığının artması gibi komplikasyonlarının azaltılması, enjeksiyon aralıklarının uzatılması ve uzun süre lokal olarak anti-TNF α sağlanması ile tedavi etkinliğinin artırılması erişilmesi istenilen hedeflerdir.

Elde edilen sonuçlar, geliştirilen anti-TNF α yüklü PCL ve PEG-PCL-PEG mikroküre salım sistemlerinin RA tedavisinde olumlu sonuçlar verebilecek yeni bir tedavi yaklaşımı olduğunu göstermiştir. Projede geliştirilen sistemlerdeki bütün malzemelerin klinikte farklı amaçlar için kullanılması ve biyouyumlu olması klinik uygulamalar için bir ürüne dönüştürülebilmesini kolaylaştırmaktadır. Ayrıca, bu araştırma ile anti-TNF α yüklü polimerik mikroküre sistemlerinin RA tedavisinde kullanılabilirliği yazılı kaynakla ilk kez belgelenmiştir. Ancak bu kontrollü ilaç salım sistemlerinin uzun süreçteki etkileri, uygulama sıklığı v.b. sonuçlarının in vivo değerlendirilmesi gerekli görülmektedir.

Sonuç olarak, anti-TNF α yüklü mikrokürelerle romatoid artirit tedavisi için oluşturulacak yeni yaklaşım ile hasta hayat kalitesi yükselecek, hastahane ve ilaç maliyetleri düşürülerek ulusal ekonomiye büyük katkısı olacaktır.

Genel Bilgiler

Vücuda fiziksel olarak destek sunan, iç organların korunmasını sağlayan iskelet sistemini oluşturan kemikler uc uca ya da yan yana gelerek, eklem denilen yapılarla birbirlerine bağlanırlar. Vücut eklemlerinin büyük kısmı hareketli eklemlerdir. Bu eklemlerde, eklemi oluşturan kemiklerin kemik uçları koruyucu ve sürtünmeyi azaltıcı görev üstlenen kıkırdak doku ile kaplıdır ve kemiklerin uçları bağ dokusundan meydana gelmiş ortak bir kapsül ile çevrilidir. Eklem kapsülünün iç yüzeyi ince bir zar (sinoviyal zar) ile örtülüdür ve sinoviyal dokuda bulunan hücreler eklem kapsülünü dolduran sinoviyal sıvıyı üretilirler. Sinoviyal sıvı, lenfosit, monositler ve nötrofiller gibi çeşitli hücrelerin yanında proteinler, elektrolitler, glikoz ve hiyaloranik asit içeren oldukça viskoz bir sıvıdır (LIPOWITZ, 1985). Sağlıklı yetişkinlerin sinoviyal sıvısında, 2.5 – 4 mg/ml konsantrasyon aralığında $4 - 5 \times 10^6$ Da moleküler ağırlığına sahip hiyaloranik asit bulunmaktadır. Bu polisakkarit sinoviyal sıvının viskoelastik davranışında, şok emiliminde ve eklem kayganlığının sağlanmasında önemli bir rol oynamaktadır (RINAUDO, 2009). Eklem bağları (tendonlar ve ligamentler) eklemleri saran ve kemikleri birbirine bağlayan yapılardır. Bu bağlar belirli yönlere harekete imkan sağlayarak, eklem bütünlüğünün korunmasını sağlar.

Eklem hasarları bir travma sonucunda (spor aktivitelerinde yaşanan hasarlar, günlük hayatta karşılaşılan ters hareketler, düşmeler, çarpmalar ve kazalar gibi), ya da yaşa bağlı veya dejeneratif bir hastalık sonucunda oluşabilir. Vücudun hareket etmesini sağlayan kas, kemik ve eklemler ile bu yapıları birleştiren bağlarda ağrı ve hareket kısıtlılığına bazen de şişlik ve şekil bozukluğuna neden olan hastalıklar genel olarak romatizmal hastalıklar olarak bilinir. Romatizmal hastalıkların %55-60'ı sellülit, bursit, fasit, miyozit, tendinit, tenosinovit, entesis, sinir sıkışmasına bağlı tuzak nöropatileri gibi yumuşak dokud kaynaklı romatizmal problemlerden oluşurken %30-38'ini osteoartrit gibi dejeneratif eklem hastalıkları ve yaklaşık %10 kadarını da romatoid artrit (RA) gibi inflamatuvar kaynaklı hastalıklar oluşturmaktadır (DÜZGÜN, 2002).

Romatoid artrit (RA), öncelikle eklemleri etkileyen ve daha sonra eklem kıkırdağının yıkımına yol açarak sakatlıktan ölüme varan riskleri ortaya çıkaran bir eklem hastalığıdır. Kronik, otoimmün ve sistemik bir hastalık olan RA, sinoviyal hücre çoğalması ve inflamasyonunun eklemde yıkıma neden olması ile karakterize edilmektedir (SUZUKI, 2000, HART, 2004, JEONG, 2004, SOMMER, 2005). Hastalık nedenleri tam olarak bilinmemekle birlikte, oluşumunda genetik yatkınlık, çevresel faktörler veya bulaşıcı ajanların rol oynadıkları düşünülmektedir (SOMMER, 2005). Toplumun %1'ini etkileyen ve kadınlarda erkeklere oranla 2.5 kat daha sıklıkla gözlemlenen RA hastalığının en belirgin belirtileri eklemlerde iltihaplanma, şişme, harekette zorluk ve ağrıdır (LEE D.M., 2001). Ayrıca, RA hastalığı vücuttaki deri, kan damarları, kalp,

akciğer ve kaslar gibi birçok eklem dışı dokuyu da etkilemektedir. RA hastalığının gelişmesine neden olan patolojik aşamaların tam olarak henüz anlaşılammış olmasına rağmen, hastalığın patofizyolojisinin merkezinde hücreseel hiperplazi, belirgin anjiogenez, inflamatuvar lökositlerin sinoviyal dokuya göçü ile hücre yüzeyi adezyon molekülleri, proteinazlar, proteinaz inhibitörleri ve sitokinlerin miktarlarında değişikliklerle karakterize edilen iltihaplı sinoviyum bulunmaktadır. Hastalığın ilk haftalarında, doku ödemi ve fibrin depolanması eklemde şişmesine ve ağrmasına neden olmaktadır. Sağlıklı eklemlerdeki sinoviyal doku iki veya üç tabaka hücreden oluşan ince bir zara sahipken RA'li sinoviyal doku dokudaki fibroblast hücrelerin hızlı çoğalması ve periferal kan kökenli mononükleer hücrelerin (PBMC) sızması sonucu kalınlaşmaktadır (BOOTS, 1994). Bölgesel saldırgan sinoviyal doku (pannus) oluşumu RA hastalığının belirgin karakteristik özelliğidir ve eklem aşınmasından sorumludur (LEE D.M., 2001).

RA hastalığının gelişiminde, özellikle makrofajlar, T-lenfositler gibi farklı inflamatuvar hücreler ve eklem dokusunda bulunan hücreler arasındaki iletişim önemli bir rol oynamaktadır ve bu hücrelerin birbirleriyle iletişimi pro-inflamatuvar, anti-inflamatuvar veya immünoregülatör etki gösteren protein (sitokin) ağları üzerinden sağlanmaktadır (KAY, 2004). Normal fizyolojide bu sitokinler arasında bir denge vardır. Fakat, RA durumunda bu denge pro-inflamatuvar etki gösteren sitokinlerin lehine kayar. Hastalığın gelişimi sırasında romatoid sinoviyal sıvıda bulunan proinflamatuvar sitokinler kırık hücrelerinin (kondrositler) metalloproteinaz (MMP) salgılamasını aktive eder ve hücreyi çevreleyen matriksin yıkımının artmasına neden olurlar (JORGENSEN, 2001). Başta interlökin-1 (IL-1) ve tümör nekrosis faktör (TNF- α) olmak üzere interlökin-6 (IL-6), interlökin-8 (IL-8), interlökin-15 (IL-15), interlökin-17 (IL-17), interlökin-18 (IL-18), granülosit-makrofaj-koloni stimülan faktör (GM-CSF), makrofaj-koloni stimülan faktör (M-CSF) ve lökosit inhibitör faktör (LIF) RA gelişiminde rol oynayan başlıca proinflamatuvar sitokinlerdir (FELDMANN, 1996, AREND, 2001, SMITH, 2001, BRENNAN, 2007, BRENNAN, 2008). TNF- α ve IL-1 RA patogeneğinde öncelikli rol oynamaktadır. Hastalığı aktif dönemde olan RA hastaların bu iki sitokinin serum ve sinoviyal sıvı konsantrasyonları yüksek çıkmaktadır (SAXNE, 1988, CHIKANZA, 1995). (Ayrıca, TNF- α ve IL-1 sinoviyal fibroblast, osteoklast ve kondrosit gibi mezankimal hücreleri uyarak doku-tahrip edici matriks metalloproteinazlar (MMP) (SHINGU, 1993) ve prostaglandin E üretimlerini harekete geçirmektedir (MAINI, 2000). Prostaglandinler, inflamasyon sürecinde önemli bir role sahiptir ve üretimlerinin yavaşlatılması iltihaplanmayı azaltma etkisi olabilmektedir. Hücre dışı matriksin yeniden yapımı ve yıkımında rol oynayan metalloproteinazlar, RA'de tip B sinovisitler tarafından yüksek düzeylerde üretilirler. Matriks metalloproteinazların aktivitesi metalloproteinazların doku inhibitörlerince (TIMPs), serin

proteinaz inhibitörlerce (SERPINS) ve α 2-makroglobulinlerce düzenlenir (LEE D.M., 2001). MMP ve TIMP düzeyleri arasındaki dengenin bozularak yüksek düzeyde MMP salgılanması eklem dokusunun yıkımına neden olmaktadır (CLOSE, 2001). Romatizmal hastalıklarda görülen MMP türleri ve bu MMPlerin yıkımına etki ettikleri bileşenler Tablo1'de verilmiştir. RA sinoviyal sıvısı OA sinoviyal sıvısı ile karşılaştırıldığında yüksek MMP-1, MMP-2, MMP-3, MMP-7, MMP-8, MMP-9 ve MMP-13 düzeyleri gözlemlenmiştir (PAKOZDI, 2006).

RA tedavisinde hedeflenen başlıca amaçlar acının hafifletilmesi, enflamasyonun kontrolü ve eklem yıkımını engellemesidir (DOAN, 2005). Prostaglandinlerin vücutta üretimini yavaşlatmak için iltihaplanmayı azaltıcı etkiye sahip inflamatuvar karşıtı ilaçlar oldukça yaygın kullanılmaktadır (HART, 2004). Bu ilaçların çoğu, az dozajda, analjezik ve ağrı kesici özelliğe sahiptir. Tedavi amacıyla genellikle uzun süreli ve yüksek dozda kullanımları gerekmektedir. Steroid içermeyen (non steroidal) anti-inflamatuvar ilaçlar (NSAIDs) RA sonucu görülen şişme, kronik ağrı ve iltihaplanmaya karşı kullanılmaktadırlar (SIGURDARDOTTIR, 2008). RA hastalığının ilk evrelerinde kullanılan aspirin ve NSAIDs hastalığın gelişimini etkilememektedir. Bu yüzden, bir veya daha fazla hastalık değiştirici anti-romatoid ilaç (DMARDs) ile birlikte kullanılmalıdır (DOAN, 2005). Hastalık değiştirici anti-romatoid ilaç kullanımı ve biyolojik tedavi yöntemleri de RA tedavisinde kullanılmaktadır (WEAVER, 2004, MORELAND, 2006). Kas içi veya oral altın tuzları, D-penicillamine, sıtmaya karşı ajanlar, sulfalazin, hidrosiklorokuin, leflumonid ve methotrexate (MTX) başlıca kullanılan hastalık değiştirici anti-romatoid ilaçlardır (FAN, 2007). Uzun süreli tedavide, hastalık değiştirici anti-romatoid ilaçların ilk etkisi uzun sürede gözlemlenir ve bu ilaçlar toksik yan etkiler gösterebilmektedir (LEE D.M., 2001). Günümüzde, kırıkda yıkımını engelleyen veya fonksiyonel bütünlüğün yeniden oluşmasını sağlayan onaylı ve biyolojik kökenli hastalık değiştirici romatizma ilacı bulunmamaktadır (ABRAMSON, 2006).

RA hastalığının gelişimi sırasında, sinoviyal membran tarafından salgılanan proinflamatuvar sitokinlerin önemli bir role sahip olduğunun gösterilmesiyle bu sitokinleri hedefleme yaklaşımlarını içeren tedavi yöntemleri geliştirilmiştir (FELDMANN, 1996, MORELAND, 1997, MAINI, 2000, WEAVER, 2004, MORELAND, 2006). Sitokinleri hedef alan tedavilerin çoğunda, proinflamatuvar sitokinlerin bloke edilmesi veya B lenfosit, T hücreleri ve antijen özelliği gösteren (APC) hücreleri gibi çeşitli bağışıklık sistemi hücrelerine etki ederek bağışıklık sistem reaksiyonlarını değiştirmek hedeflenmiştir (FAN, 2007). RA'de sitokin ve sitokin inhibitörlerini kullanan biyoterapi türlerinden bazıları ve hedef aldıkları sitokinler Tablo 2'de verilmiştir. Biyolojikleri hedef alan tedavi yöntemlerinde TNF α ve IL-1 sitokinlerini hedef

alan ilaçların geliştirilmesine ağırlık verilmektedir. Klinikte, IL-1 reseptör antagonist anakinra, çözünür TNF reseptör etanersept ve anti-TNF monoklonal antikorlar infliximab ve adalimumab gibi onaylı ilaçlar RA tedavisinde kullanılmaktadır.

Tablo 1. Romatizmal hastalıklarda görülen MMP türleri (CLOSE, 2001)

	Substrat	Romatizmal Hastalık
Kollajenazlar:		
MMP-1	Kollajen I, II, III, VII, X	RA fibroblastlar ve aşınma bölgeleri
MMP-8	Kollajen I, II, III	RA fibroblastlar/OA kıkırdak
MMP-13	Kollajen I, II, III	RA sinoviyum/kıkırdak
Stromelisinler:		
MMP-3	Proteoglikan, pro-MMP-1, 8, 9	RA, OA sera ve sinoviyal sıvı
MMP-10	Agrekan, jelatin	
MMP-11	Düşük stromelisin aktivitesi	
MMP-7	Agrekan, jelatin, fibronektin	OA kıkırdak
Gelatinazlar:		
MMP-2	Jelatin, minor kollajenler, elastin	Sinoviyum, femoral baş lezyonları
MMP-9	Jelatin, minor kollajenler	RA serasında ve sinoviyal sıvı

Tablo 2. RA'de sitokin ve sitokin inhibitörlerinin kullanıldığı terapi türleri

Hedef	Terapi
TNF- α	Monoklonal anti-TNF α (Infliximab (Remicade TM), Adalimumab (Humira TM)) İnsana uygun (humanized) CDP571 İnsana uygun (humanized) D2E7 TNFR-füzyon protein çözeltisi sTNFRp55:IgG (Ro452081, Lenercept TM) TNFRp75 Fc füzyon protein (Etanercept (Enbrel TM)) rhuTNF proteinine bağlanan pegile dimer (TNFbp)
IL-1	IL1-ra (Anakinra TM) IL1-R tip I
IL-10	rhuIL10 (TENOVIL@)
IL-6	Monoklonal anti-IL6 (BE8)

TNF- α ve IL-1 benzer biyolojik etkiye sahip olmasına rağmen, TNF- α sistemik ve lokal inflamasyona sebep olurken IL-1 kıkırdak ve kemik hasarında rol almaktadır (CHOY, 2001). RA hastalarında TNF- α üretimi iltihaplı sinoviyal doku ve kıkırdak-pannus bağlantı noktasındaki fibroblastlar ve monosit-makrofaj kökenli hücreler tarafından salgılanmaktadır (JARVIS, 1999). TNF- α 'nın bloke edilmesi hastalık sırasında üretilen IL-1, IL-6, IL-8 ve GM-CSF gibi diğer proinflamatuvar sitokinlerin de üretimini belirgin olarak düşürmektedir (CHOY, 2001). Bu yüzden iltihaba karşı TNF karşıtı (anti-TNF) tedavi diğer sitokinlere karşı olan tedavilerden daha kapsamlı etki göstermektedir. 2000 yılından itibaren TNF- α karşıtı ilaçlar RA klinik bulgu ve semptomların etkili bir şekilde baskılanmasında, eklem hasarlarının önlenerek sakatlığın oluşmasının engellenmesinde ve bunlara bağlı olarak yaşam kalitesinin artırılmasında standart

bir tedavi şekli olarak kullanılmaktadır. Yapılan klinik deneyler sonucunda NSAIDs ve DMARDs tedavilerinde başarı sağlanamayan hastalarda bu tür ilaç tedavisi yüksek etkinlik göstermiştir (FAN, 2007).

RA tedavisinde sıklıkla kullanılan başlıca 3 TNF- α karşıtı ilaç (infliximab, etanercept ve adalimumab), TNF- α 'ya bağlanıp bu sitokinin hedef hücrenin reseptörüne bağlanmasını engelleyerek RA sırasında ağrıya, enflamasyona, kemik ve kıkırdak yıkımına neden olan basamakları inhibe etmektedir (DOAN, 2005). Bu 3 ilaç içerik, uygulama yöntemi ve yan etki profilleri bakımından birbirlerinden farklıdır. Etanercept romatoid artirit, juvenil idiyopatik artirit (oligo- ve poliartiküler dahil), ankilozan spondilit (juvenil formu dahil) hastaların tedavisinde kullanılmaktadır. Bu ilacın, sadece subkütan enjeksiyonu (iki haftada bir tekrarlanan) klinikte onaylanmıştır (Enbrel® (etanercept) US Prescribing Information). Ancak subkutan enjeksiyon yapılan infüzyon anti-TNF ilaç formulasyonları bazı lokal enflamasyonlarda etkin olamamakta ve hastaların hayat kalitelerinin düşmesine neden olabilmektedir. Bu hastalara ve daha az eklemi tutulmuş oligoartiküler JIA'li hastalara intraartiküler steroid uygulamaları gerçekleştirilmektedir. Belirli eklemlerde oluşan enflamasyonların bastırılması için lokal tedavi yaklaşımına ihtiyaç duyulmaktadır. Ancak, ilacın intraartiküler olarak romatoid artirit hastalarına uygulanması ile ilgili olarak küçük ölçekte çifte-kapalı (double-blind) çalışmalar, açık-etiket (open-label) ve klinik raporlar (case reports) olarak gerçekleştirilmiş ve yayınlanmıştır. Mevcut çalışmalardan elde edilen sonuçlar az sayıda hasta gruplarında gerçekleştirilmiştir (BLIDDAL, 2006a,BLIDDAL, 2006b,BOESEN, 2008,ROUX, 2008). Etanercept subkütan enjeksiyon sonrasında yavaşça absorbe edilir ve yetişkinlerde mutlak biyoyararlılığı yaklaşık olarak %58'dir (LEBSACK, 1997). Yetişkinlerde, etanercept dağılımı göreceli olarak küçük hacime sahiptir (12 ± 6 L) ve enjeksiyondan 50 saat sonra en yüksek serum konsantrasyonuna ulaşır (KORTH-BRADLEY, 2000). Vücuttan ortalama olarak 115 saatte temizlenir (YIM, 2005). Etanercept, Juvenil İdyopatik Artritli (JIA) çocuk hastalarda (4-17 yaş) haftada iki kez 0.4 mg/kg subkutan olacak şekilde uygulanmaktadır (YIM, 2005,LOVELL, 2006). RA'lı yetişkinlerde ise doz miktarı haftada bir kez 0.8 mg/kg şeklinde uygulanmaktadır (KEYSTONE, 2004).

Ayrıca RA'lı hastalar üzerinde yapılan 4 haftalık bir çalışmada, farklı eklem bölgelerine intra-artikular olarak uygulanan 25 mg'lık haftada tek doz miktarının kullanılabilirliği gösterilmiştir (BLIDDAL, 2006a). Bazı çalışmalarda intraartiküler enjeksiyonlarda 1 aydan 2 aya kadar hastanın klinik bulgularında (eklem sertliği ve şişliğinin azalması, hareket serbestliği gibi) iyileşme gözlenirken (BLIDDAL, 2006a,BLIDDAL, 2006b,ROUX, 2008), bazı çalışmalarda plasebo grubundan (eklemine tampon enjekte edilmiş hastalarda) farklılık gözlenmemiştir

(BOESEN, 2008).

Birçok protein bazlı ilaçta olduğu gibi TNF karşıtı ilaçlarında (anti-TNF) in vivo ortamda yüksek çözünürlükleri bulunması, özellikle RA gibi kronik hastalıklarda düzenli olarak ve yüksek dozlarda uygulanmasını gerektirmektedir. Vücuda düzenli ilaç enjeksiyonu, hastada rahatsızlık oluşturmakta ve sistemik yüksek doz kullanımı da toksik reaksiyonlara neden olmaktadır. Hastaların %40'ından fazlasında, yan etki olarak enjeksiyon bölgesi reaksiyonları gözlemlenmiştir (LEE D.M., 2001). Ayrıca, ilacın sık uygulanması enjeksiyon bölgesinde habis tümör oluşumu, çeşitli nörolojik rahatsızlıklar, aşırı duyarlılık ve immünolojik cevaplara neden olmaktadır (DOAN, 2005). Ayrıca, bu tür ilaçların üretilmesi de oldukça maliyetlidir. Yüksek doz ve düzenli enjeksiyon bu tedavinin masraflarını arttırmaktadır. Bu sebeple, TNF-karşıtı ilaç tedavisinin klinik kullanımdaki potansiyelini arttırmak ve yüksek doz kullanımından kaynaklanan yan etkilerinin azaltmak için çeşitli salım sistemlerinin geliştirme ve optimizasyon çalışmalarına gerek duyulmaktadır.

Farklı sentetik ve doğal polimerler, ilacın yan etkilerinin giderilmesi, hedefe etkin iletimi ve tedavi etkisinin artırılması için ilaç salım sistemi araştırmalarında kullanılmaktadır (KREUTER, 1994). Biyobozunur polimerik biyomalzemeler ilaç salım sistemi uygulamalarında önemli bir rol oynamaktadır. Bu malzemeler; devamlı ve etkin konsantrasyonda ilaç salımını, sağladıkları gibi ilacın vücut ortamında daha uzun süre kalmasını da sağlamaktadır (HUBBELL, 1998). Alifatik poliesterler grubundan biyobozunur bir polimer olan poli ϵ -kaprolakton (PCL), kontrollü ilaç salım sistemleri ve diğer biyomalzeme araştırmalarında da sıklıkla kullanılan bir malzemedir (WILLIAMS, 2005,OH, 2007,SAVARINO, 2007,IZQUIERDO, 2008,LUCIANI, 2008,KARATAS, 2009,ERDEMLI, 2010). Ayrıca, PCL ABD İlaç ve Gıda Uygulama Yönetimi (FDA) tarafından klinikte uygulanması onaylanmış bir biyomalzemedir (PITT, 1990,RAI, 2004,TADDEI, 2005,SHAO, 2006,OH, 2007).

PCL homopolimerinin yinelenebilir grubu, beş apolar metilen grubu ve bir daha polar ester grubundan oluşmaktadır. Yüksek miktarda olefinik yapı içerdiği için mekanik özellikleri poliolenlere benzerken, hidrolik olarak kararsız olan alifatik-ester bağı polimerin biyobozunur olmasını sağlamaktadır. Ester bağlarının kütleli (bulk) hidrolizi ile PCL bozunmaktadır ve bozunma/erozyon düzeyleri ve hızları kimyasal ve kristal yapıya, molekül ağırlığına ve diğer faktörlere bağlı olarak değişebilmektedir (LIN M., 2008). Olefinik yapı içermesi ve kararsız alifatik-ester bağı özelliklerinin birleşimi, PCL'na diğer polimerlerle kolay karıştırılabilir (blending) özelliği de vermektedir (DOMB, 1997). Yarı kristal bir yapıya sahip olan PCL'in camsı

geçiş sıcaklığı (Tg) -60 °C'dir. Tg'sinin düşük olması nedeniyle mekanik özelliklerinin çok kuvvetli olmaması mekanik dayanıklılık gerektiren biyomalzemelerde (kemik implantları gibi) kullanımı kısıtlamaktadır. Ancak bu özelliklerinin geliştirilmesi için farklı polimerlerle karışım veya kopolimerizasyon yapıldığı görülmektedir (PITT, 1990, MANO, 2004, SINHA, 2004). Oldukça kristal yapılı ve hidrofobik olmasından dolayı in vivo ortamda bozunma süresi yaklaşık iki yıldır (PRABHAKAR, 2005). PCL'nun biyobozunurluğu ve biyoyumluluğu da çeşitli hidrofilik polimerlerle kopolimerizasyon veya karışım yapıldığında geliştirilebilmektedir (ROSA, 2005, PRABU, 2008, SHEIKH, 2009).

Birçok ilaca karşı yüksek geçirgenliği, üstün biyoyumluluğu ve biyolojik olarak emildikten sonra vücuttan tamamen atılabilmesi nedeniyle PCL kontrollü ilaç taşıma sistemleri için oldukça uygun bir malzemedir (WOODRUFF, 2010). PCL'nun diğer polimerlerle kolay karıştırılabilme özelliği de bu polimerin bozunma kinetiğine etki ederek istenen salım profilinin ayarlanabilmesini kolaylaştırmaktadır (SINHA, 2004). Tg'sinin düşük olması nedeniyle vücut sıcaklığında yüksek moleküler akışkanlık gösteren bir yapıda olan PCL (TAY, 2007), bu özelliği sayesinde düşük moleküler ağırlıktaki ilaçlara karşı yüksek geçirgenlik göstermektedir (CIARDELLI, 2005). Polilaktikasit (PLA) ve poliglukolikasit (PLGA) gibi polimerlere oranla daha uzun süreli bozunma özelliği göstermesi nedeniyle, PCL ile hazırlanan ilaç salım sistemleri ilaç salımı sırasında asidik bir ortam oluşmasını engellemektedir (RAMESH, 2002). Bu özellikleri yüzünden, son yıllarda ilaç yüklü PLC mikroküreler ile ilgili birçok çalışma yapılmaktadır (GIBAUD, 2004, KIM B.K., 2005, LUCIANI, 2008, ZHANG, 2009). Ayrıca, PCL peptit ve proteinler için kontrollü salım sistemlerinin geliştirilmesinde de kullanılmaktadır (LIN, 2001, SINHA, 2004, COCCOLI, 2008). In vivo ortamda PCL'nun bozunma süresinin uzun olması çok yönlü ilaç salım matriks malzemesi olarak kullanım alanını sınırlamaktadır. Polietilen glikol (PEG), methoksi polietilenglikol (MPEG) veya polietilen oksit-polipropilen oksit-polietilenoksit (PEOPPOPEO) gibi hidrofilik segmentlerin PCL zinciri ile etkileştirilmesi sonucu hidrofobik özelliği değiştirilerek PCL'nun biyobozunurluğu geliştirilebilmektedir (HA, 1999, DAS, 2000, KIM M.S., 2006).

Polietilen glikol (PEG), biyomedikal alanda sıklıkla kullanılan FDA onaylı biyoyumlu bir polimerdir (ALEXIS, 2008). Sudaki çözünürlüğü yüksek olan PEG herhangi bir toksik, immunojenik veya antijenik etkiye neden olmamaktadır (VERONESE, 2005). Ayrıca, PEG serum proteinlerin adsorpsiyonu (adsorption) engelleyerek kanla temas eden malzemelerin biyoyumluluğunu arttırmaktadır (KIM M.S., 2006). Bununla birlikte, PEG hidrofobik yapıların çözünürlüğünü de arttırılmaktadır (KONTOYIANNI, 2008). Son yıllarda, bir veya daha çok PEG

zincirinin ilaç veya ilaç taşıyıcı sisteme bağlanmasıyla modifikasyon (pegilasyon) ilaç salımı çalışmalarında kullanılmaktadır (HOFFMAN, 2008). Literatürde yapılan bir çalışmada, farklı kompozisyonlarda hazırlanmış Paclitaxel yüklü PLA-PEG-PLA mikropartiküllerinden ilaç salımının hidrofilik PEG bloklarının uzunluğunun artması ile hızlandığı gözlemlenmiştir (RUAN, 2003). Yüksek hidrofiliğe, zincir esnekliğine, elektriksel nötrlüğüne sahip olması ve fonksiyonel gruplarının olmaması nedeniyle, *in vivo* ortamda PEG biyolojik bileşenlerle etkileşmeyi engellemekte (GREF, 1995) ve yapının biyolojik ortamda istenmeyen immunojenik ataklardan korunmasını ve kan dolaşımında uzun ömürlü olmasını sağlamaktadır (KONTOYIANNI, 2008). Sistemik ilaç uygulamalarında, PEG-ilaç konjugatların veya PEG zincirleri ile fonksiyonize edilmiş nanopartiküller oluşturularak kanda uzun süreli kararlılığa sahip ilaç salım sistemleri geliştirilmektedir (GREF, 1994,MOGHIMI, 2001). PEG ile kaplanmış nanokürelerin kanda uzun süre (long-circulating) dolaşan diğer ilaç sistemlerine göre daha uzun kararlılığa sahip olduğu ve hapsedilen ilacın kontrollü olarak saldığı gösterilmiştir (QUELLEC, 1998). Known ve arkadaşlarının yaptığı bir çalışmada, PEG polilaktit-ko-glikolik asit (PLGA) kopolimerinde PEG bloklarının moleküler ağırlığının artırılmasıyla PEG ile kaplanmış esterojen yüklü nano-PLGA partikülata kaplanmamış partikülata oranla kan dolaşım süreleri arttırılmıştır (KWON, 2001). Literatüre bakıldığında; PEG ile kaplanmış yüzeylere sahip mikroparçacıklar, püskürtme kurutma (spray drying) veya emülsiyon bazlı çözücü uçurma teknikleri sırasında PEG ve PEG-türevlerinin ortama katılması (LACASSE, 1998,CASTELLANOS, 2005,JIA, 2007,PIAO, 2007), PEG ve diğer bir matriks oluşturucu polimerin kopolimerizasyonu (AHMAD, 2004,CHEN, 2006) ve PEG blok veya gelişigüzel (random) kopolimerlerden mikroparçacık oluşturulması (LUCK, 1998,MAKINO, 1999,ZHOU, 2003,KIM, 2004,LUO, 2006) ile hazırlanmaktadır.

PEG, hidrofobik polimerlerin hidrofilik özelliğinin artması için blok kopolimerizasyonda sıkça kullanılmaktadır (FINNE-WISTRAND, 2006). PLA (HUANG, 2001,HE, 2007,XIAO, 2010), PLGA (JEONG, 2000,KWON, 2001,MICHLOVSKÀ, 2010), PCL (ZHOU, 2003,GONG, 2009,DIAO, 2011), poli(bütillen tereftalat) (PBT) (LIU, 1997,DESCHAMPS, 2001,WANG, 2005) ve poli(bütillen süksinat) (PBS) (NAGATA, 1997,HUANG, 2012) gibi poliesterler blok kopolimerizasyonda sıklıkla kullanılmaktadır. 1972 yılında Perret ve Skoulios, ilk defa PEG ve PCL içeren blok kopolimer serisini sentezledikten sonra (PERRET, 1972) literatürde PCL ve PEG blokları içeren blok kopolimerlerin sentezlenmesi sıklıkla çalışılmıştır (BOGDANOV, 1998,RYU, 2000,ZHOU, 2003,PETROVA, 2008,GONG, 2009). PEG-PCL kopolimerler biyobozunur ve biyouyumlu olmalarından dolayı klonazepam, serum albumin, insan fibroblast

büyüme faktörü (b-FGF) ve vitamin B12 gibi çeşitli ilaçların salım sisteminin hazırlanmasında kullanılmıştır (ZHOU, 2003,VERONESE, 2005,KIM M.S., 2006,ALEXIS, 2008,LIN W.J., 2008). Literatüre bakıldığında, misel, mikroküre veya nanoküre formundaki ilaç salım sistemlerinin hazırlaması için çoğunlukla MPEG-PCL diblok ve triblok kopolimerleri kullanılmaktadır (KIM, 1998,KIM, 2001,LIN, 2005,SHI, 2005,GOU, 2008,LIN W.J., 2008,BAIMARK, 2009). Zhou ve grubunun, PCL-PEG kopolimerinden hazırlamış mikrokürelere insan serum albumin yükleyerek yaptığı ilaç salım çalışmasında PEG içeren mikrokürelere sadece PCL içeren mikrokürelere göre daha yüksek yükleme verimliliği gösterilmiştir (ZHOU, 2003). Diğer bir çalışmada ise, biyobozunur ve enjekte edilebilir ısıya duyarlı PEG-PCL hidrojel kontrollü salım sistemi hazırlanmıştır ve düşük sıcaklıkta enjekte sıvı halde olan jel vücut sıcaklığında akışkanlığını yitirerek sürekli (sustained) ilaç salımı sağlamıştır (GONG, 2009).

Çalışmanın Hipotezi

Bu çalışmada önerülen **hipotez**, lokal eklem enflamasyonunun sona erdirilmesi için daha uzun süreli olarak enflamasyonun bastırılmasıdır. Bu nedenle, etanerseptin uzun süreli salımını sağlayabilecek bir sistem geliştirilmesi amaçlanmıştır. Projede geliştirilen Etanerseptin kontrollü salım sisteminin etkin bir tedavi sağlayacağına ve klinikte uygulanabilirlik potansiyelinin yüksek olacağı düşünülmektedir.

Projede Hedeflenen Amaçlar

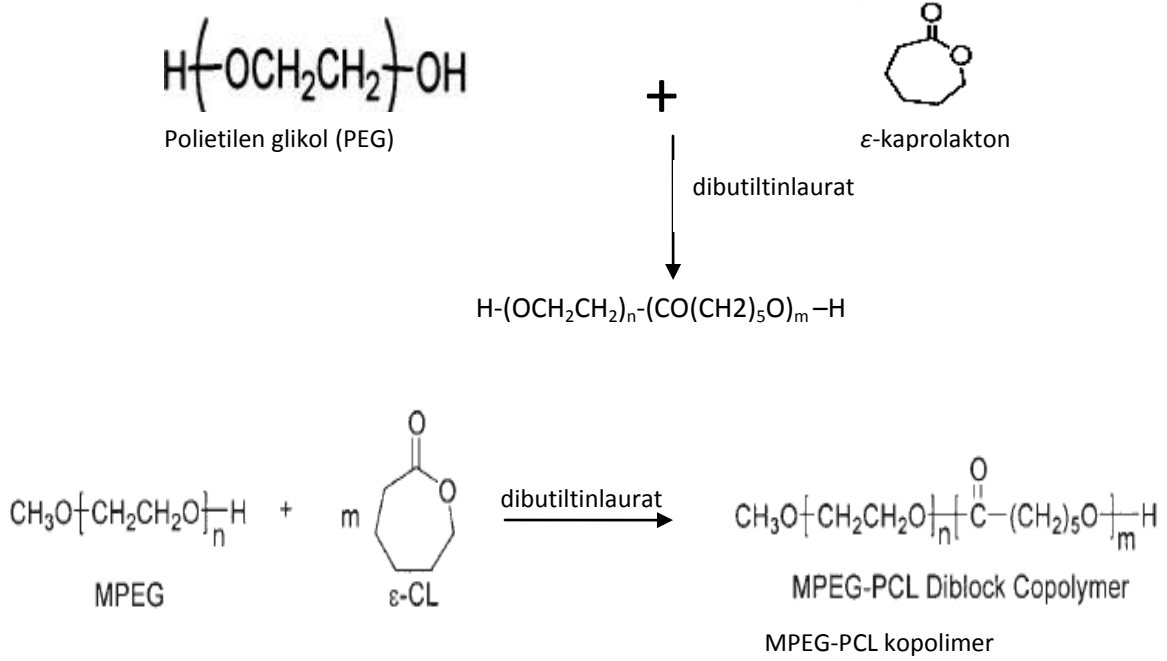
Yüksek hapsedme yüzdesi ve hapsedilen anti-TNF'in biyolojik aktivitesinin korunduğu ve intraartiküler enjeksiyondan sonra en az 3 ay kontrollü olarak salım sağlayacak poli(kaprolakton) ve pegile poli(kaprolakton) mikrokürelere hazırlanması ve karakterizasyonu amaçlanmaktadır. Geliştirilecek salım sistemi ile sağlanacak kontrollü salım ile intraartiküler bölgede sinoviyal fibroblastlardan salgılanan proenflamatuvar sitokinlerin ve metaloproteazların seviyelerin düşürülmesi ve eklemden tekrar enjeksiyona gerek olmadan belirti ve semptomlarını iyileştirilmesi hedeflenmiştir. Bu projede serbest ilacın intraartiküler enjeksiyon ön klinik araştırmalarında kullanılan yüksek doz ilaca bağlı sıkıntıların çözülebileceği bu yeni sistem ve yaklaşım ile anti-TNF tedavisi için yeni bir klinik uygulama geliştirilmesi amaçlanmıştır.

Gereç ve Yöntem

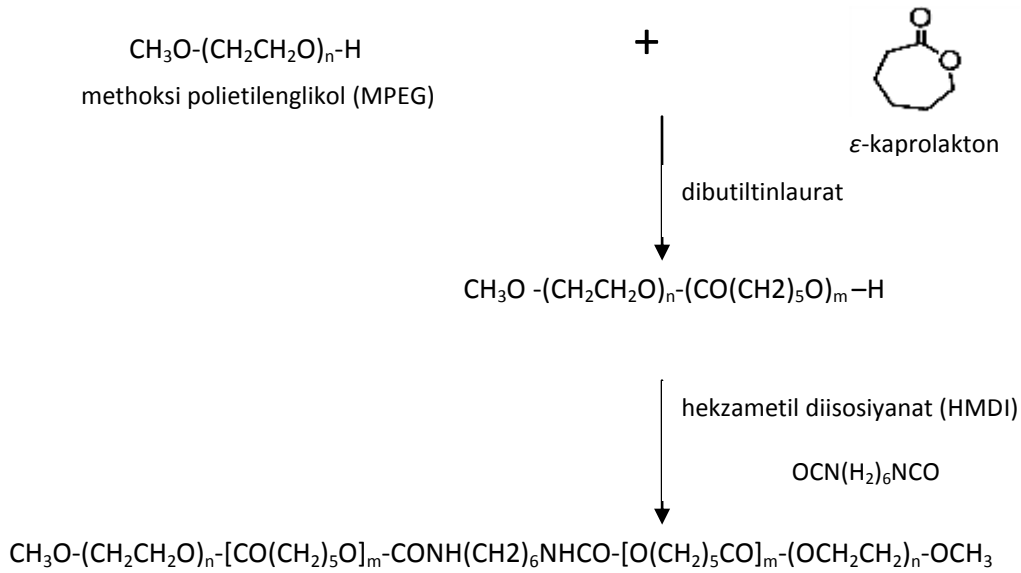
Aşama 1: Polietilen glikol-Polikaprolakton (PEG-PCL) Kopolimeri Sentezlenmesi ve Karakterizasyonu

Bu çalışmada, intraartiküler enjeksiyon ile uygulanabilecek ve en az 3 ay kontrollü protein salımı sağlayabilecek PCL ve PEG-PCL-PEG mikroküreler hazırlanmıştır. PCL mikroküreler hazırlanmasında ticari PCL kullanılmıştır. PEG-PCL-PEG mikroküreler için PEG-PCL-PEG triblok kopolimeri sentezlenmiştir. Sentez çalışmalarının ilk aşamalarında, PEG-PCL ve MPEG-PCL diblok kopolimeri ϵ -kaprolakton (ϵ -CL) monomerinin polietilen glikol (PEG) veya polietilen glikol metil eter (MPEG) ile katalizör (dibutiltinlaurat) varlığında halka açılması kopolimerizasyonu ile hazırlanmıştır (NIKLES, 2010) (Şekil 1). Daha sonra, hazırlanan MPEG-PCL kopolimer ile bağlayıcı ajan (coupling reagent) olan heksametil diisosiyanat (HMDI) kullanılarak PEG-PCL-PEG triblok kopolimeri sentezlenmiştir (FU, 2009, GONG, 2009) (Şekil 2). PEG-PCL-PEG kopolimer sentez aşamasında kullanılan deney düzeneği Şekil 3'de verilmiştir.

İlk aşamalarda, PEG-PCL-PEG triblok kopolimerinin sentezlenmesinde kullanılacak sentez prosedürünün belirlenmesi için monomer türü, süre, monomer oranları gibi çeşitli parametreler değiştirilerek PEG-PCL veya MPEG-PCL diblok kopolimerler sentezlenmiştir. Tablo 3'te PEG-PCL veya MPEG-PCL diblok kopolimerlerin sentez denemelerinde değiştirilen parametreler verilmiştir. Diblok kopolimerleri ϵ -CL monomerinin PEG veya MPEG ile dibutiltinlaurat varlığında halka açılması kopolimerizasyonu ile sentezlenmiştir. Kısaca, farklı mol oranlarında PEG (Sigma-Aldrich, Almanya) veya MPEG (Aldrich, Almanya) üç boyunlu balonda 100°C sıcaklıkta vakum altında 1 saat tutulmuştur. Daha sonra, farklı mol oranlarında ϵ -CL monomeri (Aldrich, Almanya) reaksiyon ortamına eklenip sıcaklık 140°C'ye çıkarılarak 30 dakika vakum altında karıştırılmıştır. Son olarak toplam reaktif miktarının %0.5'i kadar dibutiltinlaurat (Aldrich, Almanya) eklenerek polimerleşme reaksiyonu azot gazı varlığında farklı sürelerde sürdürülmüştür.



Şekil 1. PEG-PCL ve MPEG-PCL kopolimer sentez şeması



Şekil 2. PEG-PCL-PEG triblok kopolimer sentez şeması



Şekil 3. PEG-PCL-PEG kopolimer sentez aşamasında kullanılan deney düzeneği

Sonraki aşamalarda ise, PEG-PCL-PEG triblok kopolimeri sentezlenen farklı oranlardaki MPEG-PCL diblok kopolimerine bağlayıcı ajan (coupling reagent) olan heksametil diisosiyanat (HMDI; Aldrich, Almanya) eklenerek hazırlanmıştır. Kısaca, farklı mol oranlarında MPEG, ϵ -CL monomerleri ve toplam reaktif miktarının %0.5'i kadar dibutiltinlaurat üç boyunlu balonda 140°C sıcaklıkta azot gazı varlığında farklı sürelerde karıştırılarak MPEG-PCL diblok kopolimeri sentezlenmiştir. Daha sonra, reaksiyon ortamına toplam reaktif mol miktarının 1/10'u kadar HMDI bağlayıcı ajan eklenerek reaksiyon sıcaklığı kademeli olarak 80°C'ye düşürülmüştür. Polimerleşme reaksiyonu farklı sürelerde devam ettirilmiştir. Tablo 4'te PEG-PCL-PEG triblok kopolimeri sentez denemelerinde değiştirilen parametreler verilmiştir.

PEG ve PCL homopolimerleri de sentezlenerek kontrol grubu olarak kullanılmıştır. PEG homopolimeri 1 mmol MPEG monomerinin üç boyunlu balonda 140°C sıcaklıkta azot gazı varlığında 6 saat karıştırılmasıyla hazırlanmıştır. PCL homopolimeri ise 1 mmol ϵ -CL monomerinin toplam reaktif miktarının %0.5'i kadar dibutiltinlaurat eklenerek azot gazı varlığında 6 saat karıştırılmasıyla elde edilmiştir.

Tablo 3. PEG-PCL veya MPEG-PCL diblok kopolimerlerin sentez denemelerinde değiştirilen parametreler

	Monomer	Monomer Oranı (ϵ-CL/PEG veya ϵ-CL/MPEG)	Polimerleşme Reaksiyonu Süresi
1. Deneme	PEG	1:1	4 saat
2. Deneme	PEG	1:1	6 saat
3. Deneme	MPEG	1:1	6 saat
4. Deneme	MPEG	1:10	6 saat
5. Deneme	MPEG	1:20	6 saat

Tablo 4. PEG-PCL-PEG diblok kopolimerlerin sentez denemelerinde değiştirilen parametreler

	Monomer Oranı (ϵ-CL/MPEG)	Diblok Kopolimer için Polimerleşme Süresi	Triblok Kopolimer için Polimerleşme Süresi
1. Deneme	1:20	6 saat	5 saat
2. Deneme	1:100	5 saat	4 saat
3. Deneme	1:200	5 saat	4 saat
4. Deneme	1:200	9 saat	6 saat

Hazırlanan PEG-PCL, MPEG-PCL, PEG-PCL-PEG triblok kopolimerinin ve homopolimerlerin saflaştırılması amacıyla; polimerler aseton (Merck, Almanya) veya diklorometan (Merck, Almanya) ile çözülüp, n-hekzan (Merck, Almanya) eklenerek çöktürülmüştür. Daha sonra elde edilen çökelek, n-hekzan ile yıkanarak 1 µm'lik filtreden geçirilmiştir. Bu işlem sonrasında, polimerler 40°C'de 3 gün vakum altında kurutulmuştur.

Saflaştırılan kopolimerin ve homopolimerlerin kimyasal özellikleri ODTÜ Merkezi Laboratuvar'da Fourier Transform Infrared Spektrofotometresi (FTIR; Bruker IFS 66/S, FRA 106/S, Almanya) ve Nükleer Manyetik Rezonans (NMR; Bruker Biospin, Almanya) ile incelenmiştir. Polimerin NMR spektrumları dötero kloroform içinde çözüldükten sonra 300 MHz'de elde edilmiştir. -65°C'den 100°C'ye 10°C/dakika ısıtma hızıyla azot ortamında ısıtılan homopolimer ve kopolimerin termal özellikleri ise ODTÜ Merkezi Laboratuvar'da diferansiyel taramalı kalorimetre (DSC; Perkin Elmer, ABD) ile incelenmiştir. Ayrıca, sentezlenen homopolimer ve kopolimerlerin termal özellikleri ODTÜ Merkezi Laboratuvar'daki Termogravimetrik Analiz Cihazı (TGA, Perkin Elmer, ABD) ile de incelenmiştir. Bu analiz için, sentezlenen homopolimer ve kopolimerler 25°C'den 500°C'ye 10°C/dakika ısıtma hızıyla azot ortamında ısıtılmıştır. Sentezlenen kopolimer ve homopolimerlerin makromoleküler ağırlık ve ağırlık dağılımları B.Ü. UNAM'da Jel Geçirgenlik Kromatografisi (GPC; Agilent 1200, ABD) kullanılarak incelenmiştir. Moleküler ağırlığın tayininde dar molekül ağırlığı dağılımına sahip anyonik olarak sentezlenmiş polistiren standartlar kalibrasyon eğrisi oluşturulmasında kullanılmıştır.

Aşama 2: Model Protein Immunoglobulin G (IgG) Yüklü Polikaprolakton (PCL) ve Polietilen glikol-Polikaprolakton-Polietilen glikol (PEG-PCL-PEG) Mikrokürelerin Hazırlanması ve Karakterizasyonu

Aşama 2.1. Model Protein IgG Yüklü PCL ve PEG-PCL-PEG Mikrokürelerin Hazırlanması

2.1.1. Model Protein IgG Yüklü PCL Mikrokürelerin Hazırlanması

Immunoglobulin G (IgG) yüklü PCL mikroküreler, Saez ve ark. (SAEZ, 2008) kullandığı iki basamaklı emülsiyon- çözücü uçurma (double emulsion-solvent evaporation) metodunun

koşulları geliştirilerek hazırlanmıştır. İlk aşamalarda, mikrokürelerinin hazırlanmasında kullanılan yöntemin optimizasyonu için, yüklenen IgG konsantrasyonu ve dış su fazı polivinil alkol (PVA) derişimi ve dış faza tuz eklenmesi gibi çeşitli parametreler değiştirilerek protein yükleme verimliliğine etkileri incelenmiştir. Optimizasyon çalışmalarında hazırlanan deney grupları Tablo 5'te verilmiştir.

Optimizasyon çalışmalarında hazırlanan IgG yüklü PCL mikroküreler, iki basamaklı emülsiyon- çözücü uçurma yöntemi ile hazırlanmıştır. Kısaca, diklorometan (Merck, Almanya) ile çözünmüş % 5'lik PCL (Sigma-Aldrich, Almanya) çözeltisine farklı derişimlerde 100 µl IgG-PBS (145 mM NaCl içeren 10 mM fosfat tampon çözeltisi, pH 7.2) eklenerek 60 saniye buzda sonikasyon (RX 100, Bandelin Sonorex, Almanya) yapılmıştır. Elde edilen primer emülsiyon 40 ml PVA (Aldrich, Almanya) çözeltisine eklenerek 1100 rpm'de 15 dakika manyetik karıştırıcıda (Schott, Almanya) karıştırılmıştır. Bu karışım, 140 ml PVA çözeltisine eklenerek organik faz uçana kadar karıştırılmaya devam edilmiştir. Elde edilen IgG yüklü polimer mikroküreler 0.45 µm filtreden süzülerek yıkama kurutma işlemlerinden geçirilmiş ve daha sonra 4°C'de desikatör içerisinde saklanmıştır.

Hazırlanan mikrokürelerinin protein yükleme verimliliğinin belirlenmesi için ilk aşamada belli miktardaki IgG yüklü PCL mikroküreler öncelikle 2 ml diklorometan ile manyetik karıştırıcıda 30 dakika inkübe edilmiş ve daha sonra ortama 2 ml PBS eklenmiştir. Bu aşamada IgG PCL içeren organik fazdan çözünlüğünün yüksek olduğu tampon fazına çıkarılmıştır (COCCOLI, 2008). PBS fazı Phenomenex Biosep SEC S3000 kolon (Phenomenex, ABD) kullanılarak 280 nm'de yüksek basınçlı sıvı kromatografi (HPLC) sistemi (Schimadzu, Japonya) ile incelenmiştir. Bu analiz sırasında, mobil faz olarak fosfat tampon (PBS, 0.01 M, pH 7.2) ve 1 ml/min akış hızı kullanılmıştır. PCL mikrokürelere hapsedilen IgG protein miktarının HPLC yöntemi ile belirleyebilmek için farklı konsantrasyonlarda IgG standart çözeltilerinin (2,5-40 µg/ml) HPLC kromatogramlarının tepe alanları hesaplanarak kalibrasyon eğrisi oluşturulmuştur.

Ayrıca, HPLC analizi IgG yüklü PCL mikroküre hazırlanmasında kullanılan metodun proteinin kararlılığına etkisinin incelemesi için de kullanılmıştır. Bu amaçla, 10 µg/ml konsantrasyondaki IgG çözeltisi birgün boyunca diklorometan ile inkübe edildikten sonra PBS eklenmiş ve örneklere HPLC analizi yapılmıştır.

Tablo 5. Optimizasyon için Hazırlanan Mikroküreler

Grup Adı

Grup I	2 mg/ml IgG yüklü PCL mikroküreler (dış faz olarak NaCl eklenmemiş % 1 PVA çözeltisi kullanılarak hazırlanan)
Grup II	5 mg/ml IgG yüklü PCL mikroküreler (dış faz olarak NaCl eklenmemiş % 1 PVA çözeltisi kullanılarak hazırlanan)
Grup III	10 mg/ml IgG yüklü PCL mikroküreler (dış faz olarak NaCl eklenmemiş % 1 PVA çözeltisi kullanılarak hazırlanan)
Grup IV	10 mg/ml IgG yüklü PCL mikroküreler (dış faz olarak NaCl eklenmemiş %2'lik PVA çözeltisi kullanılarak hazırlanan)
Grup V	10 mg/ml IgG yüklü PCL mikroküreler (dış faz olarak % 2 NaCl eklenmiş %1'lik PVA çözeltisi kullanılarak hazırlanan)
Grup VI	5 mg/ml IgG yüklü PCL mikroküreler (iç faz olarak 0.5 % PVA; dış faz olarak NaCl eklenmemiş %1'lik PVA çözeltisi kullanılarak hazırlanan)
Grup VII	5 mg/ml IgG yüklü PCL mikroküreler (iç faz olarak 0.5 % PVA; dış faz olarak % 2 NaCl eklenmiş %1'lik PVA çözeltisi kullanılarak hazırlanan)

HPLC yöntemi proteinin yapısının korunduğunu göstermesine karşın, mikrokürelere hapsedilen IgG miktarın tayininde başarılı olamamıştır. Bu nedenle, hapsedilen IgG miktarını bulmak için literatürde oldukça sık kullanılan polimer matriksin bir bazla hidrolizi sonrası proteinin SDS ile ekstraksiyonu yöntemi modifiye edilerek denenmiştir (MORITA, 2000,WONG, 2001,GHASSEMI, 2009). Kısaca, yaklaşık 10 mg mikroküre 1 ml DMSO (AppliChem, Almanya) çözeltisinde 1 saat boyunca 37°C'de çalkalanarak inkübe edildikten sonra 2150 µl % 0.5 SDS (Bio-Rad, ABD) içeren 0.25 N NaOH (Riedel de-Haen, Almanya) çözeltisi eklenmiş ve yine 4 saat boyunca 37°C'de inkübe edilmiştir. Daha sonra mikrokürelere 3500 devirde 5 dakika santrifüj (EBA-20, Hettich, Almanya) ile çöktürülerek üst çözeltiden alınan örneklerde Bicinchoninik Asit Metodu (BCA Assay) ile hapsedilen protein miktarları belirlenmiştir. Bu yöntemde, 500 µl ekstraksiyon örneği 500 µl 50 birim bicinchoninik asit (Sigma, Almanya) ve 1 birim % 4'lük bakır sülfat çözeltisinden (CuSO₄ 5H₂O, Sigma, ABD) oluşan BCA reaktifi ile 60°C'da 15 dakika inkübe edilmiştir. Daha sonra oda sıcaklığına gelen örneklerin absorbansı 562 nm'de mikropilaka spektrofotometre (µQuant, Biotek, ABD) ile okunmuştur (n=3). Ayrıca, PCL mikrokürelere hapsedilen IgG protein miktarını belirleyebilmek için farklı derişimlerde IgG standart çözeltileri (0-20 µg/ml) aynı şekilde DMSO ve %0.5 SDS içeren 0.25 N NaOH ile inkübe edildikten sonra BCA metodu kullanılarak kalibrasyon eğrisi oluşturulmuştur.

Protein yükleme verimliliği kullanılan hazırlama koşullarıyla değişmektedir ve pahalı biyoaktif ajan taşıyıcı sistemlerin etkinliğinin artırması nedeniyle önemlidir (PARK, 2005). Bu sebeple, protein yüklü mikrokürelere hazırlanmasında kullanılacak prosedürün belirlenmesi için ilk önce protein yükleme verimliliğinin yüksek olmasına bakılmıştır. İlk yapılan deneylerde hazırlanan mikrokürelere protein yükleme verimliliğinin literatüre göre düşük olduğu görülmüştür. Bu nedenle, daha etkin bir hapsedilme verimliliğine ulaşabilmek için yüksek devirde mekanik karıştırıcı kullanılarak ve iç su fazına PVA ekleyerek mikrokürelere hazırlanmıştır. Kısaca, diklorometan ile çözülmüş %5'lik PCL çözeltisine %0.5 PVA içeren 100 µl 5 mg/ml IgG-PBS çözeltisi eklenerek 60 saniye buzda sonikasyon yapılmıştır. Elde edilen primer emülsiyon 40 ml %1'lik PVA çözeltisine eklenerek 1100 rpm'de 15 dakika manyetik karıştırıcıda karıştırılmıştır. Bu karışım 140 ml %1'lik PVA çözeltisine (dış faza %2 NaCl eklenmiş veya eklenmemiş) eklenerek 14 000 rpm de T-25 Ultra-Turrax mekanik karıştırıcı (IKA, Almanya) ile 3 dakika buzda karıştırılmıştır. Daha sonra, 1100 rpm'de 15 dakika 3 saat manyetik karıştırıcıda karıştırılarak organik faz uçurulmuştur. Elde edilen IgG yüklü polimer mikrokürelere 0.45 µm filtreden süzülerek yıkama kurutma işlemlerinden sonra 4°C'de desikatör içerisinde saklanmıştır.

Hapsedilen IgG miktarı, daha önce bahsedilen polimer matriksin NaOH ile hidrolizi sonrası proteinin SDS ile ekstraksiyonu yöntemi ile belirlenmiştir.

Yapılan optimizasyon çalışmaları sonunda, yüksek protein yükleme verimliliğine sahip mikrokürelerin hazırlanmasında kullanılan koşullar kullanılarak IgG yüklü PCL mikroküreler hazırlanmıştır. Kısaca, diklorometan ile çözülmüş % 5'lik PCL çözeltisine 10 mg/ml 50 µl IgG-PBS (145 mM NaCl içeren 10 mM fosfat tampon çözeltisi, pH 7.2) eklenerek 60 saniye buzda sonikasyon yapılmıştır. Elde edilen primer emülsiyon 40 ml PVA çözeltisine eklenerek 1100 rpm'de 15 dakika manyetik karıştırıcıda karıştırılmıştır. Bu karışım, 140 ml PVA çözeltisine eklenerek 14 000 rpm de T-25 Ultra-Turrax mekanik karıştırıcı (IKA, Almanya) ile 3 dakika buzda karıştırılmıştır. Daha sonra, 1100 rpm'de 15 dakika 3 saat manyetik karıştırıcıda karıştırılarak organik faz uçurulmuştur. Elde edilen IgG yüklü polimer mikroküreler 0.45 µm filtreden süzülerek yıkama kurutma işlemlerinden sonra 4°C'de desikatör içerisinde saklanmıştır. Ayrıca, hazırlanan mikrokürelerin bir kısmı Türkiye Atom Enerjisi Kurumu'nda kobalt-60 cihazı kullanılarak uygun koşullarda ve sabit doz hızında (3.62 kGyh-1) 25.4 kGy gama ışınmasına maruz bırakılarak sterilize edilmiştir (SAYIN, 2006).

2.1.2. Model Protein IgG Yüklü PEG-PCL-PEG Mikrokürelerin Hazırlanması

Protein yüklü PCL mikrokürelerin hazırlanmasında kullanılan iki basamaklı emülsiyon-çözücü uçurma metodu kullanılarak, IgG yüklü PEG-PCL-PEG triblok kopolimer mikroküreler hazırlanmıştır. İlk denemelerde, 1:100 veya 1:200 MPEG:ε-CL monomer oranına sahip PEG-PCL-PEG triblok kopolimerleri (Tablo 4'te verilen deneme 2 ve 3) mikroküre hazırlanmasında kullanılmıştır. Kısaca, diklorometan ile çözülmüş %5'lik 1:100 veya 1:200 MPEG:ε-CL monomer oranına sahip PEG-PCL-PEG kopolimer çözeltisine 10 mg/ml'lik stok çözeltisinden 50 µl IgG-PBS eklenerek 60 saniye buzda sonikasyon yapılmıştır. Elde edilen primer emülsiyon 40 ml PVA çözeltisine eklenerek 1100 rpm'de 15 dakika manyetik karıştırıcıda karıştırılmıştır. Bu karışım, 180 ml PVA çözeltisine eklenerek organik faz uçana kadar karıştırılmaya devam edilmiştir. Elde edilen IgG yüklü kopolimer mikroküreler 0.45 µm filtreden süzülerek yıkama kurutma işlemlerinden sonra 4°C'de desikatör içerisinde saklanmıştır.

İlk denemelerde 1:100 veya 1:200 MPEG:ε-CL monomer oranına sahip PEG-PCL-PEG triblok kopolimerleri kullanılarak hazırlanan protein taşıma sistemlerinde küre şeklinde homojen

bir dağılım gözlemlenmediğinden ve çeşitli büyüklüklerde agregatların oluşması nedeniyle, yeniden sentezlenen 1:200 MPEG:ε-CL monomer oranına sahip PEG-PCL-PEG triblok kopolimeri (Tablo 4'te verilen deneme 4) kullanılarak IgG yüklü PEG-PCL-PEG mikroküreler yeniden hazırlanmıştır. Bu mikrokürelerin hazırlanmasında kullanılan çeşitli deneysel hazırlama koşul parametreleri değiştirilerek daha homojen görünüme sahip küre formunda taşıma sistemi oluşturulmuştur. Deney grupları ve parametrelerindeki değişimler Tablo 6'da verilmiştir. Kısaca, farklı organik çözücü ile çözülmüş farklı konsantrasyonlardaki kopolimer çözeltisine 10 mg/ml'lik stok çözeltisinden 50 µl IgG-PBS eklenerek 60 saniye buzda sonikasyon yapılmıştır. Elde edilen primer emulsiyon çözeltisi farklı konsantrasyon ve hacimlerdeki polivinil alkol veya Pluronik F68 (PLF 68, Sigma, Almanya) çözeltisine bir veya iki basamakta eklenerek farklı hız ve sürelerde manyetik karıştırıcı veya homojenizatör ya da manyetik karıştırıcı ve homojenizer birlikte kullanılarak karıştırılmıştır. Daha sonra organik faz uçana kadar 1100 rpm'de 3 saat karıştırılmaya devam edilmiştir. Elde edilen IgG yüklü kopolimer taşıyıcı sistemler 0.45 µm filtreden süzülerek yıkama kurutma işlemlerinden sonra 4°C'de desikatör içerisinde saklanmıştır.

Daha sonra hazırlanan IgG yüklü kopolimer taşıyıcı sistemlerin şekil ve yüzey morfoloji özellikleri ODTÜ Metalürji ve Malzeme Mühendisliği Bölümü SEM Laboratuvarı'nda taramalı elektron mikroskobu (SEM; JSM – 6400 Electrone Microscope, Japonya) ile incelenmiştir. Bu analiz için örnekler, altın kaplama makinasında (Hummler VII Sputter Coating Device, Anatech, ABD) 25 nm kalınlığında altınla kaplanmıştır. SEM analizi sonucunda protein yüklü PEG-PCL-PEG mikrokürelerin hazırlanmasında kullanılacak deney protokolü belirlenmiştir. Kısaca, 1:1 oranındaki dimetilsülfoksit (DMSO, AppliChem, Almanya) kloroform (Sigma, Almanya) karışımı ile 60°C'de çözülmüş %2.5'lik PEG-PCL-PEG çözeltisine 4°C'ye getirildikten sonra 10 mg/ml'lik stok çözeltisinden 50 µl IgG-PBS çözeltisi eklenerek 60 saniye buzda sonikasyon yapılmıştır. Primer emulsiyon 40 ml %3'lük PLF-68 çözeltisine eklenerek 1100 rpm'de 15 dakika manyetik karıştırıcıda karıştırılmıştır. Bu karışım, 168 ml PLF-68 çözeltisine eklenerek 14 000 rpm de T-25 Ultra-Turrax mekanik karıştırıcı ile 3 dakika buzda karıştırılmıştır. Daha sonra, 1100 devirde 15 dakika 5 saat manyetik karıştırıcıda karıştırılarak organik faz uçurulmuştur. Elde edilen IgG yüklü kopolimer mikroküreler 0.45 µm filtreden süzülerek yıkama kurutma işlemlerinden sonra 4°C'de desikatör içerisinde saklanmıştır. Ayrıca, hazırlanan IgG yüklü mikrokürelerin bir kısmı, PCL mikrokürelerde olduğu gibi Bölüm 2.1.1.'de verilen gama ışınlanması yöntemi kullanılarak sterilize edilmiştir.

Tablo 6. Farklı koşullarla hazırlanmış IgG yüklü PEG-PCL-PEG mikroküreler (A) İç Faz Özellikleri, (B) Dış Faz özellikleri ve (C) Karıştırma hızları

(A)

Grup No	Polimer Konsantrasyonu (%)	Organik Çözücü	Organik faz Hacmi (ml)
1	5	Etil asetat	2
2	2.5	Kloroform/DMSO (1:1)	4
3	5	Kloroform	2
4	2.5	Kloroform/DMSO (1:1)	4
5	2.5	Kloroform/DMSO (1:1)	4
6	2.5	Kloroform/DMSO (1:1)	4
7	5	Kloroform/DMSO (1:1)	4
8	5	Kloroform/DMSO (1:1)	2
9	2.5	Kloroform/DMSO (1:1)	4

(B)

Grup No	Surfektant	Surfektant Konsantrasyonu (%)	Dış Faz Hacmi (birinci basamak) (ml)	Dış Faz Hacmi (ikinci basamak) (ml)
1	PVA	1	40	200
2	PVA	1	40	200
3	PVA	1	40	200
4	PVA	1	-	200
5	PVA	1	-	200
6	PLF-68	3	-	200
7	PLF-68	2	-	200
8	PVA	1	-	200
9	PLF-68	3	40	168

(C)

Grup No	Manyetik Karıştırıcı ile (birinci basamak)	Homojenizer ile (ikinci basamak)
1	11000 rpm 15 dakika	14000 rpm ile 3 dakika
	11000 rpm 15 dakika	14000 rpm ile 3 dakika
3	11000 rpm 15 dakika	14000 rpm ile 3 dakika
4	-	14000 rpm ile 3 dakika
5	11000 rpm 15 dakika	14000 rpm ile 3 dakika
6	-	14000 rpm ile 3 dakika
7	-	14000 rpm ile 3 dakika
8	-	14000 rpm ile 3 dakika
9	1100 rpm 15 dakika	14000 rpm ile 3 dakika

Aşama 2.2. Model Protein IgG Yüklü PCL ve PEG-PCL-PEG Mikrokürelerin Karakterizasyonu

Gama sterilizasyonu sonrasında, protein yüklü PCL veya PEG-PCL-PEG mikrokürelerin protein yükleme verimliliği, parçacık boyut dağılımı ve ortalama parçacık büyüklüğü, yüzey morfolojisi ve bozunma gibi özellikleri gama sterilizasyonu yapılmamış mikroküreleri özellikleri ile karşılaştırılmıştır. Ayrıca, gama sterilizasyonu yapılmış mikrokürelere ortamına salınan IgG'nin salım profili, biyoaktivitesi ve protein kararlılığı gibi özellikleri de gama sterilizasyonu yapılmamış mikrokürelere ortamına salınan IgG'nin özellikleri ile karşılaştırılmıştır. Mikroküre hazırlama aşamasından kaynaklanabilecek sitotoksik etkileri incelemek içinse hazırlanan boş PCL veya PEG-PCL-PEG mikroküreler gama sterilizasyonu sonrasında 3T3 hücreler ile etkileştirilmiştir.

2.2.1. Protein Yükleme Verimliliği

Taşıyıcı sistemlerin etkinliği protein yükleme verimliliğinin artması ile değişmektedir (PARK, 2005). Bu sebeple, yüksek protein yükleme verimliliğine sahip mikrokürelerin hazırlanması bu projede amaçlanmıştır. PCL veya PEG-PCL-PEG mikrokürelere hapsedilen model protein IgG miktarını bulmak için ayrıntısı Bölüm 2.1.1.'de verilmiş olan polimer matriksin hidrolizi sonrası proteinin SDS ile ekstraksiyonu yöntemi kullanılmış ve hapsedilen protein miktarları Bicinchoninik Asit Metodu ile belirlenmiştir.

2.2.2. Yüzey Morfolojisi

Gama ile sterilizasyonu yapılmış ve yapılmamış IgG yüklü PCL ve PEG-PCL-PEG mikrokürelerin şekil, yüzey morfoloji özellikleri ile genel görünüşleri taramalı elektron mikroskobu (SEM) ile incelenmiştir. SEM fotoğrafları, örneklerin altın ile kaplanması sonrasında Bilkent Üniversitesi Ulusal Nanoteknoloji Araştırma Merkezi'ndeki taramalı elektron mikroskobu (Quanta 200FEG, FEI, ABD) ve ODTÜ Metalürji ve Malzeme Mühendisliği Bölümü SEM Laboratuvarı'ndaki taramalı elektron mikroskobu (SEM; JSM – 6400 Electrone Microscope,

Japonya) kullanılarak çekilmiştir. Bu analiz için örnekler, altın kaplama makinasında (Hummle VII Sputter Coating Device, Anatech, ABD) 25 nm kalınlığında altınla kaplanmıştır.

2.2.3. Boyut Analizi

Projenin ilk aşamalarında, IgG yüklenmiş mikrokürelerin gama sterilizasyonu öncesinde ve sonrasında ortalama parçacık büyüklüğü, ODTÜ Merkezi Laboratuvar'daki Dinamik Işık Saçılım Spektrometresi (DLS; Malvern CGS-3, Almanya) ile ölçülmüştür (n=3). Bu yöntem, seyreltik çözelti içerisindeki küçük parçacıklardan saçılan ışığın şiddetinin ve değişiminin ölçülmesi temeline dayanmaktadır ve hidrodinamik büyüklük ve parçacık büyüklüğü dağılımının elde edilmesinde kullanılmaktadır. Ölçüm sırasında parçacıkların birbirine yapışmasını önlemek için 1 ml sudaki mikroküre süspansiyonuna % 0.01 Tween 20 eklenmiş ve analizden önce 1 dakika sonikasyon yapılmıştır. Ancak elde edilen DLS sonuçları ile SEM görüntülerinin çok uyumlu olmadığı düşünüldüğü için, daha sonraki aşamalarda IgG yüklü PCL ve PEG-PCL-PEG mikrokürelerin ortalama parçacık boyutu ve boyut dağılımını belirlemede literatürde de örnekleri olan (WU, 2009,CARPENEDO, 2010,RAJAPAKSA, 2010). SEM fotoğraflarından boyut analizi yöntemi kullanılmıştır. Gama ile sterilizasyonu yapılmış ve yapılmamış IgG yüklü PCL ve PEG-PCL-PEG mikrokürelerin ortalama parçacık boyutu ve boyut dağılımını belirlemek için 3 ayrı bölgeden SEM fotoğrafları ODTÜ Metalürji ve Malzeme Mühendisliği Bölümü SEM Laboratuvarı'ndaki taramalı elektron mikroskobu (SEM; JSM – 6400 Electrone Microscope, Japonya) kullanılarak çekilmiştir. Elde edilen fotoğraflardan 500 adet mikrokürenin çaplarını ölçmek için IBM uyumlu bir bilgisayarda açık kaynak kodlu Image-J (National Institutes of Health, Amerika) programı kullanılmıştır. Ayrıca, mikrokürelerin parçacık boyut dağılımını gösterilmesi için eşit aralıklarla oluşturulmuş mikroküre boyutuna karşı yüzde miktarları histogram ve kümülatif aritmetik eğrileri çizilmiştir.

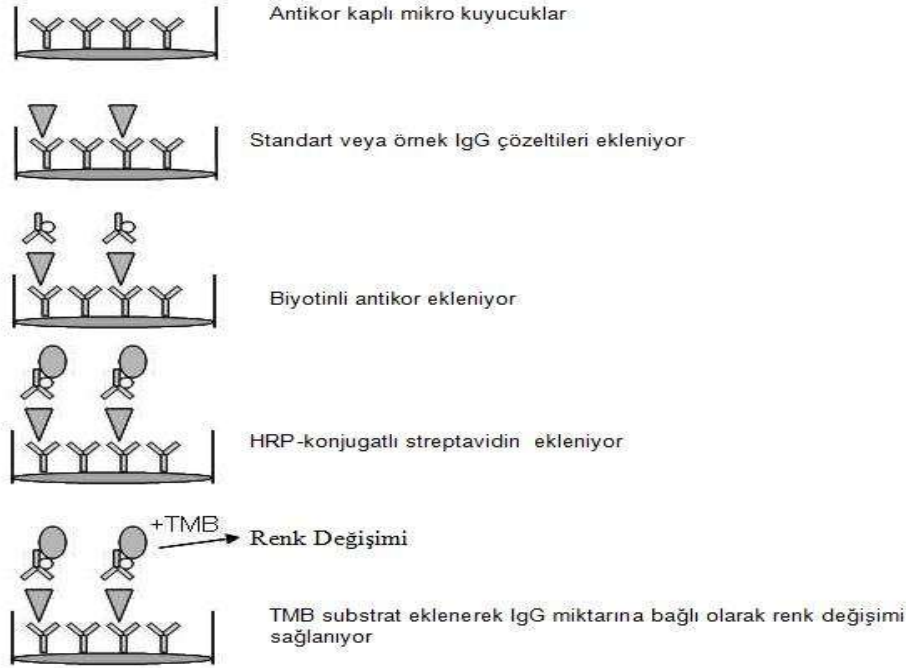
2.2.4. Salım Profili

Projede, en az 3 ay kontrollü salım sağlayacak bir ilaç salım sistemi geliştirilmesi amaçlanmaktadır. Bu sebeple, gama ışınması ile sterilizasyonu yapılmış ve yapılmamış PCL ve PEG-PCL-PEG mikrokürelerden IgG salımı, yaklaşık 5 mg mikrokürenin % 0.01 Tween 20 (Sigma, Almanya) ve % 0.05 sodyum azid (Sigma, Almanya) içeren fosfat tamponunda (PBS, 0.01 M, pH 7.4) (PISTEL, 2000) kapaklı sistemlerde çalkalamalı su banyosu içerisinde, 37°C'de inkübasyonu sonucu incelenmiştir. Salım ortamına Tween 20 surfektantı mikrokürelerin birbirine yapışmasını ve salınan proteinin mikroküre yüzeyine adsorpsiyonunu engellemek amacıyla eklenmiştir (RAVI, 2008). Ayrıca, salım sırasında kontaminasyonu engellemek için ortama sodyum azid ilave edilmiştir. Mikrokürelerden protein çıkışı, salım ortamının farklı zamanlarda 3500 devirde 5 dakikalık santrifüj ile mikrokürelerin çöktürülmesinden sonra üst çözeltilerinden alınan örnekler protein miktarları HPLC ve BCA yöntemleriyle incelenmiştir (n = 4). Boş PCL mikroküreler kontrol grubu olarak kullanılmıştır.

Projenin ilk aşamalarında, mikrokürelerden ortama çıkan toplam protein miktarının tayinininde yüksek performans sıvı kromatografisi de (HPLC) denenmiştir. Bu yöntem, çözeltide çözünmüş halde bulunan bileşenlerin sabit faz üzerinde farklı zaman harcaması esasına dayanır. Farklı zamanlarda alınan salım örnekleri Phenomenex Biosep SEC S3000 kolon (Phenomenex, ABD) kullanılarak 280 nm'de HPLC sistemi (Schimadzu, Japan) ile incelenmiştir. Bu analiz sırasında mobil faz olarak fosfat tampon (PBS, 0.01 M, pH 7.2) ve 1 ml/min akış hızı kullanılmıştır. PCL mikrokürelerden ortama çıkan IgG protein miktarının HPLC yöntemi ile belirleyebilmek için farklı konsantrasyonlarda salım ortamı içinde hazırlanan IgG standart çözeltilerinin HPLC kromatogramlarındaki tepe alanları hesaplanarak kalibrasyon eğrisi oluşturulmuştur. Fakat, salım örneklerindeki IgG miktarı HPLC yöntemi ile ölçülebilen en düşük konsantrasyon olan 5 µg/ml IgG konsantrasyonundan düşük olduğu için mikrokürelerden ortama çıkan toplam protein miktarı bu yöntem ile tayin edilememiştir. Bu nedenle, projenin sonraki aşamalarında mikrokürelerden ortama çıkan toplam protein miktarının tayinininde ayrıntısı Bölüm 2.1.1.'de verilmiş olan BCA yöntemi ile tayin edilmiştir. BCA yöntemi ile PCL ve PEG-PCL-PEG mikrokürelerden ortama salınan IgG protein miktarını belirleyebilmek için farklı konsantrasyonlarda salım ortamı içinde (%0.01 Tween 20 ve %0.05 sodyum azid içeren fosfat tamponu) IgG standart çözeltileri ile kalibrasyon eğrisi oluşturulmuştur.

2.2.5. IgG Biyoaktivitesi

PCL ve PEG-PCL-PEG mikrokürelerden farklı zamanlarda ortama çıkan IgG proteininin biyoaktivitesinin korunup korunmadığını ölçmek için insan IgG enzime bağlı immünosorban (ELİZA) testi (RayBiotech, ABD) kullanılmıştır. Ayrıca, bu test kullanılarak ortama çıkan protein miktarı da belirlenmiştir. Çözeltilerdeki antikor veya antijen varlığını tespit etmekte kullanılan ELİZA testi bazı basamaklardan oluşmaktadır (Şekil 4). 96-kuyucuklu mikrolakalar insan IgG proteinine özel antikorlarla kaplanmıştır. Standart IgG çözeltileri ve salım sonrası örnekleri farklı kuyucuklara eklenerek 2.5 saat oda sıcaklığında bekletilmiştir. Böylece, çözeltilerde bulunan IgG proteinleri kuyucukların dibinde bulunan antikora bağlanmıştır. Yıkama işlemi sonrasında bağlanmayan IgG'ler ortamdaki uzaklaştırılmıştır. Daha sonra, ucunda okumanın yapılabilmesini sağlayan biyotinli anti-insan IgG antikorları eklenerek IgG antikorlarına bağlı IgG proteinine bağlanması sağlanmıştır. Yıkama işlemi yapılarak yeniden bağlanmamış antikorlar uzaklaştırılmıştır. Kuyucuklara HRP-konjugatlı streptavidin eklendikten sonra 3,3',5,5'-tetrametilbenzidin (TMB) substrat eklenerek IgG miktarına bağlı olarak renk değişimi sağlanmıştır. Durdurma çözeltisi ile reaksiyon durdurularak 450 nm'de mikrolaka spektrofotometre (μ Quant, Biotek, ABD) ile absorbanslar okunarak IgG miktarları tayin edilmiştir.



Şekil 4. Enzime bağlı immünosorban (ELİZA) kiti çalışma basamakları

2.2.6. Protein Kararlılığı

Proteinlerde birincil (primer), ikincil (sekonder), tersiyer ve kuarterner yapı diye dört yapı tanımlanır. Bir proteinin denatürasyonu, moleküldeki yan bağların yıkılması ile polipeptit zincirin katlarının açılması, gelişigüzel sarmal (random coil) yapısına dönüşmesi, sonra yeni bir biçimde yeniden katlanması olaydır. Eğer proteinin denatürasyonu, proteinin tersiyer yapısının bozulması, sekonder ve primer yapısının korunması biçiminde olursa geri dönüşümlüdür. Ancak, denatürasyon proteinin tersiyer ve sekonder yapısının bozulması, yalnızca primer yapısının korunması biçiminde olursa geri dönüşümsüzdür. Bunun sonucunda protein biyolojik aktivitesini kaybeder. Bu projede, proteinin polimer mikrokürelere hapsedilmesi sırasında biyolojik aktivitesini korumasını sağlayan bir yükleme prosedürü oluşturmak hedeflenmiştir. Bu sebeple, salım sırasında gama ile sterilize edilen veya edilmeyen mikrokürelere ortamı çıkan proteinin yapısındaki değişimler yüksek performans sıvı kromatografisi (HPLC), Fourier transform infrared (FTIR) spektrometresi ve floresans spektrofotometresi ile incelenmiştir.

HPLC yöntemi, salım çalışmalarında kullanılan koşullarda yapılmıştır (Bölüm 2.2.4). Farklı zamanlarda alınan salım örneklerinin HPLC kromatogramları standart IgG çözeltilerinin kromatogramları ile karşılaştırılmıştır (WANG, 2004). Böylece, salım sonrası proteinin kararlılığında herhangi bir değişim olup olmadığı incelenmiştir. Fakat, bu yöntemle sadece proteinin birincil yapısındaki değişimler incelenebildiği için projenin ilerleyen aşamalarında proteinin tersiyer ve sekonder yapısındaki bozulmaların incelenebildiği floresans ve FTIR spektrofotometresi yöntemleri kullanılmıştır.

Proje planında yer almamasına karşın, proteinin tersiyer yapısının incelenmesinde kullanılan floresans analizleri projeye dahil edilmiştir. Projenin ilk zamanlarında, PCL mikrokürelerden ortama çıkan proteinlerin tersiyer yapısındaki değişimler ise ODTÜ Moleküler Biyoloji, Biyoteknoloji AR-GE Laboratuvarı'ndaki floresans spektrofotometresi (TM-2/2005, Photon Technology International, ABD) ile incelenmiştir. Triptofan rezidü içeren proteinlerin tersiyer yapısının incelenmesinde floresans teknikleri kullanılmaktadır (KIM J.H., 2005, DETERMAN, 2006, JOVANONIC, 2008). Hidrofobik bir amino asit olan triptofan katlanmış konformasyonda proteinin iç kısımlarında yer alır; ancak katlanmaların açılmasıyla (unfolding) yüzeye doğru çıkmaktadır (KIM J.H., 2005). Bu sayede, floresans spektrumundaki değişimler proteinin tersiyer yapısının korunup korunmadığı hakkında bilgi vermektedir. Bu sebeple, PCL mikrokürelerden farklı zamanlarda ortama salınan IgG proteinin kendine özgü triptofan floresans emisyon spektrumu (intrinsic tryptophan fluorescence emission spectra) oda sıcaklığında 295 nm eksitasyon dalgaboyu kullanılarak 300'den 450 nm'ye kadar 5 nm'lik aralıklarla alınmıştır (JOVANONIC, 2008). Tween 20 içermeyen fosfat tamponda hazırlanan IgG standard çözeltileri (50 ng/ml, 1 µg/ml ve 50 µg/ml) ve Tween 20 içermeyen fosfat tampon da kontrol grubu olarak kullanılmıştır. Fakat, floresans kararlılık okumalarında protein katlanma bölgelerinde olan triptofanların açığa çıkmadığı için belirgin değişiklikler (örneğin maksimum emisyon dalga boyu kayması, floresans okuma değerleri) gözlenmediği için projenin ilerleyen aşamalarında bu yöntem kullanılmamıştır.

PCL ve PEG-PCL-PEG mikrokürelerden ortama çıkan proteinlerin sekonder yapısındaki değişimler ODTÜ Merkezi Laboratuvar'daki FTIR spektrofotometresi (Bruker IFS 66/S, FRA 106/S, Almanya) ile incelenmiştir. FTIR spektrofotometresi, moleküllerdeki bağların titreşim frekanslarından molekülün yapısı hakkında bilgi edinilmesini sağlar. Bu sebeple, salım ortamından alınan örneklerin FTIR spektrumları ile standard IgG çözeltilerinin spektrumlarındaki amid I bölgesi ($1720-1600\text{ cm}^{-1}$) proteinin ikincil yapısını incelemek için kullanılmıştır (JOVANONIC, 2008). İlk önce boş salım ortamının, gama sterilizasyonu yapılmış ve yapılmamış

mikrokürelere bekletildiği 6 saatlik salım ortamının FTIR spektrumları karşılaştırılmış, fakat ortama çıkan protein miktarının düşük derişimde olması nedeniyle bir fark gözlemlenmemiştir. Bu nedenle, protein ikincil yapılarında değişim ortamına salınan protein yerine mikrokürelere yüklenen proteinin ekstraksiyon edilmesi ve örneklerin FTIR spektrumlarının incelenmesi ile değerlendirilmiştir (EMAMI, 2009). Mikrokürelere yüklenmiş olan protein, Bölüm 2.1.1’de verilen ekstarksiyon yöntemi ile ortama çıkarılmıştır. Daha sonra mikrokürelere 3500 devirde 5 dakika santrifüj ile çöktürülerek üst çözültiden alınan örnekler Bilkent Üniversitesi Ulusal Nanoteknoloji Araştırma Merkezi’nde (BÜ-UNAM) FTIR spektrometresi (Bruker Tensor 37, Almanya) ile incelenmiştir. Ekstraksiyon ortamından alınan örneklerin FTIR spektrumlarındaki amid I bölgesinin ikinci türevlendirmesi (second derivatization) FTIR Opus 6 programı (Bruker, Almanya) kullanılarak yapılmış ve standard IgG çözültisinin FTIR spektrumlarındaki amid I bölgesinin ikinci türevlendirmesi ile karşılaştırılmıştır. Ayrıca, boş ekstraksiyon ortamı da kontrol grubu olarak kullanılmıştır.

2.2.7. Protein Yüklü Mikrokürelere için Bozunma (Degredasyon) Çalışması

Bu projede, yapısal bütünlüğünü en az 6 ay koruyan PCL ve PEG-PCL-PEG mikrokürelere hazırlanması hedeflenmiştir. Bu sebeple, gama sterilizasyonu yapılan veya yapılmayan IgG yüklü PCL ve PEG-PCL-PEG mikrokürelere %0.01 Tween 20 ve %0.05 sodyum azid içeren fosfat tamponu (PBS, 0.01 M, pH 7.4) ile 6 ay boyunca kapaklı sistemlerde çalkalamalı su banyosu içerisinde 37°C’de 6 ay boyunca bekletilmiştir. 6 aylık inkübasyon sonrasında, IgG yüklü mikrokürelere boyut, kimyasal yapı, moleküler ağırlık ve morfolojilerindeki değişimler PBS ortamına konmamış mikrokürelere özellikleri ile karşılaştırılmıştır.

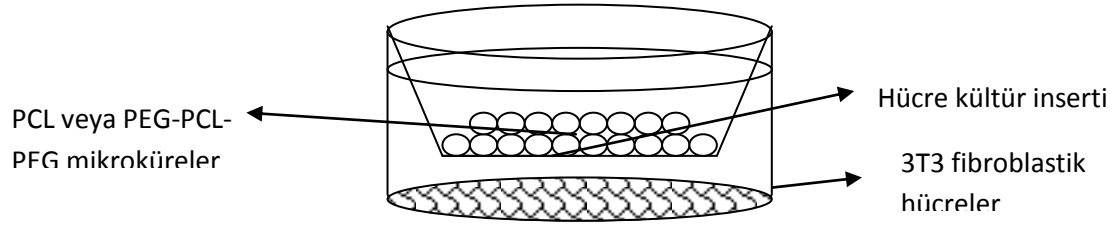
Projenin ilk aşamalarında, mikrokürelere bozunma çalışması öncesinde ve sonrasında ortalama parçacık büyüklüğü, ODTÜ Merkezi Laboratuvar’da bulunan Dinamik Işık Saçılım Spektrofotometresi (DLS; Malvern CGS-3, Almanya) ile ölçülmüştür (n=3). Ölçüm sırasında parçacıkların birbirine yapışmasını önlemek için 1 ml sudaki mikroküre süspansiyonuna %0.01 derişim olacak şekilde Tween 20 eklenmiş ve analizden önce 1 dakika sonikasyon yapılmıştır. Ancak elde edilen DLS sonuçları ile SEM görüntülerinin çok uyumlu olmadığı düşünöldüğü için, daha sonraki aşamalarda IgG yüklü PCL ve PEG-PCL-PEG mikrokürelere ortalama parçacık

boyutu ve boyut dağılımını belirlemesinde Bölüm 2.2.3'de detayları verilen SEM fotoğraflarından boyut analizi yöntemi kullanılmıştır.

Bozunma çalışması öncesinde ve sonrasında IgG yüklü PCL ve PEG-PCL-PEG mikrokürelerin yüzey morfoloji özelliklerindeki değişimler ayrıntısı Bölüm 2.2.2'de verilen SEM analizi ile incelenmiştir. Mikrokürelerin kimyasal yapısındaki değişimler ise, ODTÜ Merkezi Laboratuvar'daki FTIR spektrometresi (Bruker IFS 66/S, Almanya) ile incelenmiştir. Mikrokürelerin molekül ağırlığındaki değişimler BÜ-UNAM'da Jel Geçirgenlik Kromatografisi (GPC; Agilent 1200, ABD) ile incelenmiştir. Moleküler ağırlığın tayini için dar molekül ağırlığı dağılımına sahip anyonik olarak sentezlenmiş polistiren örnekler kullanılarak kalibrasyon yapılmıştır. Ayrıca inkübasyon süresince ortam pH'sı pH metre (Thermo Orion 3 Star, ABD) ile ölçülmüştür.

2.2.8. Biyouyumluluk Çalışması

Mikrokürelerin hazırlanma aşamasından kaynaklanabilecek sitotoksik etkiler, ISO1093 Standardı izlenerek boş PCL veya PEG-PCL-PEG mikrokürelerin 3T3 fibroblastik hücre hattı ile inkübasyonu sonrasında incelenmiştir. Bu sebeple, sitotoksik etkilerin incelendiği çalışmada kullanılan 3T3 fibroblast hücreler %10 sığır serum (FBS; PAA, Avusturya) ve 100 ünite/ml antibiyotik (PAA, Avusturya) içeren Dulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM; PAA, Avusturya) büyüme ortamı ile 37°C'de % 5 CO₂ koşullarında önceden kültive edilerek çoğaltılmıştır. Büyüme vasatı üç günde bir yenilenmiş ve hücreler yeterli sayıya ulaştığında pasajlanarak bu çalışma döneminde 24-kuyucuklu hücre kültür plakasına 100 µl'ye 4 x 10⁴ hücre yoğunluğu sağlanacak şekilde ekilmiştir. Hücre kültür plakasına ekilen 3T3 hücrelerin plaka yüzeyine yapışması için hücreler 24 saat boyunca 37°C ve %5 CO₂ koşullarında karbondioksit inkübatöründe (5215 Shel Lab, ABD) inkübe edilmiştir. Bu inkübasyon sonrasında, gama sterilizasyonu yapılmış boş PCL mikroküreler hücre kültür insertleri (cell culture insert) kullanılarak önceden hücre kültür plakasına ekilmiş 3T3 fibroblastik hücreler ile 2 gün boyunca 37°C ve %5 CO₂ koşullarında inkübe edilmiştir (Şekil 5). Ayrıca, kontrol grubu olarak mikroküre eklenmemiş 3T3 hücreler de aynı koşullarda inkübe edilmiştir. İnkübasyon sonucunda, 3T3 hücrelerde oluşabilecek morfolojik değişimler mikroskopik olarak incelenmiştir (Nikon Eclipse TS100, Çin).



Şekil 5. Sitotoksite deneylerinde PCL veya PEG-PCL-PEG mikrokürelerinin ile 3T3 fibroblastik hücreler ile aynı ortamda inkübasyonunda kullanılan deney düzeneği

İnkübasyon sonrasında 3T3 hücrelerin canlılığında oluşabilecek değişimler ise kolorimetrik bir yöntem olan 3-(4,5-dimetiltiazol-2-yl)-2,5-difeniltetrazolyum bromid (MTT) testi ile değerlendirilmiştir. Bu testte, sarı renkte olan tetrazolium tuzu canlı hücrelerdeki mitokondriyal süksinat dehidrojenaz aktivitesi sonucunda mor formazan reaksiyon ürününe çevrilir. Bu reaksiyon hücre içi ürününün dimetil sülfoksit (DMSO) ile çözünmesi sonucunda ortaya çıkan renkli çözeltinin aborbansı ölçülerek hücre canlılığı belirlenmektedir. MTT testi, literatürdeki bir çalışmada kullanılan MTT protokolünün değiştirilmesiyle oluşturulmuştur (MA, 2010). Kısaca, hücre kültür plakalarından büyüme vasatı ve boş PCL veya PEG-PCL-PEG mikroküreler konulduğu hücre kültür insertleri ile beraber uzaklaştırılmıştır. Daha sonra, kuyucuklarda ekili olan 3T3 hücreleri, fosfat tampon kullanılarak hazırlanan 5 mg/ml MTT (Sigma, ABD) çözeltisinin serum içermeyen DMEM hücre kültür vasatında 1:10 oranında seyreltilmesiyle hazırlanan 500 µl MTT çalışma çözeltisi ile 4 saat boyunca 37°C'de ve % 5 CO₂ koşullarında inkübe edilmiştir. 4 saat sonunda, MTT çalışma çözeltisi kuyucuklardan uzaklaştırılarak her kuyucuğa 500 µl dimetil sülfoksit (DMSO; AppliChem, Almanya) çözeltisi eklendikten sonra hücre kültür plakası oda sıcaklığında 15 dakika orbital çalkalayıcıda (OS-10 Biosan, Litvanya) konularak hücre içinde oluşan formazan kristalleri çözdürülmüştür. Oluşan renkli çözeltinin aborbansı 570 nm 'de mikroparka spektrofotometre (µQuant, Biotek, ABD) ile okunmuştur (n=5).

Boş PCL veya PEG-PCL-PEG mikrokürelerle inkübasyon sonucunda, hücre sayısı değişimi fluorimetrik olarak tayin edilen DNA miktarından hesaplanmıştır. Bu analiz için, 3T3 hücreleri boş mikrokürelerle iki gün süreyle inkübe edilmiştir. İnkübasyon sonrasında hücreler distile su ile patlatılmış ve ortama çıkan DNA Hoechst boya ile karıştırılarak floresans değerleri okunmuştur. Kısaca, hücre kültür plakalarındaki boş mikrokürelerin konulduğu hücre kültür

insertleri ve büyüme vasatı uzaklaştırıldıktan sonra, 500 µl distile su eklenerek 2 saat boyunca 37°C'de ve %5'lik CO₂ koşullarında inkübe edilmiştir. Daha sonra, hücre kültür plakası -80°C'de dondurularak tekrar oda sıcaklığına getirilmiştir. Her kuyucuğa 1 ml trihidroksimetilaminometan (Sigma, ABD), sodyum klorür (Riedel-de Haen, Almanya) ve etilendiamintetraasetik asit (EDTA; Sigma, USA) içeren TNE tampon çözeltisi (pH 7.4) eklenmiştir. Bu örnek çözeltileri 1 ml DNA Hoechst boya (Invitrogen, ABD) içeren TNE tampon çözeltisiyle karıştırılmış ve floresans değerleri florimetre cihazı (Modulus 9200, Turner Biosystems, ABD) ile okunmuştur. Ayrıca, DNA miktarlarını belirleyebilmek için belli derişimlerde sığır DNA'sı (Sigma, ABD) içeren standart çözeltileri Hoechst boyası ile karıştırılmış ve okunan floresans değerleri ile kalibrasyon eğrisi oluşturulmuştur. Bu kalibrasyon eğrisi kullanılarak örneklerdeki DNA miktarı ölçülmüştür. Ölçülen DNA miktarları hücre başına 7.2 pg DNA oranı kullanılarak hücre sayısına çevrilmiştir.

Aşama 3: Anti-TNF α Yüklü Polikaprolakton (PCL) ve Polietilen glikol-Polikaprolakton-Polietilen glikol (PEG-PCL-PEG) Mikrokürelerin Hazırlanması ve Karakterizasyonu

Aşama 3.1. Anti-TNF α Yüklü PCL ve PEG-PCL-PEG Mikrokürelerin Hazırlanması

3.1.1. Anti-TNF α Yüklü PCL Mikrokürelerin Hazırlanması

Anti-TNF α (Enbrel; Wyeth, İngiltere) yüklü PCL mikroküreler, IgG yüklü PCL mikrokürelerin hazırlanmasında kullanılan iki basamaklı emülsiyon-çözücü uçurma (double emulsion-solvent evaporation) metoduyla hazırlanmıştır. Bu hazırlama yönteminin ayrıntısı Bölüm 2.1.1'de verilmiştir. Sadece, iki basamaklı emülsiyonun ilk basamağında IgG çözeltisi yerine 10 mg/ml anti-TNF α çözeltisinden 50 µl % 5'lik PCL diklorometan çözeltisine eklenerek primer emülsiyon elde edilmiştir. Ayrıca, son basamakta karışım 140 ml yerine 180 ml PVA çözeltisine eklenerek 14 000 devirde mekanik karıştırıcı) ile 3 dakika buzda karıştırılmıştır. Hazırlanan anti-TNF α yüklü PCL mikroküreler 0.45 µm filtreden süzülerek yıkama kurutma işlemlerinden sonra 4°C'de desikatör içerisinde saklanmıştır. Projenin ilerleyen basamaklarında, 10 mg/ml anti-TNF α yüklü PCL mikroküre grubunun yanında iç faz protein konsantrasyonu arttırılmış iki PCL mikroküre grubu (25 ve 50 mg/ml) da bu çalışmaya dahil edilmiştir. Hazırlanan

anti-TNF α yüklü mikrokürelerin bir kısmı, ayrıntısı Bölüm 2.1.1.'de verilen gama ışınması yöntemi ile sterilize edilmiştir.

3.1.2. Anti-TNF α Yüklü PEG-PCL-PEG Mikrokürelerin Hazırlanması

Farklı iç faz anti-TNF α konsantrasyonu (10, 25 ve 50 mg/ml) ile hazırlanan PCL mikrokürelerin karakterizasyonu sonucunda projenin son aşamasında kullanılacak anti TNF α yüklü mikrokürelerin iç faz anti-TNF α konsantrasyonu 25 mg/ml olarak belirlenmiştir. Bu nedenle, bu iç faz protein konsantrasyonuna sahip anti-TNF α yüklü PEG-PCL-PEG mikroküreler hazırlanmıştır. Anti-TNF α yüklü PEG-PCL-PEG mikroküreler, ayrıntısı Bölüm 2.1.2'de verilen IgG yüklü PEG-PCL-PEG mikrokürelerin hazırlanmasında kullanılan iki basamaklı emülsiyon-çözücü uçurma (double emulsion-solvent evaporation) metoduyla hazırlanmıştır. Hazırlanan anti-TNF α yüklü PEG-PCL-PEG mikroküreler Bölüm 2.1.1.'de verilen gama ışınlanması yöntemi kullanılarak sterilize edilmiştir.

Aşama 3.2. Anti-TNF α Yüklü PCL ve PEG-PCL-PEG Mikrokürelerin Karakterizasyonu

Hazırlanan anti-TNF α yüklü PCL veya PEG-PCL-PEG mikrokürelerin protein yükleme verimliliği, parçacık boyut dağılımı ve ortalama parçacık büyüklüğü, yüzey morfolojisi ve ortama salınan anti-TNF α 'nın salım profili ve biyoaktivitesi gibi karakterizasyon parametreleri incelenmiştir.

3.2.1. Protein Yükleme Verimliliği

PCL veya PEG-PCL-PEG mikrokürelere hapsedilen anti-TNF α miktarını bulmak için ayrıntısı Bölüm 2.1.1.'de verilmiş olan polimer matriksin hidrolizi sonrası proteinin SDS ile ekstraksiyonu yöntemi kullanılmış ve hapsedilen protein miktarları Bicinchoninik Asit Metodu ile belirlenmiştir.

3.2.2. Yüzey Morfolojisi

Gama ile sterilizasyonu yapılmış anti-TNF α yüklü PCL ve PEG-PCL-PEG mikrokürelerin şekil ve yüzey morfoloji özellikleri taramalı elektron mikroskobu (SEM) ile incelenmiştir. SEM analizinde kullanılan çalışma prosedürü Bölüm 2.2.2'de verilmiştir.

3.2.3. Boyut Analizi

Gama ile sterilizasyonu yapılmış anti-TNF α yüklü PCL ve PEG-PCL-PEG mikrokürelerin ortalama parçacık boyutu ve boyut dağılımını belirlemek için ayrıntısı Bölüm 2.2.3'de verilen SEM fotoğraflarından boyut analizi yöntemi kullanılmıştır.

3.2.4. Salım Profili

3.2.4.1. Fosfat Tampon Ortamında Salım Profili

Projede, en az 3 ay kontrollü salım sağlayacak bir ilaç salım sistemi geliştirilmesi amaçlanmaktadır. Bu nedenle, gama sterilizasyonu yapılmış anti-TNF α yüklü PCL ve PEG-PCL-PEG mikroküreden anti-TNF salımı 3 ay boyunca fosfat tampon ortamında (PBS, 0.01 M, pH 7.4) incelenmiştir. Fosfat tampon ortamında yapılan salım çalışmasının prosedürü Bölüm 2.2.4'de verilmiştir. Mikrokürelerden ortama çıkan toplam protein miktarı, salım ortamının farklı zamanlarda alınan örneklerden ayrıntısı Bölüm 2.2.4'de verilen BCA yöntemi ile ölçülmüştür. Boş PCL ve PEG-PCL-PEG mikroküreler kontrol grubu olarak kullanılmıştır. Mikrokürelerden ortama salınan anti-TNF α protein miktarını belirleyebilmek için farklı konsantrasyonlarda salım ortamı içinde (%0.01 Tween 20 ve %0.05 sodyum azid içeren fosfat tamponu) anti-TNF α standart çözeltileri ile kalibrasyon eğrisi oluşturulmuştur. BCA yöntemiyle belirlenen mikrokürelerden ortama salınan toplam protein miktarları mikrokürelerin BCA yöntemiyle belirlenen protein yükleme miktarına bölünerek salım sırasında ortama çıkan %protein miktarları belirlenmiş ve %kümülatif salım eğrileri çizilmiştir. Ayrıca, salım sırasında 1 miligram

mikroküreden zamanla ortama çıkan proteinin mikrogram cinsinden miktarları belirlenmiş ve zamana karşı kümülatif mikrogram anti-TNF α /mg mikroküre salım profilleri oluşturulmuştur.

Anti-TNF yüklü PCL ve PEG-PCL-PEG mikrokürelerden farklı zamanlarda ortama çıkan biyolojik olarak aktif anti-TNF α proteinin miktarını ölçmek için 3 ay boyunca farklı zamanlarda elde edilen salım örnekleri anti-TNF α ilaca özel enzime bağlı immunosorban (ELİZA) testi (Q-ETA, Matriks Biotek, Türkiye) ile incelenmiştir. Mikrokürelerden ortama salınan biyolojik olarak aktif anti-TNF α protein miktarını belirleyebilmek için farklı konsantrasyonlarda anti-TNF α standart çözeltileri ile kalibrasyon eğrisi oluşturulmuştur. ELİZA yöntemiyle belirlenen mikrokürelerden ortama salınan protein miktarları mikrokürelerin BCA yöntemiyle belirlenen protein yükleme miktarına bölünerek salım sırasında ortama çıkan %biyoaktif kümülatif protein miktarları belirlenmiştir. Ayrıca, salım sırasında 1 miligram mikroküreden zamanla ortama çıkan biyolojik olarak aktif proteinin mikrogram cinsinden miktarları da belirlenmiş ve zamana karşı kümülatif biyoaktif mikrogram anti-TNF α /mg mikroküre salım profilleri incelenmiştir. Salım süresinde biyoaktivite kaybının incelenmesi için mikrokürelerden ortama çıkan biyoaktif anti-TNF α miktarının (ELİZA yöntemiyle belirlenen) toplam salınan protein miktarına (BCA yöntemiyle belirlenen) oranları hesaplanmıştır.

Projenin ilk aşamalarında, 10 mg/ml anti-TNF α yüklü PCL mikroküreler hazırlanmış, daha sonra bu mikroküre grubunun yanında iç faz protein konsantrasyonu arttırılmış iki PCL mikroküre grubu (25 ve 50 mg/ml) da bu çalışmaya dahil edilmiştir. Bu yeni iki grup çalışmaya dahil edilmeden önce bu çalışmanın ön denemesi olarak gama sterilizasyonu yapılmamış mikrokürelerin protein yükleme verimliliği ve fosfat tampon çözeltisindeki bir haftalık salım profilleri incelenmiştir. 10, 25 veya 50 mg/ml anti-TNF α yüklü PCL mikrokürelerin bir haftalık salım profilleri incelenerek farklı zamanlarda ortama çıkan protein miktarları ile ortama çıkan proteinin biyoaktivitesinin korunup korunmadığı ayrıntısı verilen BCA ve ELİZA yöntemleri ile incelenmiştir.

3.2.4.2. Hücre Kültür Vasatı Ortamında Salım Profili

Projenin son aşamasında PCL veya PEG-PCL-PEG kopolimer mikrokürelerden 1 ay süreyle salınan anti-TNF α yüklü RA'li hasta kaynaklı sinoviyal fibroblast hücreler üzerindeki etkisi ve mikrokürelerden in vitro salım profilleri incelenecektir. Bu nedenle hazırlanan 10, 25 veya 50 mg/ml anti-TNF α yüklü PCL mikrokürelerin serum içeren hücre kültür vasatı içerisinde 37°C'de ve %5 CO₂ ortamında salım kinetiği analizleri 2 ay boyunca incelenmiştir. Anti-TNF α yüklü PCL mikrokürelerden farklı zamanlarda ortama çıkan biyolojik olarak biyoaktif anti-TNF α proteinin miktarını ölçmek için farklı zamanlarda elde edilen salım örnekleri anti-TNF α ilaca özel ELİZA testi ile incelenmiştir (n=3). Anti-TNF α yüklü PCL mikrokürelerle yapılan hücre kültür vasatı içerisindeki salım kinetiği analizleri sonucunda 25 mg/ml anti-TNF α yüklü PCL mikrokürelerinin projenin son basamağındaki çalışmalarda kullanılmasına karar verildiği için anti-TNF α yüklü PEG-PCL-PEG mikrokürelerinin iç faz protein konsantrasyonu da 25 mg/ml olarak seçilmiştir. Bu sebeple, 25 mg/ml anti-TNF α yüklü PEG-PCL-PEG mikrokürelerinin de serum içeren hücre kültür vasatı içerisinde 37°C'de ve %5 CO₂ ortamında salım kinetiği analizleri 2 ay boyunca incelenmiştir. PEG-PCL-PEG mikrokürelerden farklı zamanlarda ortama çıkan biyolojik olarak biyoaktif anti-TNF proteinin miktarını ölçmek için de anti-TNF α ilaca özel ELİZA testi kullanılmıştır.

3.2.4.3. Sinoviyal Sıvı Ortamında Salım Profili

Anti-TNF yüklü mikrokürelerin in vivo stabilitesinin ön görüşü için, anti-TNF α yüklü mikroküreler ve ilacın kendisi sağlıklı veya RA'li hastalardan alınan sinoviyal sıvı ile 2 hafta boyunca inkübe edilmiştir. Kısaca, 5 μ g/ml anti-TNF α ilaç veya anti-TNF α yüklü PCL veya PEG-PCL-PEG mikroküreler (5 mg) sağlıklı veya RA'li hastalardan alınan yaklaşık 200 μ l sinoviyal sıvı ile 37°C'de ve %5 CO₂ ortamında iki hafta boyunca bekletilmiştir. Sinoviyal sıvı ortamındaki anti-TNF α miktarları farklı zamanlarda ortamdan alınan örneklerin anti-TNF α ilacına özel ELİZA testi ile belirlenmiştir. Çalışmanın ilk aşamalarında 10 mg/ml anti-TNF yüklü PCL mikrokürelerinin sinoviyal sıvı ortamındaki salım kinetikleri incelenmiştir. Daha sonra, projenin son aşamasında 25 mg/ml anti-TNF α yüklü mikrokürelerinin kullanılmasına karar verildiği için 25 mg/ml anti-TNF α

yüklü PCL ve PEG-PCL-PEG mikrokürelerin salım profilleri de sinoviyal sıvı ortamında 2 hafta boyunca incelenmiştir.

Aşama 4: Anti-TNF α Yüklü PCL veya PEG-PCL-PEG Mikrokürelerin Romatoid Artiritli (RA) Hastalardan Alınmış Sinovisit Hücreleri Üzerindeki Etkilerinin İncelenmesi

Projenin son aşamasında PCL veya PEG-PCL kopolimer mikrokürelerden 1 ay süreyle salınan anti-TNF α 'nın RA'li hasta kaynaklı sinoviyal fibroblast hücreler üzerindeki etkisi ve mikrokürelerden in vitro salım profilleri incelenmiştir. Bu nedenle, sinoviyal fibroblast hücreler RA'e bağlı total eklem protez ameliyatı geçiren hastalardan alınan sinoviyal membranlardan izole edilmiş ve çoğaltılmıştır. Romatoid artritli total eklem protez ameliyatı geçiren hastalardan alınacak sinoviyal membranlar için Hacettepe Üniversitesi Etik Kurulu'dan onay alınmıştır (TBK06/20-41 No'lu karar). Hasta seçimi Ortopedi Uzmanı Prof. Dr. Bülent Atilla ve Pediatri Nefroloji ve Romatoloji Uzmanı Prof. Dr. Seza Sözen tarafından klinik bulgular ve hastalar tarafından doldurulacak RADAI anketi (Ek 1) değerlendirilerek yapılacaktır. Hasta seçim kriterleri olarak Ek 2'de verilmiştir. Bu çalışmada, 5 kadın romatoid artrit hastasından alınan sinoviyal membranlar sinoviyal fibroblast hücrelerin izolasyonu için kullanılmıştır.

Aşama 4.1. Romatoid Artiritli (RA) Hastaların Total Eklem Replasmanı Operasyonu Sırasında ıkarılan Sinoviyal Membranlardan Sinovisit Hücrelerinin İzolasyonu

Sinoviyal fibroblast hücreler, RA'li hastalardan eklem replasmanı sırasında alınan sinoviyal membranlardan enzimatik yöntemle izole edilmiştir. Kısaca, sinoviyal membran makasla küçük parçalara ayrıldıktan sonra fosfat tampon zeltisinde hazırlanan %0.4'lük (g/ml) kollejanaz tip IA (Sigma, ABD) ile 1 saat 37°C'de inkübe edilerek sinoviyal fibroblastlar elde edilmiştir (FICKERT, 2003). Elde edilen sinoviyal fibroblastlar %10 sığır serum ve 100 ünite /ml antibiyotik içeren Dulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM) büyüme vasatı ile 37°C'de ve %5 CO₂ ortamında kültive edilmiştir (FICKERT, 2003). Büyüme vasatı  günde bir yenilenmiş ve hücreler yeterli sayıya ulaştığında %0.1'lik Tripsin-EDTA (Biochrom, Almanya) ile 1:3 oranında pasajlanmıştır. Pasajlanan hücrelerden bir kısmı %10 dimetil sülfoksit (DMSO, AppliChem, Almanya) içeren sığır serum zeltisinde dondurularak sıvı azot tankında (Taylor-Wharton XT34, ABD) saklanmıştır.

Aşama 4.2. Anti-TNF Yüklü PCL veya PEG-PCL-PEG Mikrokürelerin Romatoid Artiritli (RA) Hastalardan Alınmış Sinovisit Hücreler ile Etkileştirilmesi

RA'li hastalardan izole edilen sinoviyal fibroblast hücreler, tedavi amaçlı olarak hazırlanan anti-TNF yüklü PCL ve PEG-PCL-PEG mikrokürelerle 1 ay boyunca kültive edilmiştir. Bu deneyde kullanılacak parametrelerin belirlenmesi için projede belirtilmemesine karşın bazı ön denemeler yapılmıştır.

İlk n denemede, izole edilen sinoviyal fibroblast hücrelerin pasaj sayısı arttıķa bu hücreler tarafından ortama salgılanan TNF- miktarlarında bir değişim olup olmadığı incelenmiştir. Bu n deneme için, RA'li hastaların sinoviyal sıvısındaki ve sinoviyal membranlarından izole edilmiş ve kültür ortamında oğaltılmış fibroblast hücrelerin farklı pasajlarındaki TNF- miktarları insan TNF- enzime bağlı immünosorban (ELİZA) testi (RayBiotech, ABD) kullanılarak incelenmiştir.

İkinci ön denemede ise, yüksek pasajlardaki sinoviyal hücre kültür ortamına farklı konsantrasyonlarda sadece interlekün-1 β (IL-1 β) ve IL-1 β ve TNF- α birlikte eklenerek ekleme öncesi ve sonrasındaki TNF- α değerlerindeki değişimler incelenmiştir. Bu nedenle, RA'li hastaların sinoviyal membranlarından izole edilmiş ve 6. pasaja getirilmiş sinoviyal fibroblast hücreler 6-kuyucuklu hücre kültür plakasına 7.34×10^4 hücre yoğunluğu sağlanacak şekilde ekilmiştir. Ekilen hücrelerin yüzeye yapışması için hücreler 24 saat boyunca %5 sığır serum (FBS; Biochrom, Almanya) ve 100 ünite/ml antibiyotik (PAA, Avusturya) içeren Dulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM; Biochrom, Almanya) büyüme ortamı ile 37°C'de ve %5 CO₂ koşullarında karbondioksit inkübatöründe kültive edilmiştir. İnkübasyon sonrasında, FBS konsantrasyonu %5'ten %0.5'e çekilerek hücreler 24 saat boyunca tekrar kültive edilmiştir. 24 saatin sonunda, hücreler fosfat tampon ile yıkanıp farklı konsantrasyonlarda IL-1 β (0.1, 1 ve 10 ng/ml) veya IL-1 β ve TNF- α (1 ng/ml IL-1 β ve 10 ng/ml TNF- α) ve % 0.5 FBS içeren büyüme ortamında 24 saat inkübe edilmiştir. İnkübasyon sonunda, vasat ortamdan uzaklaştırılarak hücreler fosfat tampon ile yıkanmıştır. Daha sonra, hücreler %5 FBS ve 100 ünite/ml antibiyotik içeren büyüme ortamı ile 37°C'de %5 CO₂ koşullarında karbondioksit inkübatöründe 15 gün boyunca kültive edilmiştir. Ayrıca, IL-1 β ve TNF- α ile etkileştirilmemiş sinoviyal fibroblast hücreler kontrol grubu olarak kullanılmıştır. Belirli aralıklarla, hücre kültür vasatı ortamdan alınarak ortama salınan TNF- α miktarlarındaki değişimler ELİZA testi ile incelenmiştir.

Yapılan üçüncü ön denemede, RA'li hastaların sinoviyal membranlarından izole edilmiş ve 4. Pasaja getirilmiş sinoviyal fibroblast hücrelerin iki farklı konsantrasyondaki IL-1 β (0.1 ve 1 ng/ml) ile sürekli etkileştirilmesi sonucu oluşabilecek TNF- α değerlerindeki değişimler 12 gün boyunca incelenmiştir. Kısaca, sinoviyal fibroblast hücreler 12-kuyucuklu hücre kültür plakasına 3×10^4 hücre yoğunluğu sağlanacak şekilde ekilmiştir. Ekilen hücrelerin yüzeye yapışması için hücreler 24 saat boyunca %5 sığır serum içeren büyüme ortamı ile 37°C'de ve %5 CO₂ koşullarında karbondioksit inkübatöründe kültive edilmiştir. 24 saatin sonunda, hücreler fosfat tampon ile yıkanmış ve 0.1 veya 1 ng/ml IL-1 β içeren hücre kültür ortamı hücrelere eklenmiştir. Her üç günde bir hücre kültür ortamı yeni hazırlanmış 0.1 veya 1 ng/ml IL-1 β içeren hücre kültür vasatı ile değiştirilmiştir. Ayrıca, IL-1 β ile etkileştirilmemiş sinoviyal fibroblast hücreler kontrol grubu olarak kullanılmıştır. Belirli aralıklarla, hücre kültür vasatı ortamdan alınarak ortama salınan TNF- α miktarlarındaki değişimler ELİZA testi ile incelenmiştir.

Yapılan dördüncü ön denemede, anti-TNF α yüklü PCL ve PEG-PCL-PEG mikroküreler ile etkileştirilen sinoviyal fibroblast hücrelerden ortama salınan TNF- α miktarlarındaki değişimler 10 gün boyunca incelenmiştir. Kısaca, RA'li hastaların sinoviyal membranlarından izole edilmiş

ve 4. pasaja getirilmiş sinoviyal fibroblast hücreler 6-kuyucuklu hücre kültür plakasına 7.3×10^4 hücre yoğunluğu sağlanacak şekilde ekilmiştir. Ekilen hücrelerin yüzeye yapışması için hücreler 24 saat boyunca %5 sığır serum içeren büyüme ortamı ile 37°C 'de ve %5 CO_2 koşullarında inkübe edilmiştir. 24 saatlik inkübasyon sonunda, gama sterilizasyonu yapılmış anti-TNF α yüklü PCL ve PEG-PCL-PEG mikroküreler Bölüm 2.2.8'de verilen Şekil 5'teki gibi hücre kültür insertleri (cell culture insert) kullanılarak önceden hücre kültür plakasına ekilmiş ve sinoviyal fibroblast hücreler ile 10 gün boyunca 37°C 'de %5 CO_2 koşullarında inkübe edilmiştir. Her üç günde bir hücre kültür ortamı yeni hazırlanmış hücre kültür vasatı ile değiştirilmiştir. Ayrıca, PCL ve PEG-PCL-PEG mikroküreler ile etkileştirilmemiş sinoviyal fibroblast hücreler kontrol grubu olarak kullanılmıştır. Belirli aralıklarla, hücre kültür medyumunu ortamdaki alınarak ortama salınan TNF- α miktarlarındaki değişimler ELİZA testi ile incelenmiştir.

Son olarak, ilk RA'li hastadan eklem replasmanı sırasında alınan sinoviyal membranlardan enzimatik yöntemle izole edilen sinoviyal fibroblast hücrelerin 4. pasajındaki TNF- α gen ifadesi ayrıntısı Bölüm 4.2.1.3.'te verilecek olan PCR yöntemi ile incelenmiştir. Fakat, bu hastanın incelenen örneklerinde TNF- α ifadesi saptanamamıştır. Bu hastanın, klinik bulguları incelendiğinde klinik olarak aktif RA'lı hastalarda yüksek olarak gözlenen C-reaktif protein (CRP) değerinin düşük olduğu gözlemlenmiştir. Bu nedenle, bu projenin ilerleyen basamaklarında hücre izolasyonu ve çoğaltılabilmesi için yüksek CRP değerine sahip hastalardan alınan sinoviyal membran örnekleri kullanılmıştır.

Yapılan ön denemeler sonunda, RA'li hastalardan izole edilen sinoviyal fibroblast hücreler ile hazırlanan anti-TNF α yüklü PCL ve PEG-PCL-PEG mikrokürelerin 1 ay boyunca kültive edileceği deney koşulları belirlenmiştir. Bu çalışma için oluşturulan deney grupları şu şekildedir:

1. Sinovisit hücreler (kontrol)
2. Sinovisit hücreler + anti-TNF α çözeltisi (tek seferlik uygulama)
3. Sinovisit hücreler + anti-TNF α yüklü PCL mikroküreler (tek seferlik uygulama)
4. Sinovisit hücreler + anti-TNF α yüklü PEG-PCL kopolimer mikroküreler (tek seferlik uygulama)

Proje başvurusunda mikrokürelerin Bölüm 2.2.8 Şekil 5'te gösterildiği gibi hücre kültür insertlerine eklenerek sinovisit hücreler ile aynı kuyucukta 1 ay boyunca inkübe edilmesi planlanmıştır. Fakat, anti-TNF α yüklü PCL ve PEG-PCL-PEG mikroküreler ile etkileştirilen sinoviyal fibroblast hücrelerden ortama salınan TNF- α miktarlarındaki değişimlerin 10 gün boyunca incelendiği ön çalışmada görüldüğü üzere hücre kültür insertünün üstüne konan mikroküreler insertün aşağı tarafındaki hücrelerin yeterince beslenememesine ve yüzeyden ayrılmasına neden olmuştur. Bu nedenle, sinoviyal fibroblast hücreler ile hazırlanan anti-TNF α yüklü PCL ve PEG-PCL-PEG mikrokürelerin etkileştirildiği çalışmada sinoviyal fibroblast hücreler mikrokürelerden ayrı bir ortamda kültive edilmiş ve belli zaman aralıklarında mikrokürelerden ortama salınan anti-TNF α 'yı içeren hücre kültür vasatı hücrelerin üzerine eklenmiştir. Kısaca, sinoviyal fibroblast hücreler 25 cm²'lik hücre kültür flaskına 2.5 x 10⁵ hücre yoğunluğu sağlanacak şekilde ekilmiştir. Hazırlanan anti-TNF α yüklü PCL ve PEG-PCL-PEG mikroküreler ise farklı bir kültür kabında her bir 25 cm²'lik hücre kültür flaskına 10 mg mikroküre düşecek şekilde %5 FBS içeren hücre kültür ortamında bekletilmiştir. Hücre kültür ortamında bekletilen mikrokürelerin 3. salım gününde, mikroküre grupları için kullanılacak olan sinoviyal fibroblast hücrelerin üzerindeki hücre kültür ortamı alınarak yerine 2.5 ml salım ortamı eklenerek 4 gün boyunca hücreler kültive edilmiştir. 4. günün sonunda, 7 günlük salım ortamından alınan 2.5 ml'lik örnekler de sinovisit hücrelerin üzerine eklenmiştir. 3 günlük bir inkübasyon sonunda hücre kültür ortamının yarısı alınarak yerine yeni salım ortamından eklenmiştir. Deneyin sonraki aşamalarında da belirli zaman aralıklarında hücre kültür ortamının yarısı alınarak yerine yeni salım ortamı eklenmiştir.

Sinovisit hücreler ve anti-TNF α çözeltisinin etkileştirildiği gruplar da ise 5 mg mikrokürede bulunan yaklaşık anti-TNF α miktarını (10 μ g/ml) içeren hücre kültür ortamı tek seferde sinoviyal fibroblast hücreler ile 4 gün boyunca etkileştirilmiştir. 4. günün sonunda, yeni hazırlanan 2.5 ml hücre kültür vasatı hücreler üzerine eklenmiş ve 3 gün daha hücreler kültive edilmiştir. 3 günlük bir inkübasyon sonunda hücre kültür ortamının yarısı alınarak yerine yeni hücre kültür vasatı eklenmiştir. Deneyin sonraki aşamalarında da belirli zaman aralıklarında hücre kültür ortamının yarısı alınarak yerine yeni hücre kültür vasatı eklenmiştir.

Kontrol grubunda ise, hücreler %5 FBS içeren hücre kültür ortamında inkübe edilmiş ve belirli zaman aralıklarında hücre kültür ortamının yarısı alınarak yerine yeni hücre kültür vasatı eklenmiştir.

Bu projenin amacı, geliştirilen anti-TNF α salım sistemlerinin RA tedavi potansiyelinin incelenmesidir. Bu amaçla oluşturulan deney gruplarında, 1, 2, 3 ve 4 haftalık inkubasyonlar sonunda RA'li sinovisit hücreleri tarafından enflamasyon sırasında ortama salgılanan proinflamatuvar sitokin ve matriks metalloproteinaz düzeyleri ve gen ifadeleri, sinovisit hücre canlılığı ve sayısındaki değişimler incelenmiş ve negatif kontrol (tedavi görmemiş sinovisit hücreler) ile karşılaştırılmıştır.

4.2.1. Anti-TNF α Yüklü PCL veya PEG-PCL-PEG Mikrokürelerin Romatoid Artritli (RA) Hastalardan Alınmış Sinovisit Hücreler Üzerindeki Etkilerinin İncelenmesi

4.2.1.1. Anti-TNF α Yüklü PCL veya PEG-PCL-PEG Mikroküreler ile Etkileştirilen Sinovisit Hücrelerin Hücre Sayısı ve Canlılığı Özelliklerindeki Değişimlerin İncelenmesi

RA'li hastalardan izole edilen sinoviyal fibroblast hücreler, tedavi amaçlı olarak hazırlanan anti-TNF α yüklü PCL ve PEG-PCL-PEG mikrokürelerle ve de anti-TNF α çözeltisi ile kültive edilmiştir. Ayrıca, PCL ve PEG-PCL-PEG mikroküreler ile etkileştirilmemiş sinoviyal fibroblast hücreler kontrol grubu olarak kullanılmıştır. 1, 2, 3 ve 4 haftalık inkubasyonlar sonunda, sinovisit hücrelerin sayısı ve hücre canlılığı incelenmiştir.

Proje başvurusunda, hücre sayısının fluorimetrik yöntem ile sinovisit hücrelerinin canlılığının ise 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyitetrazolium bromide (MTT) testi ile belirleneceği söylenmiştir. Fakat, projenin ilerleyen aşamalarında hücre sayısının ölçümünde laboratuvarımıza alınan NucleoCounter (Chemometec, Danimarka) cihazının kullanılmasına karar verilmiştir. Bu cihaz, hücrelerin patlatılarak çekirdeğin floresans boya ile boyanması sonucu hücre sayısını otomatik bir şekilde ölçebilmektedir. Böylece, fluorimetrik yöntemle daha hızlı ve daha güvenilir sonuçlar elde edilebilmektedir. 1, 2, 3 ve 4 haftalık inkubasyonlar sonunda, her dört gruptaki hücreler %0.1'lik Tripsin-EDTA (Biochrom, Almanya) ile kaldırılmıştır. Daha sonra 200 μ l hücre süspansiyonuna 200 μ l patlatma tampon çözeltisi (lysis buffer) eklenerek karıştırıldıktan sonra 200 μ l dengeleyici tampon çözeltisi (stabilizing buffer) eklenip

kariştirilmiştir. Daha sonra, hücre lizatları NucleoCounter cihazına ait kasetlere yüklenerek hücre sayıları ölçölmüştür.

Bu çalışmada sinovisit hücrelerinin canlılığının belirlenmesinde kullanılması düşünölen MTT testi yerine uzun süreli hücre canlılığının incelenmesine olanak sağlayan alamar mavisi testi kullanılmıştır. Alamar mavisi bir kolorimetrik yükseltgenme-indirgenme indikatördür ve normalde mavi olan bu ayıraç hücre sayısının artması sonucu hücre költür vasatının indirgenmesi sonucu pembeye dönmektedir. Bu boya oldukça kararlı olduğu ve hücrelerde toksik etkiye neden olmadığı için hücrelerin canlılığının uzun bir süre boyunca devamlı izlenebilmesini sağlamaktadır (AHMED, 1994). Bu nedenle, alamar mavisi testi hücre canlılığının incelenebilmesi için MTT testine oranla daha üstün bir testtir (FIELDS, 1993). 1, 2, 3 ve 4 haftalık inkubasyonlar sonunda, her dört gruptaki hücreler üzerindeki hücre költür vasatı uzaklaştırılarak fosfat tampon çözeltisi ile hücreler yıkanmıştır. Daha sonra %10 alamar mavisi (Invitrogen, ABD) içeren serumsuz DMEM hücre költür vasatı hücreler üzerine eklenerek 4 saat boyunca 37°C'de karanlık ortamda inkübe edilmiştir. İnkübasyon sonunda, hücreler üzerindeki supernatant alınarak abzorbanları 570 nm (indirgenme) ve 600 nm'de (yükseltgenme) mikropilaka spektrofotometre (μ Quant, Biotek, ABD) ile okunmuştur. PCL ve PEG-PCL-PEG mikroküreler veya anti-TNF α çözeltisi ile etkileştirilmemiş sinoviyal fibroblast hücrelerin hücre költür vasatındaki indirgenme miktarı ile PCL ve PEG-PCL-PEG mikroküreler veya anti-TNF α çözeltisi ile etkileştirilmiş hücrelerin hücre költür vasatındaki indirgenme miktarı arasındaki yüzde farklılığı bulmak için alamar mavisi testinin teknik dökümanında bulunan aşağıdaki eşitlik kullanılmıştır:

$$\text{kontrol hücreleri ve test hücreleri arası \% fark} = \frac{(O_{600} \times A_{570}) - (O_{570} \times A_{600})}{(O_{600} \times P_{570}) - (O_{570} \times P_{600})} \times 100$$

Bu eşitlikte:

O_{570} = 570 nm'de yükseltgenmiş alamar mavisinin molar sönme katsayısı

O_{600} = 600 nm'de yükseltgenmiş alamar mavisinin molar sönme katsayısı

A_{570} = 570 nm'de test örneğinin abzorbanısı

A_{600} = 600 nm'de test örneğinin abzorbanısı

P_{570} = 570 nm'de kontrol örneğinin abzorbanası

P_{600} = 600 nm'de kontrol örneğinin abzorbanası

4.2.1.2. Anti-TNF α Yüklü PCL veya PEG-PCL-PEG Mikroküreler ile Etkileştirilen Sinovisit Hücrelerin Proinflamatuvar Sitokin ve Metalloproteaz Düzeylerindeki Değişimlerin İncelenmesi

Geliştirilen anti-TNF α salım sistemlerinin RA tedavi potansiyelinin incelenmesi için oluşturulan deney gruplarında, 1, 2, 3 ve 4 haftalık inkubasyonlar sonunda RA'li sinovisit hücreleri tarafından enflamasyon sırasında ortama salgılanan proinflamatuvar sitokin ve matriks metalloproteinaz düzeylerindeki değişimler incelenmiş ve negatif kontrol (tedavi görmemiş sinovisit hücreler) ile karşılaştırılmıştır. RA'li sinovisit hücrelerden enflamasyon sırasında ortama salgılanan interlökin-6 (IL-6), interlökin-17 (IL-17), tümör nekrosis faktör- α (TNF- α), interferon- γ (INF- γ), matriks metalloproteaz-3 (MMP-3) ve matriks metalloproteaz-13 (MMP-13) düzeyleri her sitokin veya matriks metalloproteaz ait enzime bağlı immünosorban test (ELİZA, eBioscience, ABD) ile incelenmiştir. Ayrıca, ortama salınan anti-TNF α miktarı da anti-TNF α ilacına özel enzime bağlı immünosorban (ELİZA) testi (Q-ETA, Matriks Biotek, Türkiye) ile incelenmiştir. Ortama salınan TNF- α karşıtı miktarları ile sinovisit hücreler tarafından salgılanan IL-6, IL-17, INF- γ , TNF- α ,MMP-3 ve MMP-13 miktarları arasındaki korelasyon incelenmiştir.

Bu projede kullanılan anti-TNF α ilacın (Enbrel®) etken maddesi etanercept ortamda bulunan TNF- α moleküllerine bağlanarak nötralize ederek bu sitokinin aktivitesini engellemektedir (GRATTENDICK, 2008). Etanercept bağlı TNF- α molekülleri ortamdaki uzaklaşmadığı için TNF- α ELİZA testinde kullanılan antikörlere etanercept bağlı TNF- α molekülleri bağlanarak ortamda bulunan TNF- α miktarları yüksek ölçülmektedir. Bu nedenle, ortama salgılanan etkin fizyolojik olarak aktif TNF- α miktarlarını ölçebilmek için TNF- α molekülüne duyarlı Wehi-164 var13 hücre hattının kullanıldığı TNF- α biyoaktivite testi kullanılmıştır. Biyoaktivite testinde kullanılan Wehi-164 var13 hücre hattı Selçuk Üniversitesi Veteriner Fakültesi Viroloji Anabilim Dalı laboratuvarından Prof. Dr. Atilla Işık tarafından hediye edilmiştir. Kısaca, Wehi-164 hücreler 96-kuyucuklu hücre kültür plakasına 1.5×10^4 hücre yoğunluğu sağlanacak şekilde %5 serum içeren DMEM hücre kültür vasatı kullanılarak ekilmiştir. Ekilen hücrelerin yüzeye yapışması için hücreler 24 saat boyunca %5 sığır serum

içeren büyüme ortamı ile 37°C'de ve %5 CO₂ koşullarında inkübe edilmiştir. 24 saatin sonunda, deney gruplarından alınan örnek supernatantlar, 2000 devirde 5 dakika santrifüj yapıldıktan sonra ekilen Wehi-164 hücreler üzerine hücre kültür vasatı ile 1:2 seyreltme yapılarak eklenmiştir. Daha sonra, 2 µg/ml aktinomisin-D (Sigma, İsrail) her kuyucuğa eklenerek hücreler 20 saat boyunca inkübe edilmiştir. İnkübasyon sonunda, hücreler üzerindeki süpernatant alınarak ayrıntısı Bölüm 2.2.8'de verilen MTT testi ile TNF Wehi-164 miktarları indirekt olarak belirlenmiştir. Nötralize edilmemiş TNF-α miktarlarının ölçülebilmesi için 5-500 pg/ml aralığında insan TNF-α (Miltenyl Biotec, Almanya) içeren standart çözeltiler hazırlanarak Wehi-164 hücrelerine eklenmemiş ve yapılan MTT canlılık analizinde okunan abzorbansa karşı ortama eklenmiş TNF-α kalibrasyon eğrisi hazırlanmıştır.

4.2.1.3. Anti-TNFα Yüklü PCL veya PEG-PCL-PEG Mikroküreler ile Etkileştirilen Sinovisit Hücrelerin Gen İfadelerindeki Değişimlerin PCR Yöntemi ile İncelenmesi

1, 2, 3 ve 4 haftalık inkübasyonlar sonunda, RA'li sinovisit hücrelerden enflamasyon sırasında ortama salgılanan IL-6, IL-17, TNF-α, INF-γ, MMP-3 ve MMP-13 mRNA ifadeleri gerçek zamanlı polimeraz zincir reaksiyonu (PCR) yöntemi ile incelenmiştir. Bu analiz için ilk önce sinoviyal fibroblast hücrelerin RNA'ları yapıdan izole edilmiştir. RNA izolasyonunda kullanılacak hücre kültürleri Trizol (Invitrogen, ABD) çözeltilisi aracılığı ile parçalanarak -80°C' de dondurularak saklanmıştır. İzolasyon başlangıcında, oda sıcaklığına getirilen örneklere standart Trizol izolasyon protokolü uygulanarak RNA izolasyonu yapılmıştır. Kısaca, oda sıcaklığında bekletilmiş homojenize haldeki hücre lizatlarına 200 µl kloroform (Applichem, Almanya) eklendikten sonra vorteks yapılmış ve 2-3 dk oda sıcaklığında bekletilmiştir. Daha sonra 12000 devirde 15 dk 4°C' de santrifüj yapıldıktan sonra oluşan üst fazlarda bulunan RNA toplanarak 500 µl izopropanol (Applichem, Almanya) içeren yeni tüplere alınmıştır. RNA ve izopropanol içeren tüp alt üst edilerek karıştırılarak ve 10 dk oda sıcaklığında bekletilmiştir. Tekrar 12000 devirde 15 dk 4°C'de santrifüj yapıldıktan sonra süpernatant dökülerek pellet üzerine 1 ml dietil pirokarbonat (DEPC, Applichem, Almanya) içeren %70'lik etanol (Riedel, Almanya) eklenmiş ve vorteks yapılmıştır. RNA'nın parçalanması ve kırılmasını önlemek için düşük hızda (7500 rpm) 10 dk 4°C' de santrifüj yapılmıştır. Santrifüj sonrası %70'lik etanol dökülmüş ve tüplerin kapakları açık bırakılarak RNA pelletleri kurutulmuştur. Pellet miktarına bağlı olarak 15 µl RNaz

içermeyen su eklenmiş ve çözülmesi sağlanmıştır. 60°C' de 10 dk bekletilmiş ve analize kadar -20°C' de, analiz sonrası -80°C' de saklanmıştır. RNA'nın miktarı ve saflığı spektrofotometrik olarak 230, 260 nm ve 280 nm dalga boyunda optik dansite ölçülerek hesaplanmıştır. %1 Formaldehid içeren denatüre agaroz jel elektroforezi ile izole edilen RNA kalite kontrolü yapılmıştır. Elektroforezde 18S ve 28S rRNA bantları ve mRNA sürüntüsü gözlenmiştir. cDNA sentezi için, ImProm-II™ reverse transkriptaz enzimi (Promega, ABD) ve oligo(dT)15 primeri (Promega, ABD) kullanılmıştır. Kalıp olarak 1 µg RNA kullanılmış ve 0.5 µg oligo(dT)15 primeri ve RNAaz içermeyen su ile 5 µl'ye tamamlanarak 70°C'de 5 dk denatüre edilmiştir. İnkübasyon sonrası hızlı bir şekilde buz üzerine alınarak 10 dk bekletilmiştir. Aynı bir tüpte 15 µl reverse transkripsiyon karışımı hazırlanmıştır. Bu karışımın hazırlanışı şu şekildedir:

Son konsantrasyon		Hacim
RNaz içermeyen su		6.6 µl
Improm-II™ tampon (5X) (Promega, ABD)	1X	4 µl
MgCl ₂ (25mM)(Promega, ABD)	3 mM	2.4 µl
dNTP karışımı (10mM) (Promega, ABD)	0.5 mM	1 µl
Improm-II™ Reverse Transkriptaz		1 µl
Toplam:		15 µl

Toplam 20 µl olacak şekilde 5 µl RNA + primer karışımı, 15 µl ters transkripsiyon karışımı ile birleştirilerek ters transkripsiyon aşağıdaki koşullarda PCR cihazı (Applied Biosystems-9700, ABD) kullanılarak gerçekleştirilmiştir:

25°C' de	5 dk
42°C' de	60 dk
70°C' de	15 dk

Yukarıdaki reaksiyon sonucunda 20 µl cDNA sentezlenmiştir. cDNA örnekleri daha verimli kullanılmak amacıyla 80 µl'ye sulandırılmıştır (20 µl cDNA +60 µl distile su = 80 µl). Analizler her örnek için üçer kez tekrarlanmıştır. Gerçek Zamanlı (Real time) RT-PCR koşulları ise şu şekildedir:

2X SYBR Green karışımı	5 µl
25mM MgCl ₂	1.2 µl
Forward primer (10pmol/ µl)	0.4 µl
Reverse primer (10pmol/ µl)	0.4 µl
cDNA	2 µl
Distile su	1 µl
Toplam:	10 µl

10 µl RT-PCR reaksiyonu Rotor-gene 6000 (Corbett Life Science, ABD) cihazında aşağıdaki koşullarda gerçekleştirilmiştir:

94°C'de	2 dk	
94°C'de	2 s]
60°C'de	20 s] x40 döngü

İstatistiksel Analizler

Verilerin ikili gruplar halinde istatistiksel analizleri SPSS 9 programının (SPSS, ABD) Mann-Whitney U nonparametrik testi ile yapılmıştır. Gruplararası farklılıkları $p \leq 0.05$ seviyesinde istatistiksel olarak anlamlı kabul edilmiştir.

Bulgular ve Tartışma

Aşama 1: Polietilen glikol-Polikaprolakton (PEG-PCL) Kopolimeri Sentezlenmesi ve Karakterizasyonu

Alifatik poliesterler grubundan biyobozunur bir polimer olan poli ϵ -kaprolaktonun (PCL), aynı zamanda biyouyumlu bir polimer olmasından dolayı da kontrollü ilaç salım sistemleri ve diğer biyomalzeme araştırmalarında da sıklıkla kullanılan bir malzemedir (WILLIAMS, 2005,OH, 2007,SAVARINO, 2007,IZQUIERDO, 2008,LUCIANI, 2008,KARATAS, 2009,ERDEMLI, 2010). Fakat, oldukça kristalin ve hidrofobik bir yapıya sahip olduğundan in vivo ortamda bozunma süresi yaklaşık iki yıldır (PRABHAKAR, 2005). Bozunma süresinin yavaş olması, bu polimerin çok yönlü ilaç salım matriks malzemesi olarak kullanım alanını sınırlamaktadır. PCL'in özellikleri, diğer uygun monomerlerle PCL'in monomeri olan ϵ -kaprolaktonun kopolimerizasyonu sonucu farklı biyomedikal uygulamalar için geliştirilebilmektedir. Polietilen glikol (PEG), methoksi polietilenglikol (MPEG) veya polietilen oksit-polipropilen oksit-polietilenoksit (PEOPPOPEO) gibi hidrofilik segmentlerin PCL zinciri ile kopolimerizasyonu veya PCL zincirine eklenmesi (graft) sonucu hidrofobik özellik değiştirilerek PCL'nun biyobozunurluğu geliştirilebilmektedir (HA, 1999,DAS, 2000,KIM M.S., 2006). Ayrıca, PEG zincirleri yapının biyolojik ortamda istenmeyen immunojenik ataklardan korunmasını ve kan dolaşımında uzun ömürlü olmasını sağlamaktadır (ZHOU, 2003).

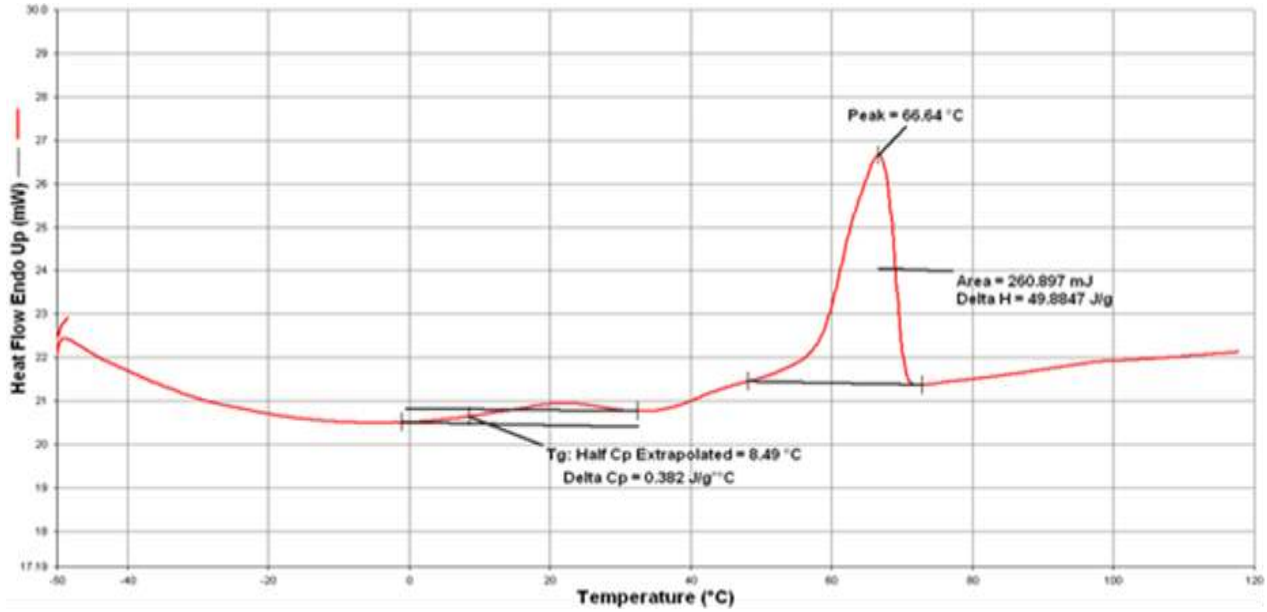
Bu projede, intraartiküler enjeksiyon ile uygulanabilecek ve en az 3 ay kontrollü protein salımı sağlayabilecek PEG ile modifikasyon yapılmış PCL mikrokürelerin hazırlanması amacıyla PEG-PCL diblock ve triblok kopolimeri ϵ -kaprolakton (ϵ -CL) monomerinin polietilen glikol (PEG) veya polietilen glikol metil eter (MPEG) ile katalizör varlığında halka açılması kopolimerizasyonu ile sentezlenmiştir. Sentezlenen kopolimerlerin özellikleri DSC, TGA, NMR, FT-IR ve GPC analizleri ile incelenmiştir. Ayrıca, PEG, MPEG ve ϵ -caprolactone monomerleri ile PEG, PCL homopolimerlerinin kimyasal, termal özellikleri ve makromoleküler ağırlık ve ağırlık dağılımları da incelenerek sentezlenen kopolimerlerin özellikleri ile karşılaştırılmıştır.

İlk aşamalarda, PEG-PCL diblok kopolimeri ϵ -CL monomerinin PEG ile dibutilinlaurat varlığında halka açılması kopolimerizasyonu ile hazırlanmıştır. Daha sonra, PEG yerine MPEG oligomeri kullanılarak MPEG-PCL diblok kopolimeri sentezlenmiştir. Literatüre bakıldığında,

misel, mikroküre veya nanoküre formundaki ilaç salım sistemlerinin hazırlaması için çoğunlukla MPEG-PCL diblok ve triblok kopolimerleri kullanılmaktadır (KIM, 1998, KIM, 2001, LIN, 2005, SHI, 2005, GOU, 2008, LIN W.J., 2008, BAIMARK, 2009). Bu nedenle, MPEG-PCL diblok kopolimer seçilerek 1:20 MPEG:ε-CL oranı ile PEG-PCL-PEG triblok kopolimeri sentezlenmiştir. Fakat, 1:20 MPEG: ε-CL oranı ile hazırlanan kopolimerin sudaki çözünürlüğünün fazla olması nedeniyle MPEG: ε-CL mol oranı 1:100'e ve 1:200'e değiştirilerek yapının daha hidrofobik olması sağlanmış ve sentezlenen kopolimerler kullanılarak iki basamaklı emülsiyon-uçurma yöntemi ile Immunoglobulin G (IgG) yüklü PEG-PCL-PEG mikroküre hazırlanması için ön denemeler yapılmıştır. Daha sonra, hazırlanan mikrokürelerin yapısal özellikleri SEM analizi kullanılarak incelenmiştir. 1:100 monomer oranına sahip PEG-PCL-PEG triblok kopolimeri kullanılarak hazırlanan protein yüklü PEG-PCL-PEG taşıyıcı sisteminde düzgün küreler oluşmadığı ve daha çok büyük şekilsiz aggregatların oluştuğu görülmüştür. 1:200 monomer oranına sahip PEG-PCL-PEG triblok kopolimeri kullanılarak hazırlanan protein yüklü PEG-PCL-PEG taşıyıcı sistemin ise çoğunlukla küre formunda olduğu gözlenmiştir. Fakat, bu formülasyon kullanılarak hazırlanan protein taşıma sisteminde boyut dağılımında homojen bir dağılım gözlemlenmemiştir. Bunun nedeninin mikrokürelerin hazırlanmasında organik çözücü olarak kullanılan diklorometanın 1:200 monomer oranına sahip PEG-PCL-PEG triblok kopolimeri etkin bir şekilde çözmemesi olduğu düşünülmektedir. Ayrıca, bu kopolimerin kloroform, dimetilsülfoksit (DMSO), tetrahidrofur (THF), aseton gibi çeşitli organik çözücüler ve bu organik çözücülerin farklı oranlardaki karışımları ile elde edilen çözücülerdeki çözünürlüğü incelendiğinde etkin bir çözme işleminin gerçekleşmediği görülmüştür. Bununla birlikte, sentezlenen 1:200 monomer oranına sahip PEG-PCL-PEG triblok kopolimerinin molekül ağırlığı (M_w 22000) IgG ve anti-TNF yüklü PCL mikrokürelerin hazırlanmasında kullanılan ticari bir polimer olan PCL'in molekül ağırlığına (M_w 65 000) oranla daha düşük olduğu bulunmuştur. Mikroküre taşıma sistemlerinde, ko-monomer oranları ve polimerin molekül ağırlığı polimerin bozunma süresini ve ilaç salım hızını etkilemektedir (KIM K.K., 2006). Sentezlenen 1:200 monomer oranına sahip PEG-PCL-PEG triblok kopolimerinin molekül ağırlığının PCL polimerine oranla daha düşük olması sonucu bu kopolimer ile hazırlanan mikrokürelerin bozunma süresinin PCL mikrokürelerin bozunma süresinden daha kısa olabileceği düşünüldüğü için ve farklı organik çözücülerde çözünmede yaşanan sorunlara yaşandığı için, PEG-PCL-PEG kopolimerinin sentez parametrelerinden süre değiştirilerek yeniden 1:200 MPEG:ε-CL monomer oranına sahip daha yüksek moleküler ağırlığa sahip PEG-PCL-PEG triblok kopolimeri sentezlenmiştir. Böylece, yapıdaki PCL segmenti uzatılarak polimerin hidrofobik özelliği artırılarak organik

çözücüdeki çözünürlüğü artırılmış ve bu kopolimer IgG veya anti-TNF α yüklü PEG-PCL-PEG mikrokürelerin hazırlanmasında kullanılmıştır.

Hazırlanan PEG-PCL, MPEG-PCL diblok ve PEG-PCL-PEG triblok kopolimerleri ile PEG, PCL homopolimerleri, PEG ve MPEG oligomerleri ve ϵ -CL monomerinin termal özellikleri DSC ile incelenmiştir. Sentez çalışması için yapılan ön denemelerde elde edilen PEG-PCL, MPEG-PCL diblok ve PEG-PCL-PEG triblok kopolimerleri ile PEG, PCL homopolimerleri, PEG ve MPEG oligomerleri ve ϵ -CL monomerinin DSC termogramları Ek-3'te verilmiştir. IgG veya anti-TNF α yüklü PEG-PCL-PEG mikrokürelerin hazırlanmasında kullanılan 1:200 MPEG: ϵ -CL monomer oranına sahip PEG-PCL-PEG triblok kopolimerinin DSC termogramı ise Şekil 6'da verilmiştir. Tablo 7'de ise örneklerin erime sıcaklığı (T_m) ve füzyon entalpileri (ΔH) verilmiştir.



Şekil 6. IgG veya anti-TNF α yüklü PEG-PCL-PEG mikrokürelerin hazırlanmasında kullanılan, sentez parametrelerinden süre değiştirilerek yeniden sentezlenen 1:200 MPEG: ϵ -CL monomer oranına sahip PEG-PCL-PEG triblok kopolimerinin DSC termogramı

DSC analizlerinde, PEG oligomerine ait T_m ve ΔH değerleri tayin edilememiştir. Sentezlerde kullanılan PEG monomerinin ürün bilgi kağıdında erime sıcaklığı -65°C olarak verilmektedir. DSC analizlerinde kullanılan cihazın inebildiği en düşük sıcaklıkta -65°C olduğundan PEG oligomerinin DSC termogramı elde edilememiştir. Benzer şekilde, ϵ -CL

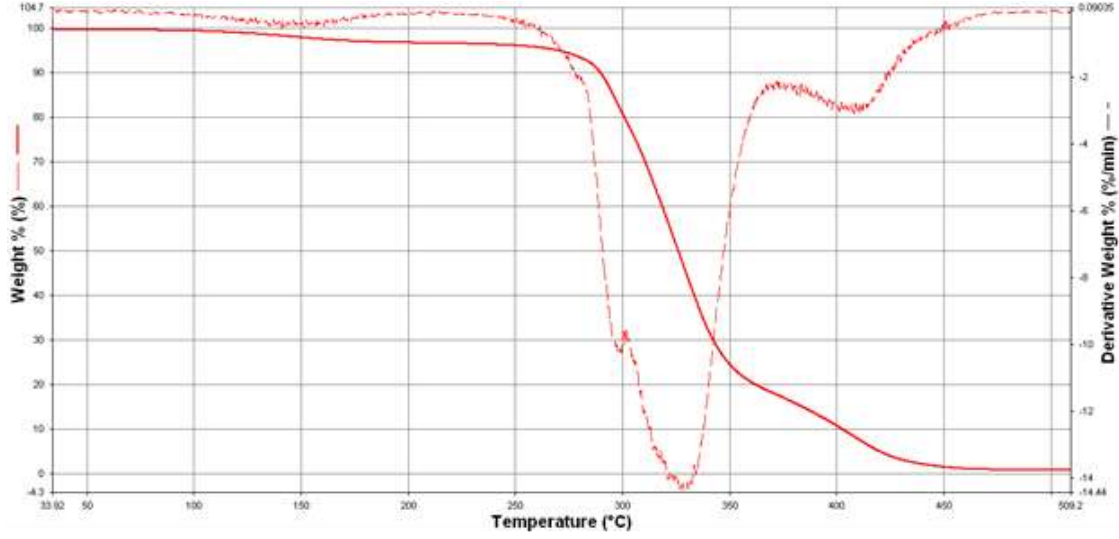
monomerinin PEG oligomeri varlığında halka açılması kopolimerizasyonu ile hazırlan PEG-PCL kopolimerlerinin de T_m ve ΔH değerleri de tayin edilememiştir. PEG yerine MPEG oligomeri kullanılarak sentezlenen ve farklı mol oranları ile başlatılan MPEG-PCL diblok kopolimerlerinin erime sıcaklıklarında bir farklılık gözlemlenmemiştir (Tablo 7). MPEG-PCL diblok kopolimerlerinin DSC termogramlarında tek bir pik gözlemlenirken (Ek-3 Şekil 4), 1:20 MPEG: ϵ -CL monomer oranına sahip PEG-PCL-PEG triblok kopolimerinin DSC termogramında üç tane sıcaklık piki gözlemlenmiştir (Ek-3 Şekil 5). Benzer şekilde, Bogdanov ve ark.'nın (1998) yaptığı bir çalışmada PEG-PCL kopolimerlerinin DSC termogramlarında üç farklı erime sıcaklığı gözlemlenmiştir. 55-58°C sıcaklık aralığında görülen erime noktasının PCL kristal fazına ait olduğu, düşük sıcaklıklarda (25-50°C) gözlemlenen erime noktalarının ise PEG kristaline ait olduğunu belirtilmiştir. 1:20 MPEG: ϵ -CL monomer mol oranına sahip PEG-PCL-PEG kopolimerinin DSC termogramında 24°C, 45.83°C ve 54.24°C erime sıcaklığı pikleri gözlemlenmiştir. 24°C ve 45.83°C T_m değerleri PEG segmentinden gelirken 54.24°C T_m değeri PCL segmentinden kaynaklanmaktadır. Bu sonuç, 1:20 MPEG: ϵ -CL monomer oranına sahip PEG-PCL-PEG triblok kopolimerinin sentezlendiğini doğrulamaktadır. Ancak sentezlenen 1:100 ve 1:200 MPEG: ϵ -CL monomer mol oranına sahip PEG-PCL-PEG kopolimerinin DSC termogramında da tek bir pik gözlemlenmiştir (Şekil 6 ve Ek-3: Şekil 5). Bu yüzden, kopolimer oluşumunun doğrulanması için 1:100 ve 1:200 MPEG: ϵ -CL monomer mol oranına sahip PEG-PCL-PEG triblok kopolimerlerin TGA analizleri yapılmıştır. Aynı zamanda PEG ve PCL homopolimerleri de TGA yöntemi ile incelenmiş ve TGA termogramları kopolimerlerin termogramları ile karşılaştırılmıştır.

PEG ve PCL homopolimerlerin TGA termogramları ve sentez çalışması için yapılan ön denemelerde elde edilen PEG-PCL-PEG triblok kopolimerlerinin TGA termogramları ve diferansiyel termogram eğrileri Ek-4'te verilmektedir. IgG veya anti-TNF α yüklü PEG-PCL-PEG mikrokürelerin hazırlanmasında kullanılan 1:200 MPEG: ϵ -CL monomer oranına sahip PEG-PCL-PEG triblok kopolimerinin TGA termogramı ve diferansiyel termogram eğrileri ise Şekil 7 ve Şekil 8'de verilmiştir. PCL homopolimeri 343°C'de ve 410°C'de T_d değerleri gösterirken PEG homopolimeri 407°C'de T_d değeri vermiştir. Sentezlenen PEG-PCL-PEG triblok kopolimerlerin TGA termogramında da iki bozunma sıcaklığı piki gözlemlenmiştir. Bu piklerden 300-350°C'de gözlemlenen pik PCL segmentinden kaynaklanırken 400-410°C civarında gözlemlenen ikinci pik PEG segmentinden kaynaklanmaktadır. Ayrıca, homopolimerlerin ve kopolimerlerin diferansiyel termogram eğrileri Şekil 8 ve Ek-4 Şekil 3'te karşılaştırmalı olarak verilmiştir. Bu eğriler incelendiğinde, PCL homopolimeri PEG homopolimerine oranla daha düşük kararlılığa sahiptir.

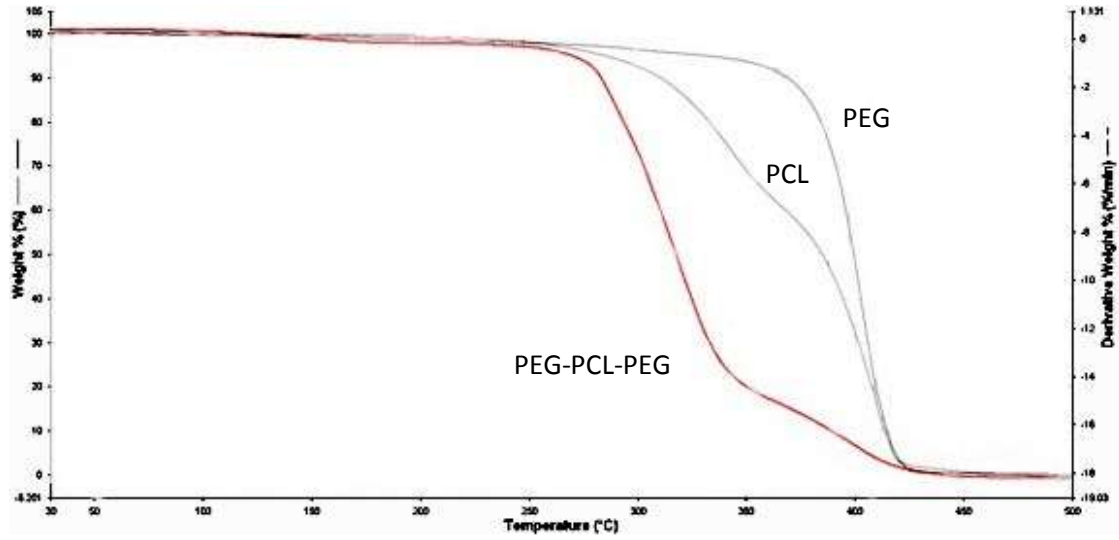
Sentezlenen kopolimerlerin diferansiyel termogravimetrik eğrilerinde iki tane ağırlık kaybı basamağı gözlemlenmiştir. İlk basamak PCL segmentinin termal bozunmasını gösterirken ikinci basamak PEG segmentinin termal bozunmasını göstermektedir. Bu sonuçlar doğrultusunda, sentezlenen her üç PEG-PCL-PEG triblok kopolimer örneğinde kopolimer oluşumu doğrulanmıştır. Benzer şekilde, Yang ve ark.'nın (YANG, 2004) yaptığı bir çalışmada da sentezlenen PEG/PCL ve PEG/PVL diblok kopolimerlerinin TGA termogramlarında iki tane ağırlık kaybı basamağı gözlemlenmiştir.

Tablo 7. Sentez aşamalarında kullanılan monomer ve oligomerler ile sentezlenen kopolimer, homopolimerin erime sıcaklığı (T_m) ve füzyon entalpileri (ΔH)

	T_m (°C)	ΔH (J/g)
PEG	-	-
MPEG	55.26	178.5683
ϵ -kaprolakton	-2.16	106.9567
PEG homopolimeri	50.99	129.9680
PCL homopolimeri	57.42	88.3054
PEG-PCL kopolimeri (4 saat polimerleşme süresi ile hazırlanan)	-	-
PEG-PCL kopolimeri (6 saat polimerleşme süresi ile hazırlanan)	-	-
MPEG-PCL kopolimeri (1:1)	51.18	139.6921
MPEG-PCL kopolimeri (1:10)	50.16	103.2055
MPEG-PCL kopolimeri (1:20)	50.14	121.9171
PEG-PCL-PEG kopolimeri (1:20)	24, 45.83, 54.54	75.0148
PEG-PCL-PEG kopolimeri (1:100)	62.82	71.1410
PEG-PCL-PEG kopolimeri (1:200)	65.52	77.0015
PEG-PCL-PEG kopolimeri (Sentez parametrelerinden süre değiştirilerek yeniden sentezlenen 1:200)	66.64	49.8887



Şekil 7. IgG veya anti-TNF α yüklü PEG-PCL-PEG mikrokürelerin hazırlanmasında kullanılan, sentez parametrelerinden süre değiştirilerek yeniden sentezlenen 1:200 MPEG: ϵ -CL monomer oranına sahip PEG-PCL-PEG triblok kopolimerinin TGA termogramı



Şekil 8. PEG ve PCL homopolimerleri ve IgG veya anti-TNF α yüklü PEG-PCL-PEG mikrokürelerin hazırlanmasında kullanılan, sentez parametrelerinden süre değiştirilerek yeniden sentezlenen 1:200 MPEG: ϵ -CL monomer oranına sahip PEG-PCL-PEG triblok kopolimerinin diferansiyel termogram eğrileri

Hazırlanan homopolimer ve kopolimer örneklerinin ve hazırlama aşamasında kullanılan oligomer ve monomerlerin kimyasal özellikleri FT-IR spektroskopisi ile incelenmiştir. ϵ -kaprolakton monomeri ile PEG ve MPEG oligomerinin FT-IR spektrumları Ek-5'de verilmiştir. PEG oligomerinin FTIR spektrumunda, literatürde daha önceden verilmiş PEG oligomeri için karakteristik FT-IR pikleri 3421.60 cm^{-1} , 2886.45 cm^{-1} , 1098.88 cm^{-1} ve 1060.27 cm^{-1} 'de görülmüştür (NGUYEN, 2010). 3421.60 cm^{-1} 'de gözlemlenen pik zincir sonundaki (terminal) hidroksil grubundan, 2886.45 cm^{-1} 'de görülen pik PEG zincirindeki CH bağının gerilme ve titreşmesinden, 1098.88 cm^{-1} 'de görülen pik PEG zincirindeki $-\text{OCH}_2\text{CH}_2$ yapısındaki CO gerilmesinden, 1060.27 cm^{-1} 'de görülen pik ise C-O-C gerilmesinden kaynaklanmaktadır. MPEG oligomerinin FT-IR spektrumunda 2881.11 cm^{-1} 'de C-H bağının gerilme ve titreşmesinden, 1096.82 cm^{-1} 'de MPEG zincirindeki $-\text{OCH}_2\text{CH}_2$ yapısındaki C-O gerilmesinden, 1059.13 cm^{-1} 'de C-O-C gerilmesinden kaynaklanan, ve 841.10 cm^{-1} 'de metilen grubundan kaynaklanan karakteristik pikler görülmüştür. ϵ -kaprolakton monomerinin karakteristik FT-IR pikleri ise 2932 cm^{-1} 'de gözlemlenen asimetric CH_2 gerilme piki, 2862.28 cm^{-1} 'de simetric CH_2 gerilme piki, 1723 cm^{-1} 'de karbonil bandı, 1289.50 cm^{-1} 'de gözlemlenen C-O ve C-C gerilme pikleri, 1250.68 cm^{-1} 'de gözlemlenen C-O-C gerilme piki ile 1162 cm^{-1} 'de gözlemlenen C-O ve C-C gerilme pikleridir.

Sentezlenen PEG ve PCL homopolimerlerinin FT-IR spektrumları Ek-5'de verilmiştir. MPEG oligomerinden sentezlenen PEG homopolimeri de MPEG oligomerinin gösterdiği karakteristik piklere sahiptir (2282.70 cm^{-1} , 1103.85 cm^{-1} , 1059.78 cm^{-1} , ve 841.46 cm^{-1}). Sentezlenen PCL homopolimeri literatürde daha önceden verilmiş karakteristik PCL FT-IR piklerine sahiptir (ELZEIN, 2004). 2943.82 cm^{-1} 'de gözlemlenen asimetric CH_2 gerilme piki, 2864.54 cm^{-1} civarında gözlemlenen simetric CH_2 gerilme piki, 1720.6 cm^{-1} civarında gözlemlenen karbonil gerilme piki, 1292.63 cm^{-1} civarında gözlemlenen C-O ve C-C gerilme pikleri, 1237.95 cm^{-1} civarında gözlemlenen asimetric C-O-C gerilme piki ve 1170 cm^{-1} civarında gözlemlenen C-O ve C-C gerilme pikleri PCL yapısının karakteristik pikleridir.

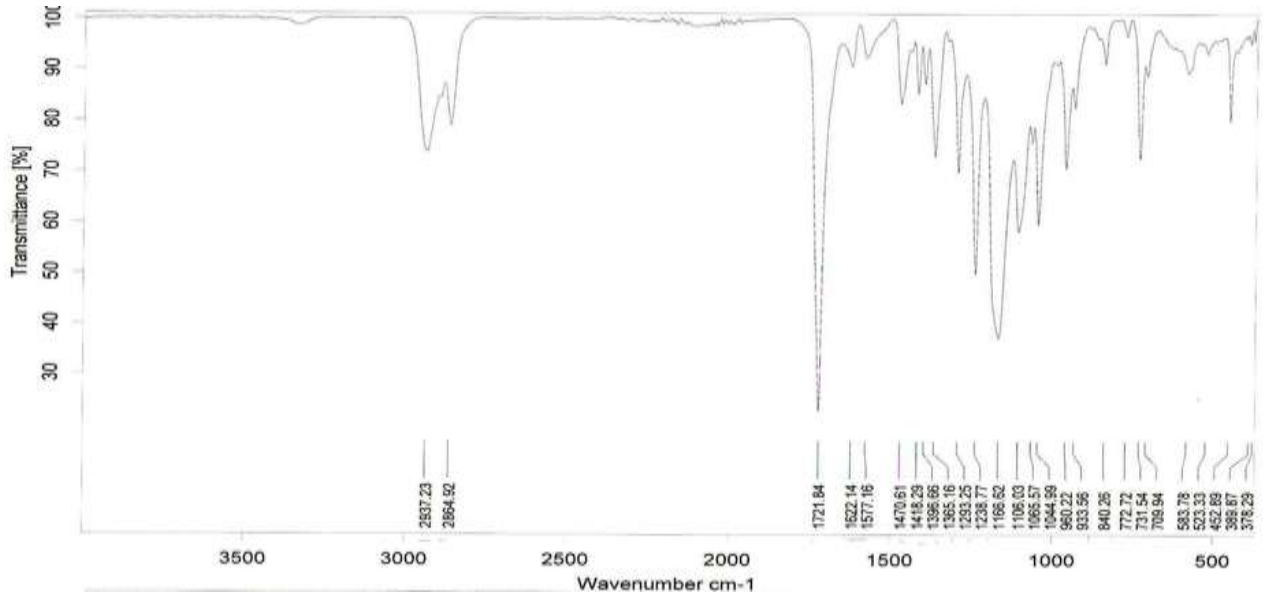
Sentez çalışmalarının ilk aşamalarında, ϵ -CL monomerinin PEG ile dibutiltinlaurat varlığında halka açılması kopolimerizasyonu ile PEG-PCL kopolimerleri hazırlanmıştır. Bu sentez denemelerinde polimerleşme süresi 4 saatten 6 saate çıkarılmıştır. Farklı polimerleşme süreleri ile hazırlanmış PEG-PCL kopolimerlerin FT-IR spektrumları Ek-5 Şekil 3'te verilmiştir. Farklı sürelerde polimerleşen kopolimerlerin FT-IR analizi sonucunda benzer spektrumlar elde edilmiştir. Polimerleşme süresinin değiştirilmesi kopolimerlerin kimyasal yapısında herhangi bir değişime neden olmamıştır. Ayrıca, PEG oligomeri ve ϵ -CL monomeri kullanılarak sentezlenen

PEG-PCL diblok kopolimerlerinin FT-IR spektrumlarında hem PCL hem de PEG segmentinden gelen karakteristik pikler gözlemlenmiştir. FT-IR sonuçlarına göre, kullanılan sentez yöntemi ile PEG-PCL diblok kopolimerinin sentezlendiği doğrulanmıştır. Sırasıyla, 4 saatte polimerleşen PEG-PCL kopolimeri ve 6 saatte polimerleşen PEG-PCL kopolimerinin spektrumunda görülen 1726.09 cm^{-1} ve 1731.25 cm^{-1} karbonil bandı ve 1248.27 cm^{-1} ve 1249.04 cm^{-1} asimetrik C-O-C gerilme piki kopolimerlerin yapısında bulunan ϵ -CL segmentinden gelmektedir. Ayrıca, PEG segmentinden kaynaklanan 3419.92 cm^{-1} ve 3424.59 cm^{-1} 'deki terminal hidroksil grubuna ait pik, 2867.42 cm^{-1} ve 2866.1 cm^{-1} 'deki CH bağının gerilme ve titreşmesi piki, 1098.37 cm^{-1} ve 1097.65 cm^{-1} 'deki OCH_2CH_2 yapısındaki C-O gerilmesine ait pik ve 1062.57 cm^{-1} ve 1063.48 cm^{-1} 'deki C-O-C gerilmesi piki PEG-PCL kopolimeri örneklerinde görülmüştür.

ϵ -CL monomerinin MPEG ile dibutiltinlaurat varlığında halka açılması kopolimerizasyonu ile farklı mol oranlarında hazırlanan MPEG-PCL kopolimerlerinin FTIR spektrumları Ek-5 Şekil 4'te verilmiştir. Farklı mol oranları ile polimerleşmeye başlatılan MPEG-PCL kopolimerlerinin FT-IR spektrumlarında hem PCL hem de PEG segmentinden gelen karakteristik pikler gözlemlenmiştir. FT-IR sonuçlarına göre, kullanılan sentez yöntemi ile MPEG-PCL kopolimerinin sentezlendiği doğrulanmıştır. Bütün MPEG-PCL kopolimerlerinde 1727 cm^{-1} civarında gözlemlenen karbonil bandı, 1240 cm^{-1} civarında gözlemlenen asimetrik C-O-C gerilme piki kopolimerin yapısında ϵ -CL segmentinin varlığını göstermektedir. Ayrıca, PEG segmentinden kaynaklanan 2882 cm^{-1} civarındaki C-H bağının gerilme ve titreşmesi piki, 1100 cm^{-1} civarındaki OCH_2CH_2 yapısındaki CO gerilmesine ait pik, 1060 cm^{-1} civarındaki -C-O-C gerilmesi piki ve 841 cm^{-1} civarındaki metilen grubu piki MPEG-PCL kopolimer spektrumlarında gözlemlenmiştir. 1:20 MPEG: ϵ -CL oranına çıkıldığında yapıdaki PCL segmentinden kaynaklanan piklerin daha belirginleştiği görülmüştür (Ek-5 Şekil 4C). Ayrıca, 1:1 ve 1:10 MPEG: ϵ -CL oranında hazırlanan kopolimerlerin spektrumlarında gözlemlenmeyen bazı karakteristik PCL segment pikleri 1:20 MPEG: ϵ -CL oranında hazırlanan kopolimerlerin spektrumlarında belirgin bir şekilde görülmüştür. Bu PCL kaynaklı pikler, 2944 cm^{-1} 'de gözlemlenen asimetrik CH_2 gerilme piki ve 1293 cm^{-1} civarında gözlemlenen C-O ve C-C gerilme pikleridir.

Sentez çalışması için yapılan ön denemelerde elde edilen farklı MPEG: ϵ -CL oranlarda sentezlenen MPEG-PCL kopolimerinin bağlayıcı ajan varlığında polimerizasyonu sonucunda oluşan PEG-PCL-PEG triblok kopolimerinin FT-IR spektrumları Ek 5 Şekil 5'te verilmiştir. Ayrıca, IgG veya anti-TNF α yüklü PEG-PCL-PEG mikrokürelerin hazırlanmasında kullanılan 1:200 MPEG: ϵ -CL monomer oranına sahip PEG-PCL-PEG triblok kopolimerinin FT-IR

spektrumu Şekil 9'da verilmiştir. PEG-PCL-PEG triblok kopolimerlerinin FT-IR spektrumlarında hem PCL hem de PEG segmentinden gelen karakteristik pikler gözlemlenmiştir. PCL segmentinden kaynaklanan 2935 - 2950 cm^{-1} aralığında gözlemlenen asimetric CH_2 gerilme piki, PCL ve PEG segmentinden kaynaklanan 2857 – 2865 cm^{-1} aralığında gözlemlenen C-H bağının gerilme ve titreşmesi piki, PCL segmentinden kaynaklanan 1719 – 1723 cm^{-1} aralığında gözlemlenen karbonil piki, PCL segmentinden kaynaklanan 1238 – 1242 cm^{-1} aralığında gözlemlenen asimetric C-O-C gerilme piki ve 1282 – 1297 cm^{-1} aralığında gözlemlenen C-O ve C-C gerilme pikleri, PEG segmentinden kaynaklanan 1102 – 1106 cm^{-1} civarında gözlemlenen OCH_2CH_2 yapısındaki C-O gerilmesine ait pik ve 1060 – 1066 cm^{-1} civarında gözlemlenen C-O-C gerilmesi piki ve son olarak 840 – 844 cm^{-1} aralığında gözlemlenen PEG segmenti kaynaklı metilen grubu piki bu karakteristik pikleri oluşturmaktadır. Ayrıca, bağlayıcı ajandan kaynaklanan ve 1470 – 1585 cm^{-1} aralığında gözlemlenen N-H bükülme titreşme piki triblok kopolimer oluşumunu doğrulamaktadır. Literatüre bakıldığında da, N-H bükülme titreşme pikinin varlığı triblok kopolimer sentezini göstermektedir (GONG, 2007,FU, 2009).



Şekil 9. IgG veya anti-TNF α yüklü PEG-PCL-PEG mikrokürelerin hazırlanmasında kullanılan, sentez parametrelerinden süre değiştirilerek yeniden sentezlenen 1:200 MPEG: ϵ -CL monomer oranına sahip PEG-PCL-PEG triblok kopolimerinin FT-IR spektrumu

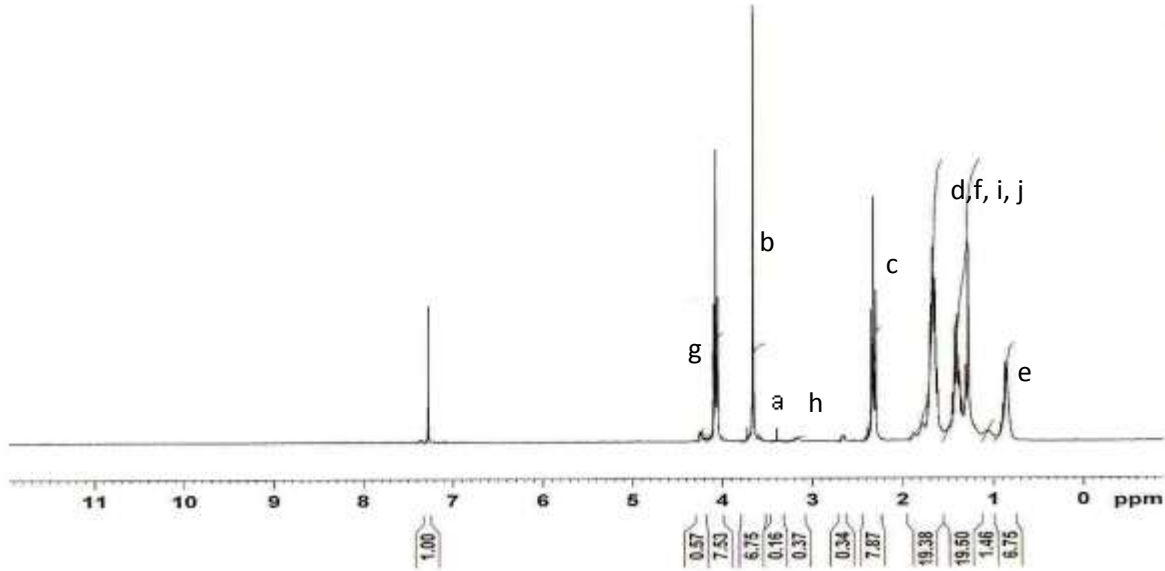
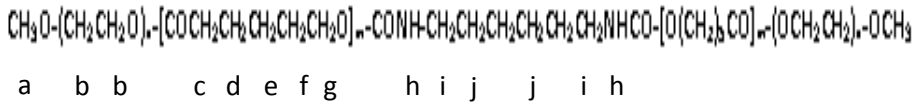
Sentez çalışmasında kullanılan oligomerler ve monomer ile sentezlenen homopolimer ve kopolimer örneklerinin kimyasal özellikleri NMR spektroskopisi ile de incelenmiştir. ϵ -kaprolakton monomeri ile PEG ve MPEG oligomerinin NMR spektrumu Ek 6'da verilmiştir. ϵ -kaprolakton monomerinin NMR spektrumu, Kiersnowski ve ark. (KIERSNOWSKI, 2004) yaptığı bir çalışmadaki ϵ -kaprolakton NMR spektrumu ile benzerlik göstermektedir. 1.05 - 1.95 ppm, 2.2 - 2.54 ppm ve 3.8 - 3.7 ppm değerlerinde ϵ -kaprolakton metilen gruplarının verdiği pikler görülmektedir. PEG oligomerinin NMR spektrumunda 3.2 - 3.6 ppm ($H-[OCH_2CH_2]_n-OH$) ve 3.7 - 4.3 ppm ($H-[OCH_2CH_2]_n-OH$) değerlerinde iki metilen piki görülürken MPEG oligomerinde terminal metoksi protonundan ve metil gruplarına ait hidrojenlerden kaynaklanan tek bir pik gözlemlenmiştir.

Sentezlenen PEG ve PCL homopolimerlerinin NMR spektrumları da Ek 6'da verilmiştir. Sentezlenen PCL homopolimeri NMR spektrumunda metilen gruplarından kaynaklanan dört adet belirgin proton piki vermiştir. Bu pikler 1.2-1.4 ppm ($OCH_2CH_2CH_2CH_2CH_2CO$), 1.5-1.7 ppm ($OCH_2CH_2CH_2CH_2CH_2CO$), 2.1-2.3 ppm ($OCH_2CH_2CH_2CH_2CH_2CO$) ve 3.9 - 4.0 ppm ($OCH_2CH_2CH_2CH_2CH_2CO$) proton pikleridir. MPEG oligomerinden sentezlenen PEG homopolimeri ise 3.3 ppm $CH_3O-(CH_2CH_2O)_n-H$ ve 3.5 ppm'de $CH_3O-(CH_2CH_2O)_n-H$ proton sinyali vermiştir.

Sentez çalışmasının ön deneme deneylerinde, ϵ -CL monomerinin PEG ile dibutyltinlaurat varlığında halka açılması kopolimerizasyonu ile farklı polimerleşme süreleri ile sentezlenen PEG-PCL diblok kopolimerlerin NMR spektrumları Ek 6'da verilmiştir. 4 ve 6 saat polimerleşme süresi ile hazırlanan PEG-PCL kopolimerlerinin NMR spektrumları arasında bir fark gözlenmemiştir. İki kopolimerin spektrumunda da PEG (3.2 - 3.6 ve 3.7 - 4 ppm) ve PCL segmentlerine (1.2 - 1.4 ppm, 1.5 - 1.7 ppm, 2.1 - 2.3 ppm ve 3.9 - 4.0 ppm) ait proton pikleri gözlemlenmiştir.

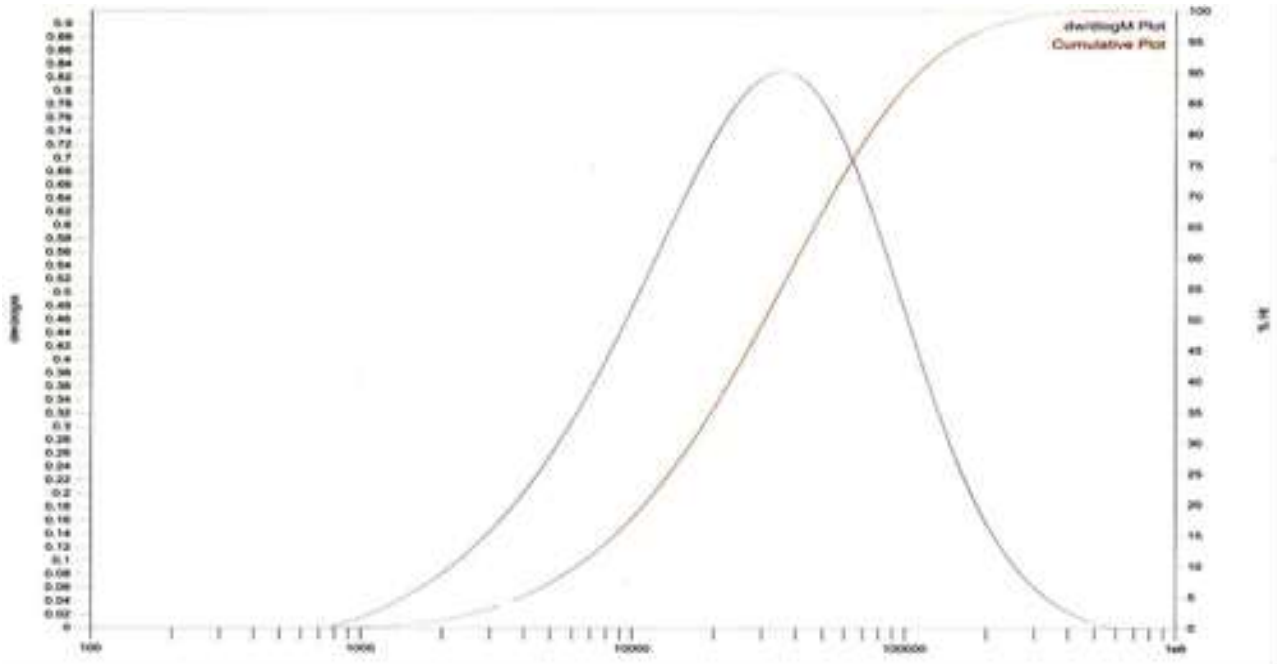
Ön denemelerde sentezlenen farklı monomer mol oranlarında MPEG-PCL diblok kopolimerlerinin NMR spektrumları Ek 6'da verilmiştir. Farklı mol oranları ile polimerleşmeye başlatılan MPEG-PCL kopolimerlerinin NMR spektrumlarında hem PCL (1.2 - 1.4 ppm, 1.5 - 1.7 ppm, 2.1 - 2.3 ppm ve 3.9 - 4.0 ppm) hem de PEG segmentinden (3.2 - 3.6 ve 3.7 - 4 ppm) gelen karakteristik pikler gözlemlenmiştir. MPEG: ϵ -CL oranı arttıkça NMR spektrumlarındaki PCL segmentinden kaynaklanan proton piklerinin şiddeti artmıştır.

Sentez çalışması için yapılan ön denemelerde elde edilen farklı MPEG:ε-CL oranlarda sentezlenen MPEG-PCL kopolimerinin bağlayıcı ajan varlığında polimerizasyonu sonucunda oluşan PEG-PCL-PEG triblok kopolimerinin NMR spektrumları Ek 6 Şekil 5'te verilmiştir. Ayrıca, IgG veya anti-TNFα yüklü PEG-PCL-PEG mikrokürelerin hazırlanmasında kullanılan 1:200 MPEG:ε-CL monomer oranına sahip PEG-PCL-PEG triblok kopolimerinin NMR spektrumu Şekil 10'da verilmiştir. PEG-PCL-PEG kopolimerinin NMR spektrumu incelendiğinde hem PCL (1.2 - 1.4 ppm, 1.5 - 1.7 ppm, 2.3 ppm ve 3.9 - 4.0 ppm) hem de PEG segmentinden (3.3 ve 3.5 – 3.8 ppm) gelen proton pikleri gözlemlenmiştir. Ayrıca, bağlayıcı ajandan kaynaklanan proton sinyalleri (1.6 – 1.7 ve 3.3 – 3.4 ppm) de kopolimerin NMR spektrumunda gözlemlenmiştir. PEG-PCL-PEG kopolimerine ait NMR spektrumu daha önceki bir çalışmada sentezlenen PEG-PCL-PEG kopolimerinin NMR spektrumu ile benzer proton piklerini vermiştir (HWANG, 2010).



Şekil 10. IgG ve anti-TNFα yüklü PEG-PCL-PEG mikrokürelerin hazırlanmasında kullanılan, sentez parametrelerinden süre değiştirilerek yeniden sentezlenen 1:200 MPEG:ε-CL monomer oranına sahip PEG-PCL-PEG triblok kopolimerinin NMR spektrumu

PEG, PCL homopolimerlerinin, MPEG-PCL diblok ve PEG-PCL-PEG triblok kopolimerlerinin makromoleküler ağırlık ve ağırlık dağılımları GPC analizi kullanılarak incelenmiştir. Moleküler ağırlık tayininde dar molekül ağırlığı dağılımına sahip ve anyonik olarak sentezlenmiş polistiren standartlar kalibrasyon eğrisi oluşturulmasında kullanılmıştır (Ek 7). Sentezlenen PEG ve PCL homopolimer ve sentez çalışması için yapılan ön denemelerde elde edilen kopolimerlerin farklı MPEG:ε-CL oranlarda sentezlenen MPEG-PCL diblok ve PEG-PCL-PEG triblok kopolimerlerin GPC kromatogramları da Ek 7'de verilmiştir. Ayrıca, IgG veya anti-TNFα yüklü PEG-PCL-PEG mikrokürelerin hazırlanmasında kullanılan 1:200 MPEG:ε-CL monomer oranına sahip PEG-PCL-PEG triblok kopolimerinin GPC kromatogramı Şekil 11'de verilmiştir. Sentezlenen homopolimer ve kopolimerlerin molekül ağırlıkları ve polidispersite indeksleri (M_w/M_n) ise Tablo 8'de verilmiştir.



Şekil 11. IgG veya anti-TNFα yüklü PEG-PCL-PEG mikrokürelerin hazırlanmasında kullanılan, sentez parametrelerinden süre değiştirilerek yeniden sentezlenen 1:200 MPEG:ε-CL monomer oranına sahip PEG-PCL-PEG triblok kopolimerinin GPC kromatogramı

Tablo 8. Sentezlenen homopolimer ve kopolimerin sayıca ortalama molekül ağırlıkları (M_n), ağırlıkça ortalama ağırlıkları (M_w) ve polidispersite indeksleri (M_w/M_n)

	M_w (g/mol)	M_n (g/mol)	PDI M_w/M_n
PEG homopolimeri	71 380	71 260	1.002
PCL homopolimeri	11 866	9281.3	1.278
MPEG-PCL kopolimeri (1:1)	1629.1	1440.8	1.131
MPEG-PCL kopolimeri (1:10)	1659.2	1942.5	0.854
MPEG-PCL kopolimeri (1:20)	120 870	2147.1	56.295
PEG-PCL-PEG kopolimeri (1:20)	105 450	2054	51.339
PEG-PCL-PEG kopolimeri (1:100)	11 126	2736	4.1
PEG-PCL-PEG kopolimeri (1:200)	22 224	5930	3.75
PEG-PCL-PEG kopolimeri (Sentez parametrelerinden süre değiştirilerek yeniden sentezlenen 1:200)	47 038	14 051	3.35

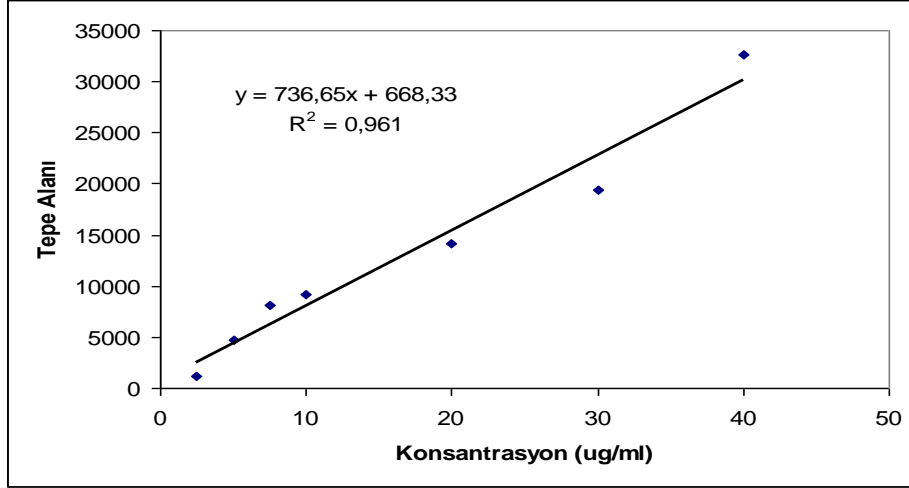
Farklı MPEG:ε-CL oranında hazırlanan MPEG-PCL diblok ve PEG-PCL-PEG triblok kopolimerinin molekül ağırlıklarına ayrı ayrı bakıldığında ε-CL mol miktarı arttıkça kopolimerlerin molekül ağırlıklarında bir artış gözlemlenmiştir. Park ve ark. (PARK, 2005) yaptığı bir çalışmada, paklitaksel yüklü nanoküreleri hazırlamak için farklı MPEG:ε-CL oranında MPEG-PCL blok kopolimerler hazırlanmıştır. Hazırlanan kopolimerlerde ε-CL miktarı arttıkça M_n ve M_w değerlerinde bir artış gözlemlenmiştir. Ek 7 Şekil 3 ve Şekil 4'te verilen GPC kromatogramlarına bakıldığında, 1:20 MPEG:ε-CL oranında sentezlenen MPEG-PCL diblok kopolimeri ile 1:20 MPEG:ε-CL oranında sentezlenen PEG-PCL-PEG triblok kopolimerlerinin GPC kromatogramlarında iki tane pik görülmektedir. Benzer bir şekilde, Behravesh ve ark.'nın (BEHRAVESH, 2002) yaptığı bir çalışmada MPEG oligomerleri hidrofobik polipropilen fumarat kullanılarak blok kopolimer sentezlenmiştir. Sentezlenen diblok kopolimerlerin GPC kromatogramlarında bimodal pik gözlemlenmiştir. 1:20 monomer mol oranına sahip PEG-PCL-PEG triblok kopolimerin polidispersite indeksi ($M_w/M_n=51.33$) oldukça yüksek gözlemlenirken

1:100 ve 1:200 monomer mol oranına sahip PEG-PCL-PEG triblok kopolimerlerin polidispersite indeksleri daha düşük değerlerde gözlemlenmiştir ($M_w/M_n = 4.1$ ve 3.75). Polidispersite indeksi, polimerin zincir uzunluklarının birbirine ne kadar yakın olduğunun bir göstergesidir ve bu değer 1'e eşit olması polimer zincirlerinin aynı uzunlukta olduğunu göstermektedir. Polidispersite indeksi 1.1'den küçük polimerlerin ancak özel teknikler kullanılarak sentezlenmesi karşın, genelde biyomalzeme yapımında kullanılan ticari polimerler 1.5 – 50 aralığında polidispersite indeksine sahiptir (RATNER, 2004). Sentezlenen 1:200 monomer oranına sahip PEG-PCL-PEG triblok kopolimerinin molekül ağırlığı (M_w : 22 000 Da) IgG ve anti-TNF yüklü PCL mikrokürelerin hazırlanmasında kullanılan ticari bir polimer olan PCL'in molekül ağırlığına (M_w : 65 000 Da) oranla daha düşük olduğu bulunmuştur. Mikroküre taşıma sistemlerinde, polimerin molekül ağırlığı polimerin bozunma süresini ve ilaç salım hızını etkilemektedir (YANG, 2004). Bu nedenle, sentezlenen düşük moleküler ağırlığa sahip PEG-PCL-PEG triblok kopolimeri ile hazırlanan mikrokürelerin bozunma süresinin PCL mikrokürelerin bozunma süresinden daha kısa olabileceği düşünülmektedir. Lee ve ark.'nın (LEE J.W., 2001) yaptığı bir çalışmada PEG ve PCL kullanılarak sentezlenen çok bloklu (multiblok) kopolimerlerinin reaksiyon süresi uzadıkça moleküler ağırlığının arttığı gözlemlenmiştir. PEG-PCL-PEG kopolimerinin sentez parametrelerinden süre değiştirilerek yeniden 1:200 MPEG: ϵ -CL monomer oranına sahip daha yüksek moleküler ağırlığa sahip PEG-PCL-PEG triblok kopolimeri (M_w 47 038 Da) yeniden sentezlenmiştir ve bu kopolimer IgG veya anti-TNF α yüklü PEG-PCL-PEG mikrokürelerin hazırlanmasında kullanılmıştır. Ayrıca, sentez parametrelerinden süre değiştirilerek yeniden sentezlenen 1:200 MPEG: ϵ -CL monomer oranına sahip PEG-PCL-PEG triblok kopolimerinin polidispersite indeksinin (3.35) daha kısa sürede sentezlenen 1:200 MPEG: ϵ -CL monomer oranına sahip PEG-PCL-PEG triblok kopolimerinin polidispersite indeksinden (3.75) daha düşük olduğu gözlemlenmiştir.

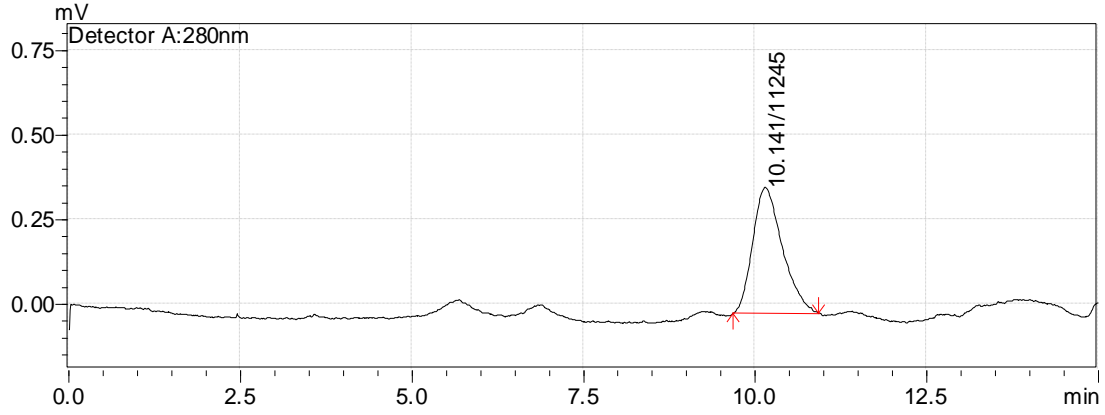
Aşama 2: Model Protein Immunoglobulin G (IgG) Yüklü Polikaprolakton (PCL) ve Polietilen glikol-Polikaprolakton-Polietilen glikol (PEG-PCL-PEG) Mikrokürelerin Hazırlanması ve Karakterizasyonu

Aşama 2.1. Model Protein IgG Yüklü PCL Mikrokürelerin Hazırlama Koşullarının Optimizasyonu ile İlgili Bulgular

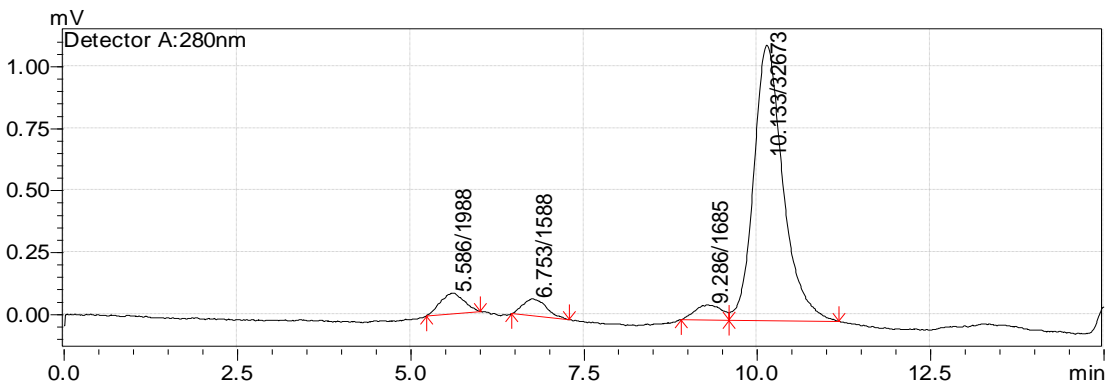
Model protein IgG yüklü mikrokürelerinin hazırlanmasında kullanılan yöntemin optimizasyonu için, yüklenen IgG konsantrasyonu ve dış su fazı polivinil alkol (PVA) derişimi ve dış faza tuz eklenmesi gibi çeşitli parametreler değiştirilerek protein yükleme verimliliğine etkileri incelenmiştir. Protein yükleme verimliliği, özellikle pahalı biyoaktif ajan taşıyıcı sistemlerinin geliştirilmesi için önemli bir parametredir. Sistemin etkinliği bu parametrenin artması ile bağlantılıdır (PARK, 2005) ve kullanılan hazırlama koşullarıyla değişmektedir (MUKERJEE, 2007). Protein yükleme verimliliği, kullanılan yöntemin etkinliğini belirlemenin yanı sıra in vitro deney koşullarında ortama salınacak toplam protein miktarının hesaplanmasında ve in vivo çalışmalarda doz belirlenmesinde de önemli bir parametredir. Bu sebeple, protein yüklü mikrokürelerin hazırlanmasında kullanılacak prosedürün belirlenmesi için ilk önce hazırlanan IgG yüklü PCL mikrokürelerin protein yükleme verimlilikleri karşılaştırılmıştır. Projenin ilk aşamalarında, PCL mikrokürelere yüklenen IgG miktarının HPLC yöntemiyle tayin edilmiştir. Mikrokürelere ekstrakte edilen IgG miktar tayini için IgG standart çözeltilerinin HPLC kromatogramlarının tepe alanları hesaplanarak kalibrasyon eğrisi oluşturulmuştur (Şekil 12). Ayrıca, IgG yüklü PCL mikroküre hazırlanmasında kullanılan metodun proteinin kararlılığına etkisini incelemek için diklorometan ile inkübe edilen IgG çözeltisinin HPLC kromatogramı (Şekil 13A) 40 ug/ml standart IgG çözeltisinin HPLC kromatogramı (Şekil 13B) ile karşılaştırılmıştır. Alıkonma sürelerinde bir değişiklik olmaması ve kromatogramda yeni tepelerin oluşmaması IgG yapısının mikroküre hazırlama yöntemi süresince herhangi bir yapısal bir değişime uğramadığını göstermektedir.



Şekil 12. HPLC yöntemi ile IgG kantitatif tayini için oluşturulan kalibrasyon eğrisi



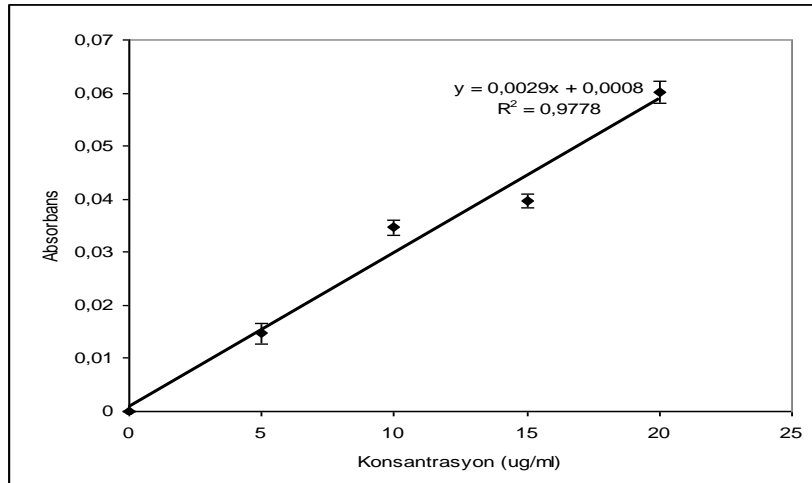
(A)



(B)

Şekil 13. Diklorometan ile inkübe edilen IgG çözeltisinin (10 ug/ml) (A) ve 40 ug/ml IgG standart çözeltisinin (B) HPLC kromatogramı

HPLC yöntemi proteinin yapısının korunduğunu göstermesine karşın, mikrokürelere hapsedilen IgG miktarının tayininde başarılı olamamıştır. Proteinin mikrokürelere ekstraksiyonunda kullanılan diklorometanın polimer matriksinde polimer zincirlerini açmakta yeterli olmadığı ve PBS fazına okuma yapabilecek miktarda proteinin çıkmadığı gözlemlenmiştir. Literatürde, PLGA mikrokürelere hapsedilmiş üç farklı proteinin miktar tayini için proteinlerin organik fazdan diklorometan ile ekstraksiyon yöntemi ile polimer matriksin bir bazla hidrolizi sonrası sodyum dodesil sülfat (SDS) ile ekstraksiyonu yöntemi karşılaştırılmıştır (SHARIF, 1995). Diklorometan ile ekstraksiyon yönteminde organik fazdan su fazına proteinin tam olarak geçmediği ve bu nedenle protein miktarının tam olarak ölçülemediği gözlemlenmiştir. Benzer bir şekilde, daha önceki bir çalışmada da bu yöntemin PLA ve PLGA mikrokürelere hapsedilen IgG proteinini tayin etmede başarısız olduğu gösterilmiştir (WONG, 2001). Bu nedenle, hapsedilen IgG miktarını bulmak için polimer matriksin bir bazla hidrolizi sonrası proteinin SDS ile ekstraksiyonu yöntemi modifiye edilerek denenmiştir. Bu yöntem için protein yükleme verimliliğinin, hesaplanmasında kullanılan kalibrasyon eğrisi Şekil 14'te verilmiştir. Mikrokürelere hazırlama aşamasında yüklenen IgG konsantrasyonunun, dış su fazı PVA konsantrasyonunun ve dış faza tuz eklenmesinin protein yükleme verimliliğine etkileri incelenmiştir (Tablo 9).



Şekil 14. BCA Analizi ile protein yükleme verimliliği bulunması için kullanılan IgG kalibrasyon eğrisi

Tablo 9. Farklı hazırlama yöntemleriyle hazırlanmış IgG yüklü PCL mikrokürelerin protein yükleme verimliliğinin karşılaştırılması

Gruplar (Bkz. Tablo 5)	Protein Yükleme Verimliliği (%) (n=3)
Grup I	33.08 ± 4.06
Grup II	38.19 ± 2.10
Grup III	31.72 ± 3.07
Grup IV	32.39 ± 5.32
Grup V	37.38 ± 2.08
Grup VI	37.22 ± 4.03
Grup VII	54.03 ± 1.32

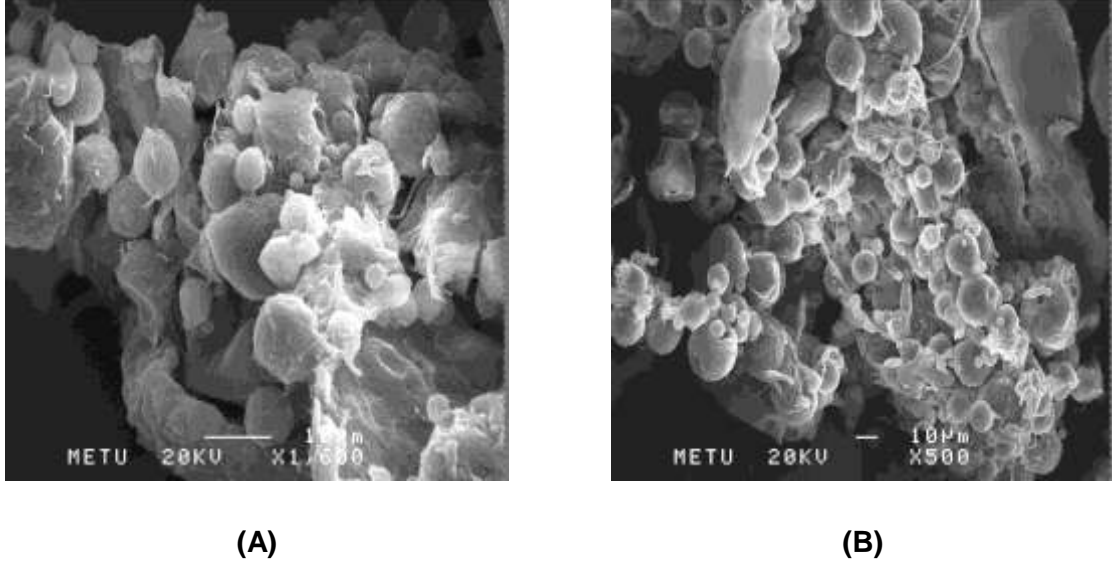
5 mg/ml IgG yüklü PCL mikroküreler (Grup II) ve dış faza %2'lik NaCl eklenerek hazırlanan 10 mg/ml IgG yüklü PCL mikroküreler (Grup V) aynı yöntemle hazırlanan diğer gruplara (Grup I, III ve IV) göre en yüksek protein yükleme verimliliğini göstermiştir. Sulu çözelti halindeki proteinler dış etkenlere karşı oldukça hassastırlar. Bu nedenle, protein yüklü mikrokürelerin hazırlanması sırasında proteinin hapsedme koşullarından etkilenmemesi için iç su fazına belli bir miktar NaCl eklenmiştir. Literatürde, iç su fazına tuz eklenmesi iç su fazındaki ozmotik basıncı artırarak proteinin iç su fazından dış su fazına kaçmasına neden olduğu gözlenmiştir (PISTEL, 2000) ve hapsedme verimliliğini düşürmüştür. Dış su fazına protein kaçmasını önlemek için, Grup V'te %2'lik NaCl dış faza eklenmiştir. Böylece, protein yükleme verimliliği bu grupta diğer gruplara oranla artmıştır. Daha önceki çalışmalardan da görülebileceği gibi, dış fazın iyonik şiddetindeki artış proteinlerin dış faza göçünü engelleyerek yükleme verimliliğini arttırmıştır (PISTEL, 2000,ZHANG, 2004). Protein hapsedme verimliliği mikroküre hazırlama basamağındaki deney koşullarına bağlıdır. Bu koşullardan bazıları (iç faz hacmi, polimer konsantrasyonu, dış faz PVA konsantrasyonu ve dış faza tuz eklenmesi) çalışmanın önceki aşamalarında optimize edilmiştir. Bu optimizasyon işlemlerine rağmen IgG yüklü mikrokürelerin protein hapsedme verimliliği büyük ölçekte mikroküre üretimi için yeterli değildir (% 38.19 ± 2.10). Protein hapsedme verimliliğini büyük ölçüde etkileyen bir diğer parametre de emulsiyonun karıştırma hızıdır (DEVINENI, 2007). Literatürdeki mikroküre çalışmaları incelendiğinde, yüksek devirde (8000-14 000 rpm) mekanik karıştırıcı kullanılarak hem yüksek protein hapsedme verimliliği (% 63-99.6) hem de daha küçük boyutlarda mikroküre (5-21 µm)

taşıma sistemleri hazırlandığı bulunmuştur (YOUAN, 1999, MORITA, 2000, PISTEL, 2000, SAEZ, 2008). Ayrıca, IgG yüklü PCL mikroküreleri hazırlamada kullanılan iki basamaklı emülsiyon-çözücü uçurma yönteminde birinci basamaktaki emülsiyonun (yağ fazında su emülsiyonu) kararlılığı da protein hapsedme verimliliğini etkilemektedir (YEO, 2004). Birinci basamaktaki emülsiyon kararsız bir yapıda ise protein içeren iç su fazı dış su fazına karışarak protein hapsedme verimliliğinin düşmesine neden olmaktadır. Bu emülsiyonun kararlılığını arttırmak için sığır serum albumin (BSA), polivinil alkol (PVA), Tween-80 veya Span-80 gibi çeşitli emülsiyon yapıcı ajanlar (emulsifying agent) birincil emülsiyona eklenmektedir (YEO, 2004). Bu sebeple, daha etkin bir hapsedme verimliliğine ulaşabilmek için yüksek devirde mekanik karıştırıcı kullanılarak ve iç su fazına PVA eklenerek mikroküreler hazırlanmıştır. Ayrıca, daha önceki denemelerde yüksek verimlilik gösteren iç fazda 5 mg/ml protein konsantrasyonu olan (Grup II, %38.19 ± 2.1 yükleme verimliliği) ve dış faza %2'lik NaCl eklenerek hazırlanan mikroküreler (Grup V, %37.38 ± 2.08 yükleme verimliliği) göz önüne alınmıştır. Hapsedilen IgG miktarı, daha önce bahsedilen polimer matriksin NaOH ile hidrolizi sonrası proteinin SDS ile ekstraksiyonu yöntemi ile belirlenmiştir. İç faza %0.5'lik PVA dış faza ise %2'lik NaCl eklenerek mekanik karıştırıcı ile 14 000 devirde karıştırılarak hazırlanan mikrokürelerde protein yükleme verimliliğinde bir artış gözlemlenmemiştir. Buna karşın, iç faza %0.5'lik PVA eklenerek mekanik karıştırıcı ile 14 000 rpm'de karıştırılarak hazırlanan mikrokürelerde oldukça yüksek protein yükleme verimliliği gözlenmiştir (Grup VII, % 54.0 ± 1.32) (Tablo 9). Bu koşulların projenin devamında IgG yüklü mikrokürelerin hazırlanmasında kullanılmasına karar verilmiştir.

Aşama 2.2. Model Protein IgG Yüklü PEG-PCL-PEG Mikrokürelerin Hazırlama Koşullarının Optimizasyonu ile İlgili Bulgular

Projenin ilk aşamalarında, sentezlenen 1:20, 1:100 ve 1:200 gibi farklı MPEG: ε-CL monomer mol oranlarına sahip PEG-PCL-PEG triblok kopolimerleri kullanılarak model protein IgG yüklü PEG-PCL-PEG mikroküreler hazırlanmasında kullanılacak kopolimer olarak belirlenmiştir. Sentezlenen 1:20 MPEG: ε-CL monomer mol oranlarına sahip PEG-PCL-PEG triblok kopolimerinin sudaki çözünürlüğünün fazla olması nedeniyle bu kopolimer protein yüklü PCL mikroküreler hazırlanamamıştır. Bu nedenle, MPEG: ε-CL mol oranı 1:100'e ve 1:200'e değiştirilerek yapının daha hidrofobik olması sağlanmış ve iki basamaklı emülsiyon-çözücü

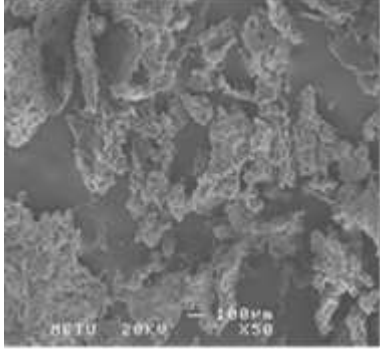
uçurma yöntemi ile IgG yüklü taşıyıcı sistemler hazırlanmış ve hazırlanan taşıyıcı sistemler SEM analizi ile incelenmiştir (Şekil 15).



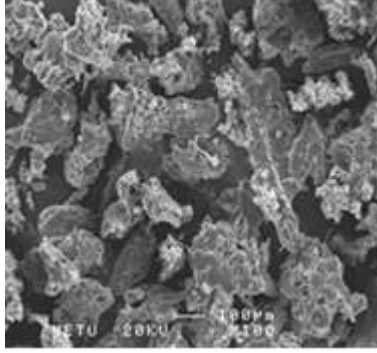
Şekil 15. A) 1:100 MPEG: ϵ -CL monomer mol oranına sahip PEG-PCL-PEG kopolimer kullanılarak; B) 1:200 MPEG: ϵ -CL monomer mol oranına sahip PEG-PCL-PEG kopolimeri kullanılarak hazırlanan IgG yüklü PEG-PCL-PEG taşıyıcı sistemlerin SEM görüntüleri

1:200 monomer oranına sahip PEG-PCL-PEG triblok kopolimeri kullanılarak hazırlanan protein yüklü PEG-PCL-PEG taşıyıcı sistemin çoğunlukla küre formunda olduğu gözlenmiştir. Ancak, 1:100 monomer oranına sahip PEG-PCL-PEG triblok kopolimeri kullanılarak hazırlanan protein yüklü PEG-PCL-PEG taşıyıcı sisteminde düzgün küreler oluşmadığı ve daha çok büyük şekilsiz agregatların oluştuğu görülmüştür. 1:200 monomer oranına sahip PEG-PCL-PEG triblok kopolimeri kullanılarak hazırlanan taşıyıcı sistemin ise homojen bir dağılıma sahip olmadığı halde çoğunlukla küre formunda olduğu görülmüştür. Aşama 1'de de belirtildiği gibi homojen bir dağılımın gözlemlenmemesinin nedeninin mikrokürelerin hazırlanmasında kullanılan organik çözücünün kopolimeri etkin bir şekilde çözmemesi olduğu düşünülmektedir. Çözünemeyen kopolimer parçalarının mikroküre hazırlama basamağı sırasında agregat oluşumuna neden olmaktadır. Ayrıca, sentezlenen 1:200 monomer oranına sahip PEG-PCL-PEG triblok kopolimerinin molekül ağırlığı (M_w 22 000) projenin ilk aşamalarında IgG ve anti-TNF yüklü PCL mikrokürelerin hazırlanmasında kullanılan ticari bir polimer olan PCL'in molekül

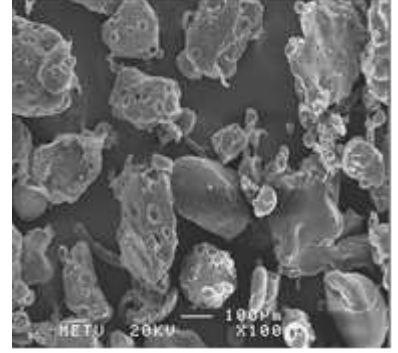
ağırlığına (Mw 65 000) oranla daha düşük bulunmuştur ve bu kopolimer kullanılarak hazırlanan mikrokürelerin bozunma süresinin PCL mikrokürelerin bozunma süresinden daha kısa olabileceği düşünülmektedir. Önceki bir çalışmada da belirtildiği gibi PEG-PCL kopolimerin Mw değeri oluşan mikrokürelerin şekline büyük ölçüde etki ettiği ve çözücü uçurma yönteminde, yüksek Mw değerine sahip kopolimerlerin düzgün mikroküre oluşmasında düşük Mw değerine sahip kopolimere oranla daha etkin olduğu gözlemlenmiştir (ZHOU, 2003). Bu nedenlerle, 1:200 MPEG:ε-CL monomer oranına sahip PEG-PCL-PEG kopolimerinin sentez parametrelerinden süre değiştirilerek PEG-PCL-PEG triblok kopolimeri yeniden sentezlenmiş ve model protein IgG yüklü PEG-PCL-PEG mikroküreler hazırlanmıştır. Protein yüklü PEG-PCL-PEG mikrokürelerin hazırlanmasında kullanılan iki basamaklı emülsiyon-çözücü uçurma (double emulsion-solvent evaporation) metodundaki organik çözücünün türü, kopolimer konsantrasyonu, organik fazın hacmi, dış fazda kullanılan surfektanın tipi ve konsantrasyonu, karıştırma basamakları ve hızları gibi çeşitli hazırlama parametreleri değiştirilerek oluşturulan taşıma sistemlerinin genel görünümleri SEM analizi ile incelenmiştir (Şekil 16). Oluşturulan deney gruplarından 4., 6. ve 9. grupta küre formunun oluşumu daha belirgin olarak gözlemlenmiştir. Fakat, Grup 4 ve 6'da daha az homojen bir dağılım olduğu için IgG yüklü PEG-PCL-PEG mikrokürelerin Grup 9'un hazırlanmasında kullanılan parametreler kullanılarak hazırlanmasına karar verilmiştir.



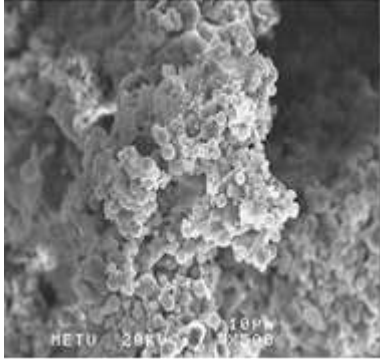
Grup 1



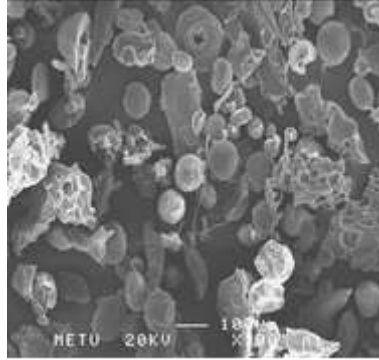
Grup 2



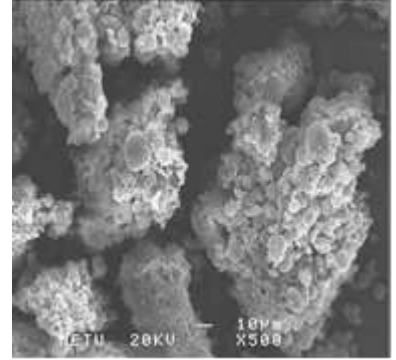
Grup 3



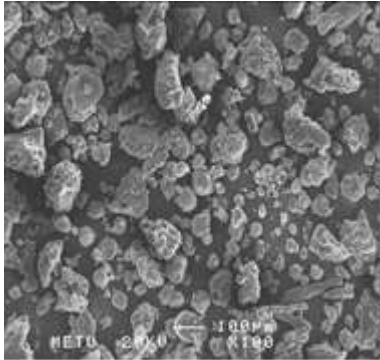
Grup 4



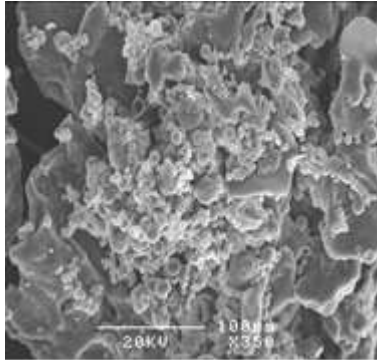
Grup 5



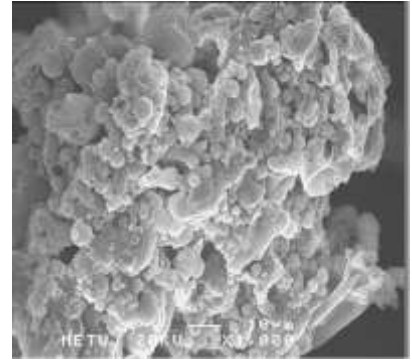
Grup 6



Grup 7



Grup 8



Grup 9

Şekil 16. Farklı koşullarla hazırlanmış IgG yüklü PEG-PCL-PEG mikrokürelerin SEM görüntüleri

Aşama 2.3. Model Protein IgG Yüklü PCL ve PEG-PCL-PEG Mikrokürelerin Karakterizasyonu

Mikrokürelere protein yükleme yönteminin başarısını belirleyen başlıca kriterler yüksek ilaç yükleme verimliliği, mikrokürelere protein yükleme yönteminin proteinin üç boyutlu yapısının bozulmasına neden olmaması ve mikrokürelere öngörülebilir bir protein salımının gerçekleşmesidir.. Gama sterilizasyonu sonrasında, model protein IgG yüklü PCL veya PEG-PCL-PEG mikrokürelerin karakterizasyon parametreleri gama sterilizasyonu yapılmamış mikrokürelerin karakterizasyon parametreleri ile karşılaştırılmıştır.

2.3.1. Protein Yükleme Verimliliği

Model protein IgG yüklü mikroküreler hazırlandıktan sonra, pahalı biyoaktif ajan taşıyıcı sistemlerin gelişmesinde önemli bir parametre olan protein yükleme verimliliği incelenmiştir. In vitro deney koşullarında ortama salınacak toplam proteinin hesaplanmasında protein yükleme verimliliği parametresinden yararlanılacaktır. PCL veya PEG-PCL-PEG mikrokürelere hapsedilen IgG protein miktarının belirlenmesi için BCA metodu kullanılmıştır. Protein miktarlarının belirlenmesinde kullanılan ve belirli konsantrasyonlarda IgG standart çözeltileri ile oluşturulmuş kalibrasyon eğrisi Aşama 2.1 Şekil 14'te verilmiştir. Optimizasyon basamaklarından sonra karar verilen iki basamaklı emülsiyon- çözücü uçurma metoduyla hazırlanan model protein IgG yüklü PCL mikrokürelerin protein yükleme verimliliği % 54.0 ± 1.32 değerinde hesaplanırken IgG yüklü PEG-PCL-PEG mikrokürelerin yükleme verimliliği % 74.32 ± 3.45 değerinde hesaplanmıştır. Coccoli ve ark. (COCCOLI, 2008) iç faza PVA eklenerek iki basamaklı emülsiyon- çözücü uçurma metoduyla hazırlanan BSA yüklü PCL mikrokürelerde farklı hazırlama parametreleriyle %29.1'den %62.9'a değişen değerlerde protein yükleme verimlilikleri gözlemlenmiştir. Başka bir çalışmada, iki basamaklı emülsiyon- çözücü uçurma metoduyla hazırlanan insulin yüklü PCL mikrokürelerin protein yükleme verimliliklerinin hazırlama koşullarına bağlı olarak %28.3 ile % 53 aralığında değiştiği gösterilmiştir (MUKERJEE, 2006).

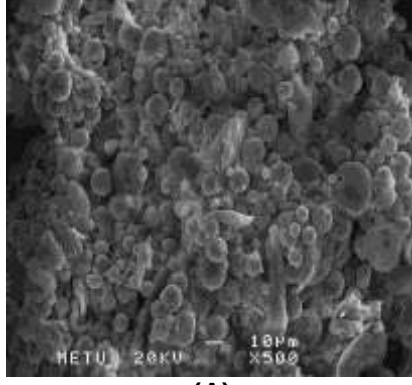
Her iki mikroküre türünde de gama sterilizasyonu sonrasında protein yükleme verimliliğinde herhangi bir değişim olmamıştır. Bu sterilizasyon yöntemi kuru bir ortamda

yapıldığından yüklenen proteinler yapıdan uzaklaşmamaktadır ve yüklenen protein miktarında bir değişim olmamaktadır. Önceki çalışmalara bakıldığında da gama sterilizasyonu sonrasında yüklenen protein miktarında herhangi bir değişim olmadığı gözlemlenmiştir (CALIS, 2002,CARRASCOSA, 2003,FERNANDEZ-CARBALLIDO, 2004).

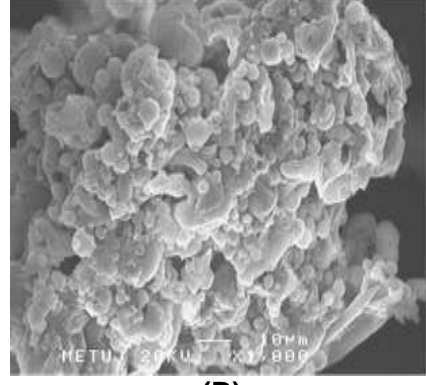
Hazırlanan model protein IgG yüklü PEG-PCL-PEG mikrokürelerin yükleme verimliliği (%74.32 ± 3.45) IgG yüklü PCL mikrokürelerin protein yükleme verimliliğinden (%54 ± 1.32) belirgin olarak yüksek yüksek çıkmıştır. Zhou ve ark. yaptığı bir çalışmada (ZHOU, 2003), çeşitli monomer oranlarında sentezlenen PEG-PCL kopolimerleri ile hazırlanan mikrokürelere ve PCL mikrokürelere model protein olarak insan serum albumin yüklenmiş ve mikrokürelerin boyut ve protein yükleme verimlilikleri incelenmiştir. Elde edilen sonuçlara göre, PCL mikrokürelerin yükleme verimliliği %25.8 olarak gözlemlenirken PEG-PCL kopolimerleri ile hazırlanan mikrokürelerin yükleme verimlilikleri %35.4 ile %50.1 aralığında değişmiştir. Elde ettikleri sonuçlara göre, PEG-PCL kopolimerleri ile hazırlanan mikrokürelerin protein yükleme verimliliklerindeki artışın yapıya dahil olan hidrofilik PEG segmentinin hidrofobik polimer ve protein arasındaki etkileşimi geliştirmesi sonucu gözlemlendiğini sonucuna varmışlardır. Diğer bir çalışmada da, çeşitli oranlarda sentezlenen MPEG-PCL diblok kopolimerleri PCL polimeri ile karıştırılarak cytarabin yüklü mikroküreler hazırlanmıştır (DIAB, 2010). Hazırlanan bu mikrokürelerin protein yükleme verimlilikleri PCL mikrokürelerin yükleme verimliliği ile karşılaştırıldığında, MPEG-PCL eklenerek hazırlanan PCL mikrokürelerin yükleme verimliliği %1.57-13.5 aralığında gözlemlenirken PCL mikrokürelerin yükleme verimliliği %1.3 civarında gözlemlenmiştir. İki basamaklı emülsiyon yöntemiyle hazırlanan mikrokürelerin yapısında bulunan MPEG segmenti iç su fazına doğru dönerek polimer matriksin hidrofiliğini azaltmış ve hidrofilik yapıda olan proteinlerin polimer yapının iç kısmına doğru gitmesine neden olmuştur.

2.3.2. Yüzey Morfolojisi

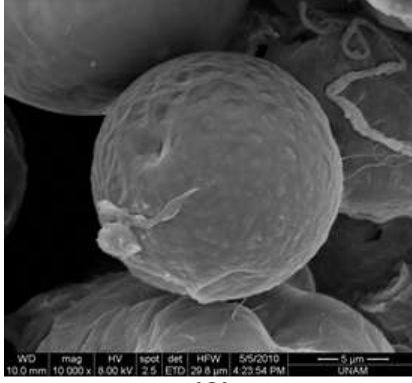
SEM analizi sonucunda, hazırlanan IgG yüklü PCL mikrokürelerin küre şeklinde homojen bir dağılıma sahip oldukları gözlemlenmiştir. Ayrıca, hazırlanan mikrokürelerin gözeneksiz bir yüzeye sahip oldukları görülmüştür (Şekil 17A,17C ve 17D). Gama sterilizasyonu yapılmış ve yapılmamış IgG yüklü PCL mikrokürelerin yüzey morfoloji özellikleri incelendiğinde yüzey morfoloji özelliklerinde belirgin bir değişikliğe rastlanmamıştır (Şekil 17C ve 17D). Hazırlanan IgG yüklü PEG-PCL-PEG mikrokürelerin küre şekline sahip oldukları gözlemlenmiştir (Şekil 17B, 17E ve 17F). Gama sterilizasyonu yapılmış ve yapılmamış PEG-PCL-PEG mikrokürelerin yüzey morfolojileri incelendiğinde ise yine belirgin bir değişikliğe rastlanmamıştır (Şekil 17E ve 17F). Literatürdeki bir çalışmada benzer şekilde gama ışımalarının IGF-I (insulin like growth factor) yüklü PLGA mikrokürelerin yüzey morfoloji özelliklerinde herhangi bir değişime neden olmadığı gözlenmiştir (CARRASCOSA, 2003). Carballido ve ark.nın (FERNANDEZ-CARBALLIDO, 2004) yaptığı benzer bir çalışmada gama sterilizasyonu sonrasında ibuprofen yüklü PLGA mikrokürelerin yüzey morfoloji özelliklerinde yüzey morfolojisi özelliklerinde herhangi bir değişime rastlanmamıştır.



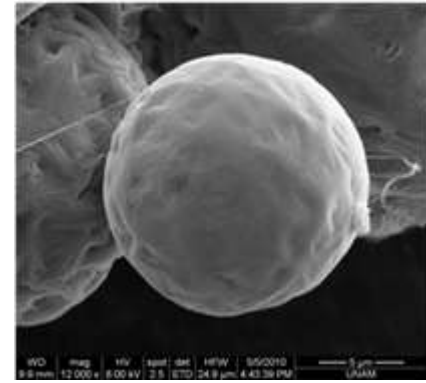
(A)



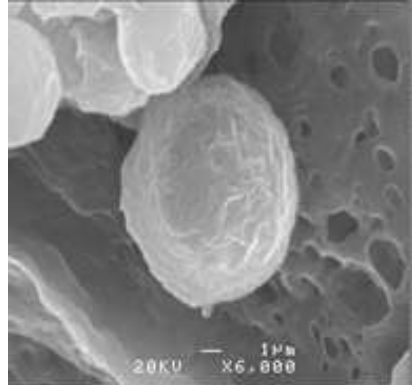
(B)



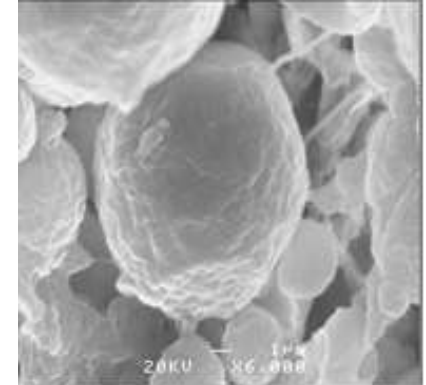
(C)



(D)



(E)



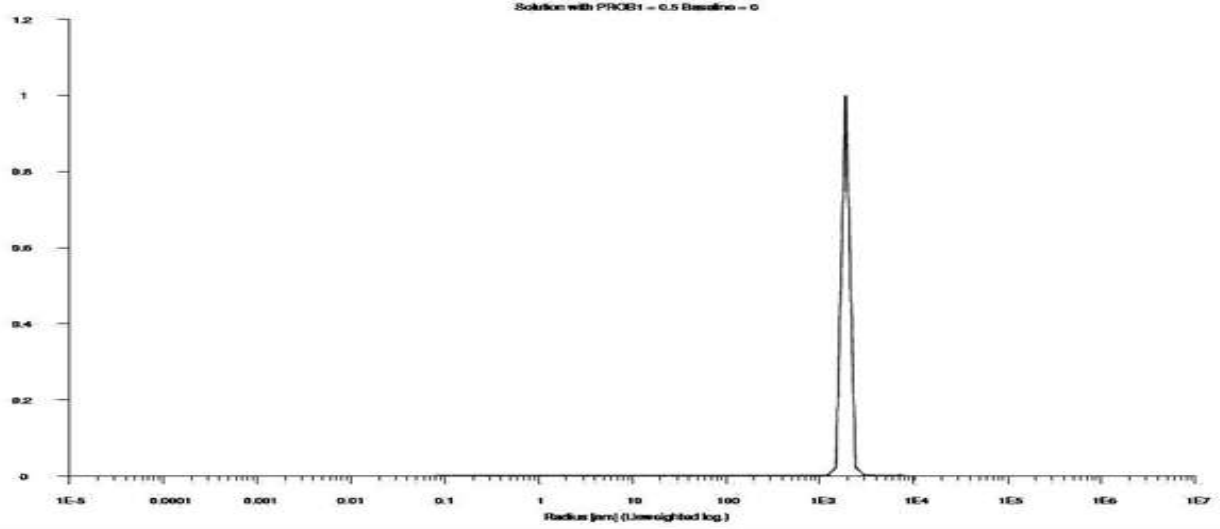
(F)

Şekil 17. Hazırlanan IgG yüklü PCL ve PEG-PCL-PEG mikrokürelerin SEM görüntüleri A) Gama sterilizasyonu yapılmamış PCL mikrokürelerin genel görüntüsü; B) Gama sterilizasyonu yapılmamış PEG-PCL-PEG mikrokürelerin genel görüntüsü; C) Gama sterilizasyonu yapılmamış PCL mikrokürenin yüzey görüntüsü; D) Gama sterilizasyonu yapılmış PCL mikrokürenin yüzey görüntüsü; E) Gama sterilizasyonu yapılmamış PEG-PCL-PEG mikrokürelerin yüzey görüntüsü; F) Gama sterilizasyonu yapılmış PEG-PCL-PEG mikrokürelerin yüzey görüntüsü

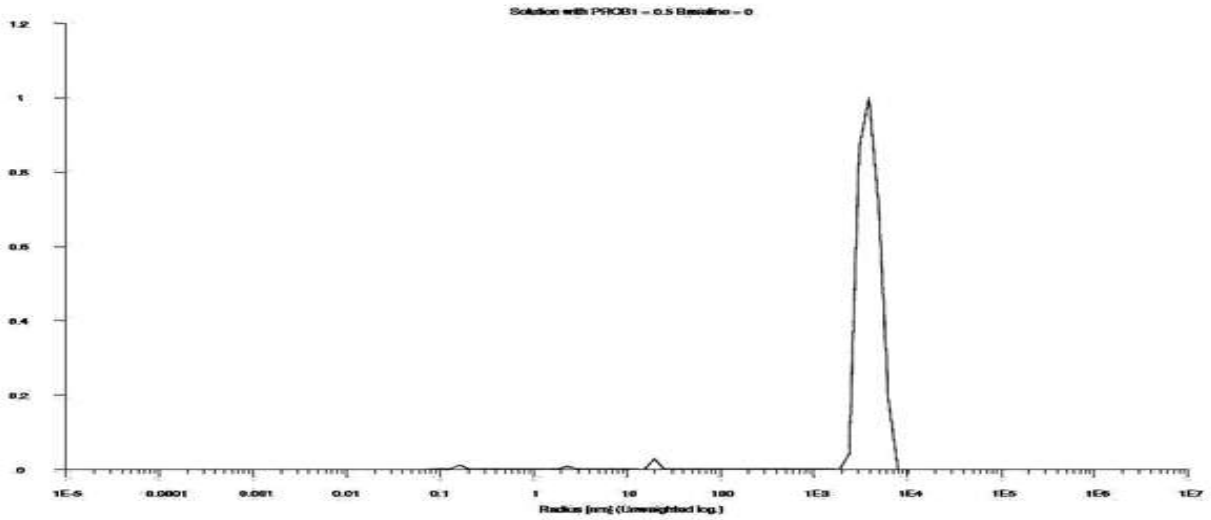
2.3.3. Boyut Analizi

Gama sterilizasyonunun, hazırlanan model protein (IgG) yüklü PCL ve PEG-PCL-PEG mikrokürelerin parçacık boyutu ve boyut dağılımına etkisi incelenmiştir. Projenin ilk dönemlerinde, IgG yüklü PCL mikrokürelerin gama sterilizasyonu öncesinde ve sonrasında ortalama parçacık büyüklüğü dinamik ışık saçılım spektrofotometresi (DLS) kullanılarak ölçülmüştür (Şekil 18). Bu analiz sonucunda, gama sterilizasyonu sonrasında mikrokürelerin boyutunda bir artış görülmüştür. Gama ışınması ile sterilizasyon yapılmamış mikrokürelerin boyutları 1,484 – 2,397 µm aralığında değişirken gama ışınması ile sterilizasyon yapılmış mikrokürelerin boyutları 2.389 – 6,236 µm aralığında değişmektedir. Bu artışın, gama sterilizasyonu sonrası agregat oluşumuna bağlı olarak gözlemlendiği düşünülmüştür. Montanari ve ark. (MONTANARI, 1996)yaptığı bir çalışmada da, 25 kGy gama ışınması ile sterilize edilen PLGA mikrokürelerin ortalama çapları gama ışınmasından sonra % 80 oranında artmıştır ve bu artışın mikrokürelerin ışınma sırasında agregat oluşturmasına bağlı olduğu gösterilmektedir. Fakat, hazırlanan IgG yüklü PCL mikrokürelerin gama öncesi ve sonrası SEM görüntüleri karşılaştırıldığında (Şekil 17) gama sterilizasyonu öncesindeki mikroküre boyutlarının DLS ile ölçülen değer (1.484 - 2.397 µm) kadar düşük bir aralıkta olmadığı ve gama sterilizasyonu yapılmış ve yapılmamış mikrokürelerin boyutları arasında belirgin bir fark olmadığı gözlemlenmiştir. DLS analizinde boyutun daha küçük aralıkta okunmasının nedeni, mikroküre süspansiyonundaki büyük mikrokürelerin zamanla çökmesi sonucu sadece süspansiyonda kalan daha küçük mikrokürelerin neden olduğu ışık saçılmalarının okunmasına bağlı olduğu düşünülmektedir. Bu sebeple, IgG yüklü PCL mikrokürelerin gama sterilizasyonu öncesinde ve sonrasında ortalama parçacık büyüklüğü dağılımlarındaki değişimleri incelemek için literatürde sıkça kullanılan bir diğer yöntem olan SEM görüntülerinden boyut analizi bu rapor döneminde kullanılmıştır (WU, 2009,CARPENEDO, 2010,RAJAPAKSA, 2010). Bu analiz sonucunda, mikrokürelerin parçacık boyut dağılımını göstermek için eşit aralıklarla oluşturulmuş mikroküre boyutuna karşı yüzde mikroküre oran histogram ve kümülatif mikroküre yüzde oran eğrileri oluşturulmuştur (Şekil 19). Ayrıca, hazırlanan mikrokürelere ait parçacık boyut ölçüm parametreleri de belirlenmiştir (Tablo 10). Gama ile sterilizasyonu yapılmış ve yapılmamış IgG yüklü PCL mikrokürelerin parçacık boyutları karşılaştırıldığında gama sterilizasyonu sonrasında parçacık boyutunda belirgin bir değişim olmamıştır ($p > 0.05$). Benzer şekilde, gama ile sterilizasyonu yapılmış ve yapılmamış IgG yüklü PEG-PCL-PEG mikrokürelerin parçacık boyutları karşılaştırıldığında gama sterilizasyonu sonrasında parçacık boyutunda belirgin bir

değişim olmamıştır ($p > 0.05$). Carrascosa ve ark.nın (CARRASCOSA, 2003) yaptığı benzer bir çalışmada gama sterilizasyonu sonrasında insülin-benzeri büyüme faktörü (IGF-1) yüklü PLGA mikrokürelerinin ortalama boyutunda herhangi bir değişime rastlanmamıştır.

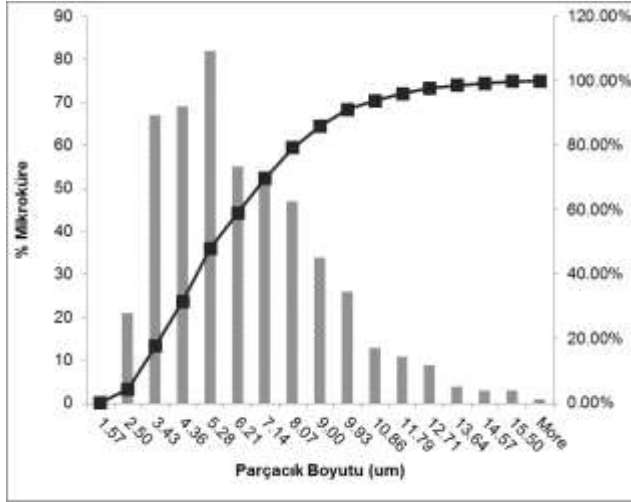


(A)

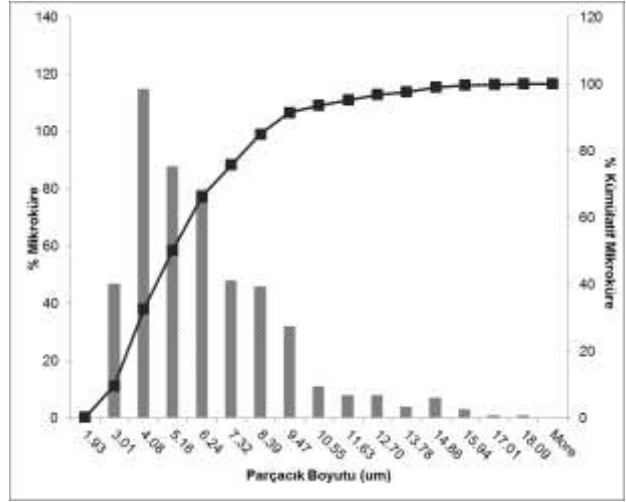


(B)

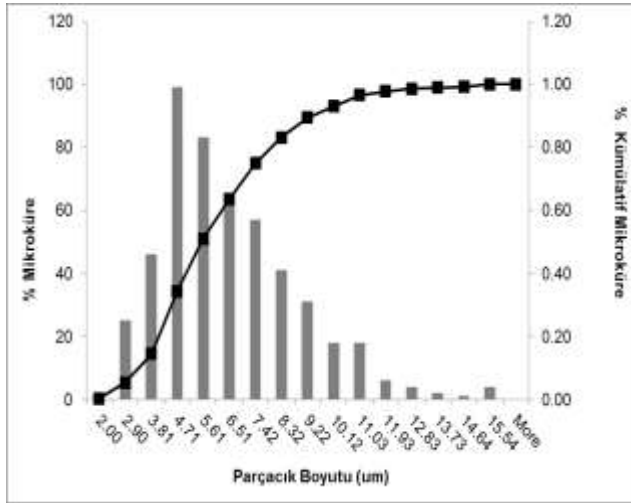
Şekil 18. IgG yüklü PCL mikrokürelerin parçacık boyut dağılımı (A) Gama sterilizasyonu yapılmamış mikroküreler, (B) Gama sterilizasyonu yapılmış mikroküreler



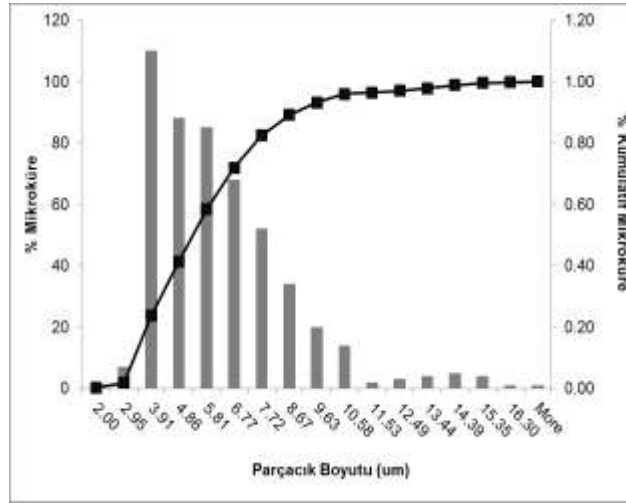
(A)



(B)



(C)



(D)

Şekil 19. Gama sterilizasyonu yapılmamış (A) ve gama sterilizasyonu yapılmış (B) IgG yüklü PCL mikroküreler ve gama sterilizasyonu yapılmamış (C) ve gama sterilizasyonu yapılmış (D) IgG yüklü PEG-PCL-PEG mikrokürelerin parçacık boyut dağılımını gösteren histogram ve %kümülatif mikroküre eğrileri

Tablo 10. Gama sterilizasyonu yapılmamış ve yapılmış IgG yüklü PCL ve PEG-PCL-PEG mikrokürelerin SEM görüntülerinden elde edilen parçacık boyut ölçüm değerleri

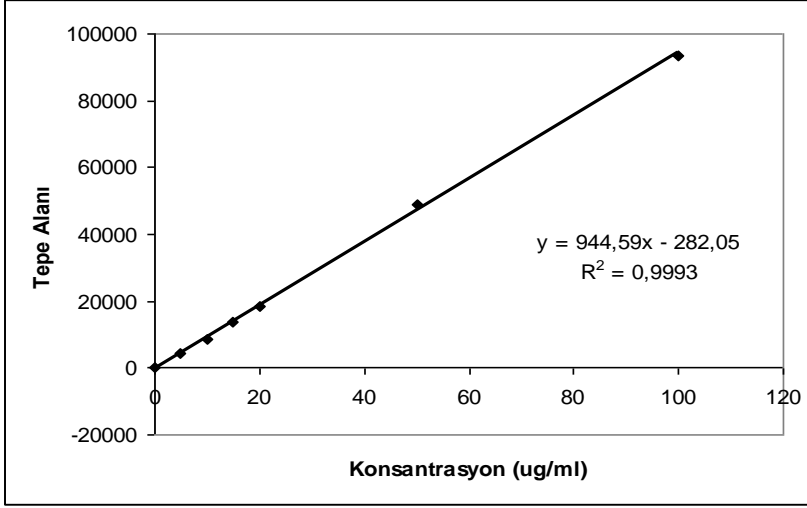
	Ortalama Parçacık Boyutu	Mod	Medyan
Gama sterilizasyonu yapılmamış IgG yüklü PCL mikroküreler	5.99 ± 0.12 µm	4.16 µm	5.41 µm
Gama sterilizasyonu yapılmış IgG yüklü PCL mikroküreler	5.79 ± 0.12 µm	3.47 µm	5.14 µm
Gama sterilizasyonu yapılmamış IgG yüklü PEG-PCL-PEG mikroküreler	6.05 ± 0.11 µm	3.88 µm	5.59 µm
Gama sterilizasyonu yapılmış IgG yüklü PEG-PCL-PEG mikroküreler	5.84 ± 0.10 µm	3.59 µm	5.34 µm

Tüm gruplar birbirinden $p \leq 0.05$ seviyesinde istatistiksel olarak farklı bulunmamıştır.

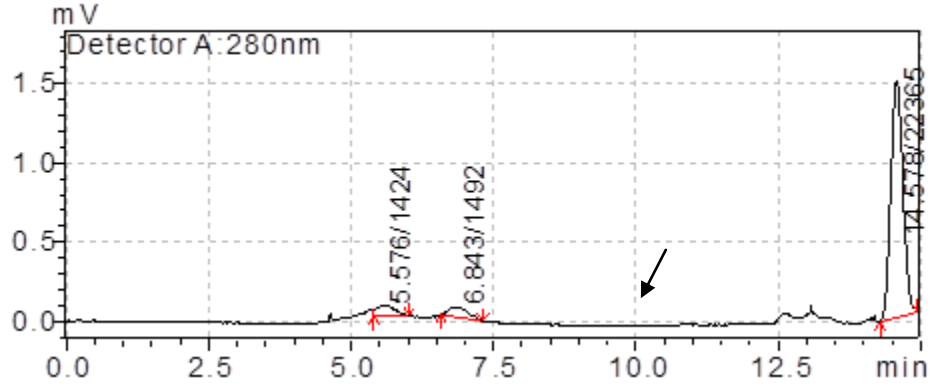
2.3.4. Salım Profili

Salım profili, proteinlerin tedavi amaçlı uygulamalarında kullanılmak üzere hazırlanan mikroküre sistemlerinin tasarımında kullanılan önemli bir parametredir. Mikrokürelerden in vitro koşullarda ortama salınan protein miktarları sistemin in vivo koşullarda davranışı için ön bilgiler sağlamaktadır. Bu projede, en az 3 ay kontrollü salım sağlayacak bir biyoaktif ajan yüklü mikroküre sistemi geliştirilmesi hedeflenmiştir. Projenin ilk zamanlarında, mikrokürelerden ortama çıkan toplam protein miktarının tayinininde yüksek performans sıvı kromatografisi (HPLC) denenmiştir. PCL mikrokürelerden ortama çıkan IgG protein miktarının HPLC yöntemi ile belirleyebilmek için belli konsantrasyonlarda, salım ortamı içinde hazırlanan IgG standart çözeltilerinin HPLC kromatogramlarındaki tepe alanları hesaplanarak kalibrasyon eğrisi oluşturulmuştur (Şekil 20). Bu kalibrasyon eğrisi oluşturulurken, 5 µg/ml IgG konsantrasyonundan yüksek konsantrasyonlarda okuma yapılabilirken 5 µg/ml IgG konsantrasyonundan düşük konsantrasyonlarda 10. dakikada beklenen IgG tepe noktası gözlemlenmemiştir (Şekil 21A). Benzer bir şekilde salım çalışmaları sonrasında incelenen örneklerde de IgG tepe noktası gözlemlenmemiştir (Şekil 21C). Ancak salım örnekleri BCA

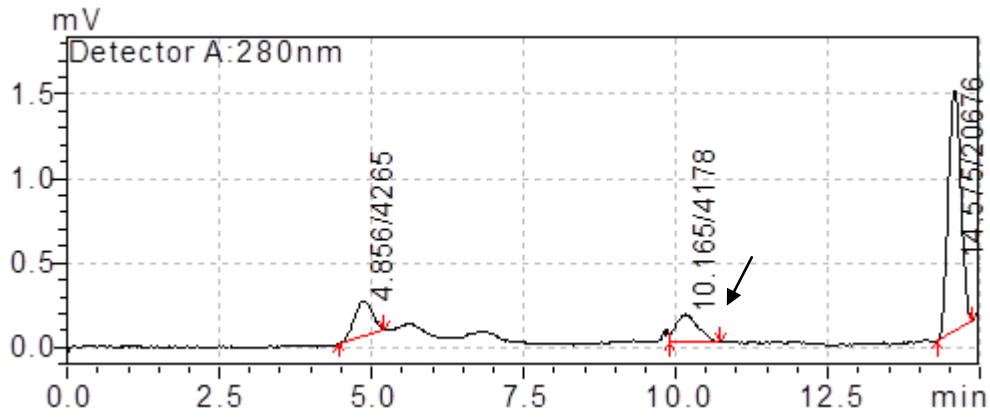
yöntemi ile incelendiğinde salım örneklerinin 5 ug/ml IgG konsantrasyonundan düşük değerlerde olduğu görülmüştür. Bu nedenle, HPLC yöntemi, projenin ilerleyen aşamalarında salım örneklerinin analizi için kullanılmamıştır.



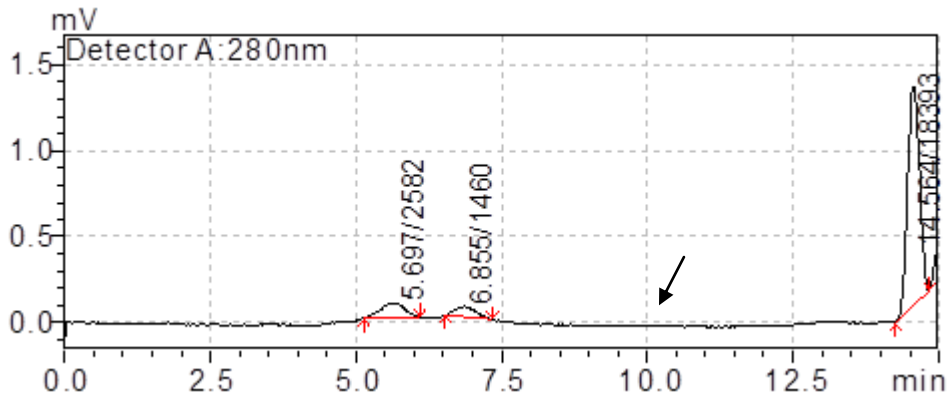
Şekil 20. Salım çalışmaları için HPLC yöntemi ile oluşturulan IgG kalibrasyon eğrisi



(A) 1 µg/ml



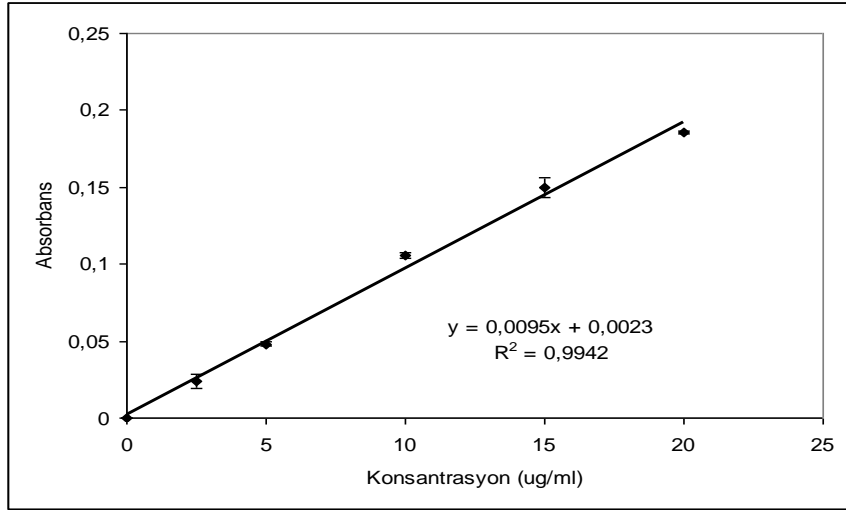
(B) 5 µg/ml



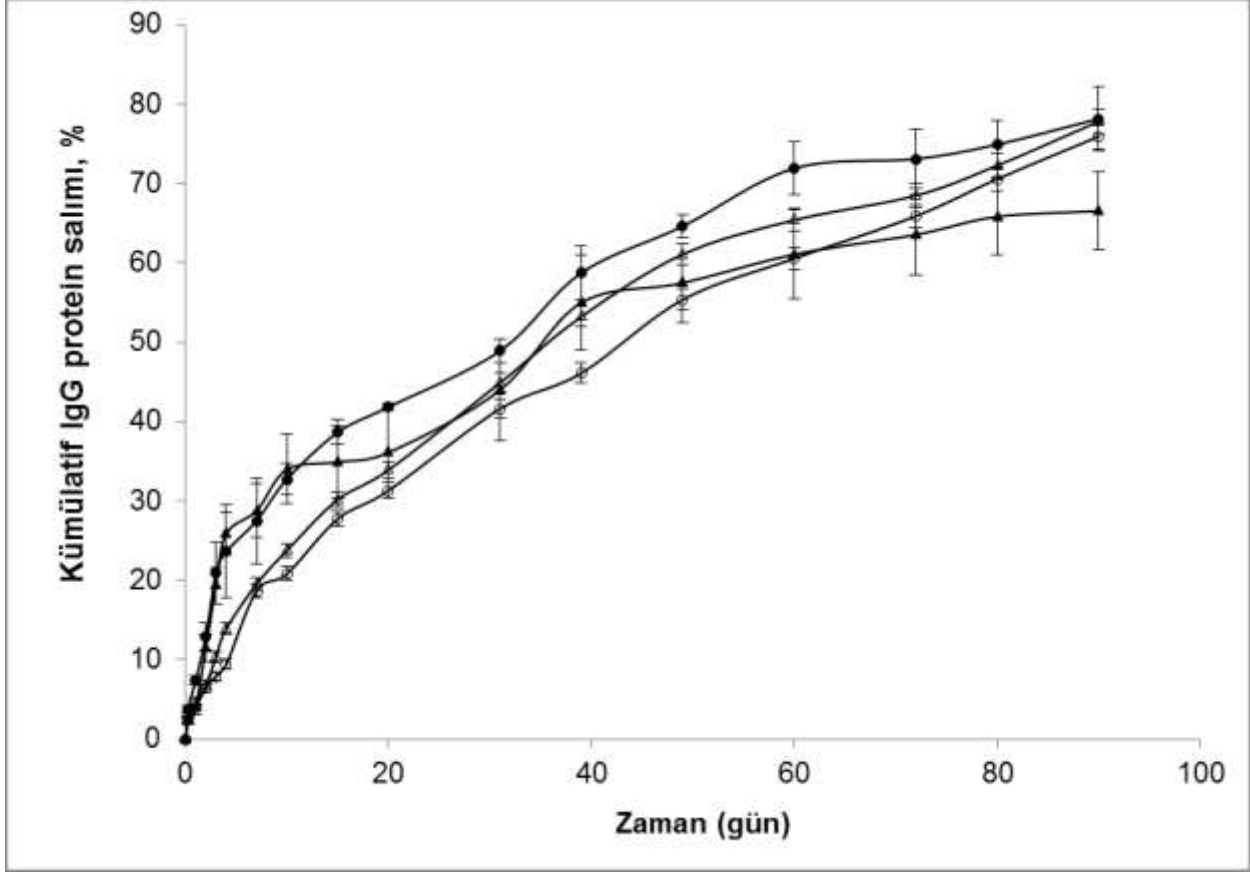
(C) Salım Örneği

Şekil 21. Farklı konsantrasyonlarda ve salım çalışması sonrası gözlemlenen HPLC kromatogramları

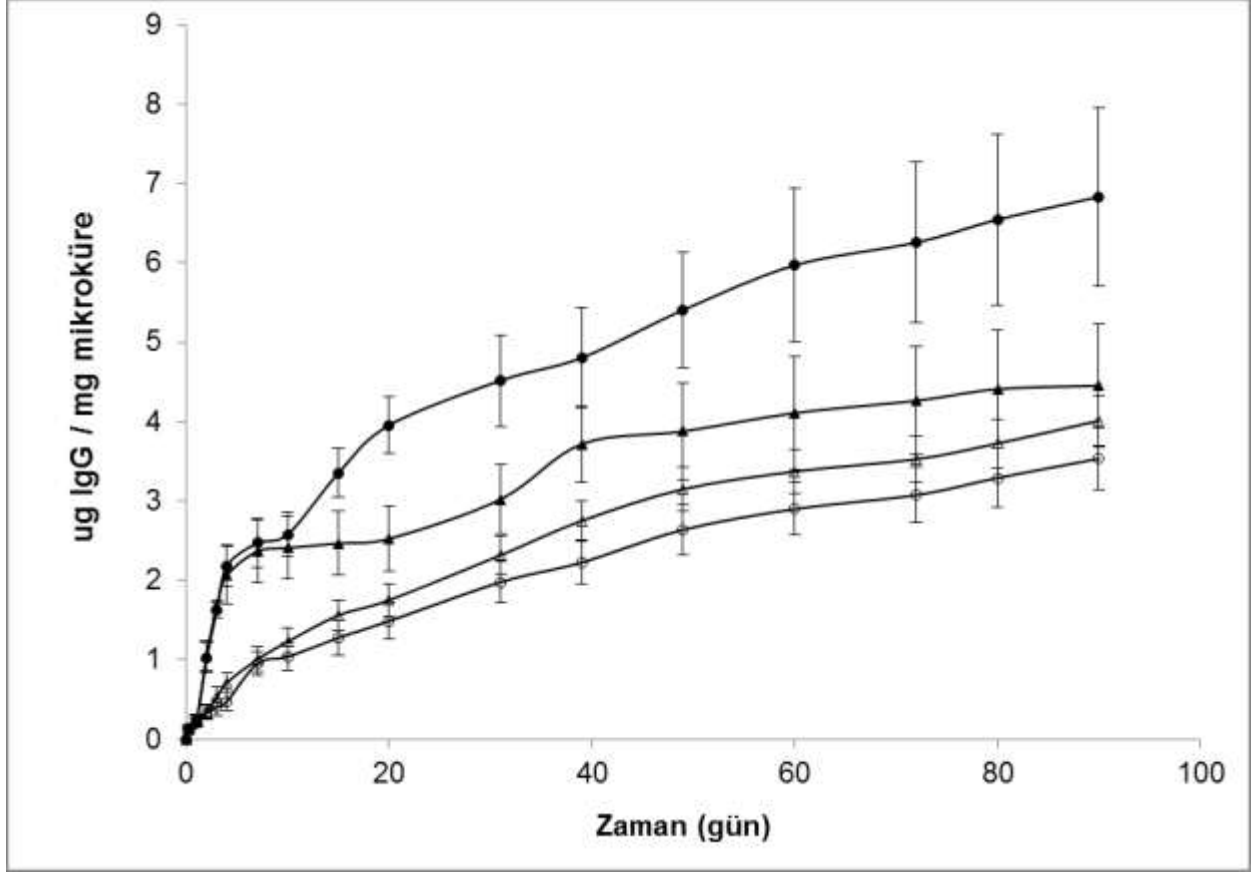
Salım çalışmaları sırasında PCL ve PEG-PCL-PEG mikrokürelerden ortama salınan IgG protein miktarını belirleyebilmek için belli konsantrasyonlarda salım ortamı içinde IgG standart çözeltileri hazırlandıktan sonra BCA metodu kullanılarak kalibrasyon eğrisi oluşturulmuştur (Şekil 22). Ortama salınan protein miktarları mikrokürelerin BCA yöntemiyle belirlenen protein yükleme verimliliğine bölünerek salım sırasında ortama çıkan %kümülatif protein miktarları belirlenmiştir (Şekil 23). Ayrıca, salım sırasında 1 miligram mikroküreden zamanla ortama çıkan proteinin mikrogram cinsinden miktarları da belirlenmiştir (Şekil 24). Gama sterilizasyonu yapılmış ve yapılmamış IgG yüklü PEG-PCL-PEG mikroküreler ve IgG yüklü PCL mikrokürelerden 6. saatte, 7. Günde ve 90. günde ortama çıkan toplam protein miktarları Tablo 11'de karşılaştırılmıştır.



Şekil 22. Salım çalışmaları için BCA analizinde kullanılan IgG kalibrasyon eğrisi



Şekil 23. IgG yüklü PCL ve PEG-PCL-PEG mikrokürelerin BCA yöntemi ile incelenen 3 aylık salım profilleri Δ gama sterilizasyonu yapılmamış IgG yüklü PCL mikroküreler; ○ gama sterilizasyonu yapılmış IgG yüklü PCL mikroküreler; ▲ gama sterilizasyonu yapılmamış IgG yüklü PEG-PCL-PEG mikroküreler; ● gama sterilizasyonu yapılmış IgG yüklü PEG-PCL-PEG mikroküreler



Şekil 24. IgG yüklü PEG-PCL-PEG mikrokürelerin BCA yöntemi ile incelenen 3 aylık mg mikroküre başına ortama çıkan μg ilaç salım profilleri Δ gama sterilizasyonu yapılmamış IgG yüklü PCL mikroküreler; \circ gama sterilizasyonu yapılmış IgG yüklü PCL mikroküreler; \blacktriangle gama sterilizasyonu yapılmamış IgG yüklü PEG-PCL-PEG mikroküreler; \bullet gama sterilizasyonu yapılmış IgG yüklü PEG-PCL-PEG mikroküreler

Tablo 11. Gama sterilizasyonu yapılmış ve yapılmamış PCL ve PEG-PCL-PEG mikrokürelerden farklı zamanlarda ortama çıkan BCA yöntemi ile belirlenen IgG miktarları

	Kümülatif Salım, %			ug IgG / mg mikroküre		
	6. saat	7. gün	90. gün	6. saat	7. gün	90. gün
Gama sterilizasyonu yapılmamış IgG yüklü PCL mikroküreler	2.51 ± 0.37	19.55 ± 0.83	77.81 ± 1.58	0.13 ± 0.01	1.01 ± 0.16	4.01 ± 0.32
	>	*,>			*,>	>
Gama sterilizasyonu yapılmış IgG yüklü PCL mikroküreler	2.51 ± 0.80	18.69 ± 0.82	75.93 ± 1.61	0.13 ± 0.05	0.96 ± 0.14	3.53 ± 0.38
	#	#,<	#		#,<	#,<
Gama sterilizasyonu yapılmamış IgG yüklü PEG-PCL-PEG mikroküreler	2.25 ± 0.38	28.60 ± 3.42	66.03 ± 4.89	0.14 ± 0.02	2.37 ± 0.40	4.45 ± 0.77
	^	*,<	^		*,<	<
Gama sterilizasyonu yapılmış IgG yüklü PEG-PCL-PCL mikroküreler	3.75 ± 0.45	27.32 ± 5.34	77.58 ± 4.00	0.13 ± 0.02	2.47 ± 0.31	6.83 ± 1.12
	^, #, >	>, #	#, ^		#, >	#, >

* Gama sterilizasyonu yapılmamış PCL ve PEG-PCL-PEG mikrokürelerden ortama çıkan aynı zaman dilimindeki IgG miktarları arasındaki belirgin farkları göstermektedir (p ≤ 0.05)

Gama sterilizasyonu yapılmış PCL ve PEG-PCL-PEG mikrokürelerden ortama çıkan aynı zaman dilimindeki IgG miktarları arasındaki belirgin farkları göstermektedir (p ≤ 0.05)

^ Gama sterilizasyonu yapılmış ve yapılmamış PEG-PCL-PEG mikrokürelerden ortama çıkan aynı zaman dilimindeki IgG miktarları arasındaki belirgin farkları göstermektedir (p ≤ 0.05)

> Gama sterilizasyonu yapılmamış PCL ve gama sterilizasyonu yapılmış PEG-PCL-PEG mikrokürelerden ortama çıkan aynı zaman dilimindeki IgG miktarları arasındaki belirgin farkları göstermektedir (p ≤ 0.05)

< Gama sterilizasyonu yapılmış PCL ve gama sterilizasyonu yapılmamış PEG-PCL-PEG mikrokürelerden ortama çıkan aynı zaman dilimindeki IgG miktarları arasındaki belirgin farkları göstermektedir (p ≤ 0.05)

Gama sterilizasyonu yapılmış ve yapılmamış PCL ve PEG-PCL-PEG mikrokürelerden 3 aylık kümülatif protein salımlarının benzer bir profile sahip olduğu gözlemlenmiştir (Şekiller 23 ve 24). Salım çalışmalarında elde edilen sonuçlar, SEM analizi sonuçları ile uyumluluk göstermektedir. Mikrokürelerin yüzey morfolojileri incelendiğinde gama sterilizasyonunun yüzey morfoloji özelliklerinde belirgin bir değişikliğe neden olmadığı gözlemlenmiştir. Mikrokürelerin yüzey morfoloji özellikleri (özellikle yüzey gözeneklilik) ilaç salımını etkileyen önemli bir parametredir (GITEAU, 2008). Yüzeyde gözeneklilik arttıkça ilacın ortama salım hızı artmaktadır. Literatürdeki bir çalışmada da gama sterilizasyonunun PLGA mikrokürelerden ortama salınan ibuprofenin salım kinetiğine ve yüzey morfolojisine etki etmediği gözlemlenmiştir (FERNANDEZ-CARBALLIDO, 2004). Salım sonuçlarına bakıldığında ilk 6 saatte gama sterilizasyonu yapılmış PEG-PCL-PEG mikrokürelerden salım ortamına çıkan IgG miktarı diğer mikroküre gruplarından salım ortamına çıkan IgG miktarlarından belirgin olarak yüksek çıkmıştır ($p \leq 0.05$). Fakat, 6. saatte mg mikroküre başına salım ortamına çıkan μg ilaç miktarları arasında belirgin bir fark gözlemlenmemiştir ($p > 0.05$). İlk 6 saatte, gama sterilizasyonu yapılmış veya yapılmamış PCL mikrokürelerden ortama salınan protein miktarında belirgin bir fark gözlemlenmemiştir ($p > 0.05$). Fakat, gama sterilizasyonu yapılmış veya yapılmamış PEG-PCL-PEG mikrokürelerden ortama salınan protein miktarı arasında belirgin bir fark görülmüştür ($p \leq 0.05$). 7. günde mikrokürelerden ortama kümülatif protein yüzdesi ve mg mikroküre başına salım ortamına çıkan μg ilaç miktarları karşılaştırıldığında gama sterilizasyonu yapılmış ve yapılmamış PCL mikrokürelerden salım ortamına çıkan protein miktarları gama sterilizasyonu yapılmış ve yapılmamış PEG-PCL-PEG mikrokürelerden salım ortamına çıkan protein miktarlarından belirgin olarak düşük bulunmuştur ($p \leq 0.05$). 90 günlük salım süresinin sonunda, gama sterilizasyonu yapılmış PEG-PCL-PEG mikrokürelerden ortama salınan IgG miktarı, gama sterilizasyonu yapılmış PCL ve gama sterilizasyonu yapılmamış PEG-PCL-PEG mikroküre gruplarından salım ortamına çıkan IgG miktarlarından belirgin olarak yüksek çıkmıştır ($p \leq 0.05$). Fakat, gama sterilizasyonu yapılmamış PCL mikrokürelerden ortama salınan protein miktarı ve gama sterilizasyonu yapılmış PEG-PCL-PEG mikrokürelerden ortama salınan IgG miktarı arasında belirgin bir fark gözlemlenmemiştir ($p > 0.05$). Oldukça kristalin yapıda ve hidrofobik olmasından dolayı PCL'in bozunma süresi yavaştır (PRABHAKAR, 2005). Polietilen glikol (PEG) gibi hidrofilik segmentlerin PCL zinciri ile kopolimerizasyonu veya PCL zincirine eklenmesi sonucu hidrofobik özellik değiştirilerek PCL'in biyobozunurluğu geliştirilebilmektedir (HA, 1999,DAS, 2000,KIM M.S., 2006). Polimer matriks yapısına eklenen PEG polimer ve protein arasındaki hidrofobik etkileşimleri düşürmektedir. Ayrıca, yapıdaki PEG zincirleri suyun taşıma sisteminin içine daha kolay girmesini sağlayarak polimer matriksin erozyona uğramasına

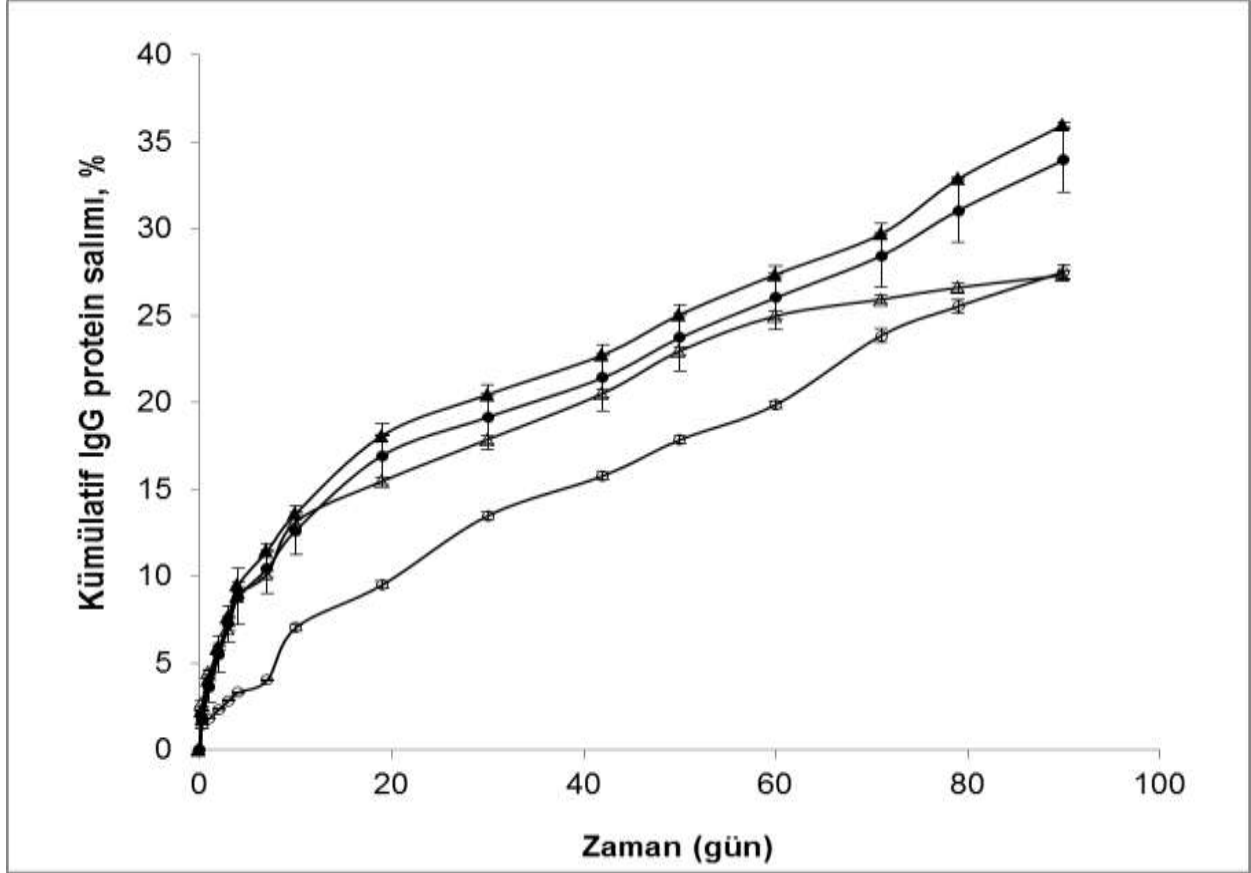
neden olmaktadır. Bu nedenlerle, PEG-PCL-PEG mikrokürelerden salım ortamına protein çıkışı PCL mikrokürelerden salım ortamına protein çıkışına oranla daha hızlı olduğu düşünülmektedir. Benzer bir çalışmada, MPEG-PLA kopolimeri sentezlenerek hazırlanan nanoparçacıklardan salım ortamına çıkan ilaç (paklitaksel) miktarı, PLA nanoparçacıklardan salım ortamına çıkan ilaç miktarına oranla daha yüksek bulunmuştur (DONG, 2004). İlk 7 gün, ilacın % 85'i MPEG-PLA nanoparçacıklardan salım ortamına çıkarken PLA nanoparçacıklardan salım ortamına 1 ayda ilacın %30'u çıkabilmiştir. Kim ve Bae'nin yaptığı bir çalışmada (KIM, 2004), iki basamaklı emülsiyon yöntemi kullanılarak albumin yüklü PEG-PCL ve PEG-PLLA mikroküreler hazırlanmıştır. Sentezlenen PEG-PCL ve PEG-PLLA kopolimerlerinde hidrofilik PEG segment oranı arttırıldıkça ortama çıkan albumin miktarının da arttığı gözlemlenmiştir. Mikrokürelerin hidrofilik özelliği arttıkça su tutma oranı artacağından bu mikrokürelerden salım ortamına daha hızlı bir şekilde protein çıkmıştır.

2.3.5. IgG Biyoaktivitesi

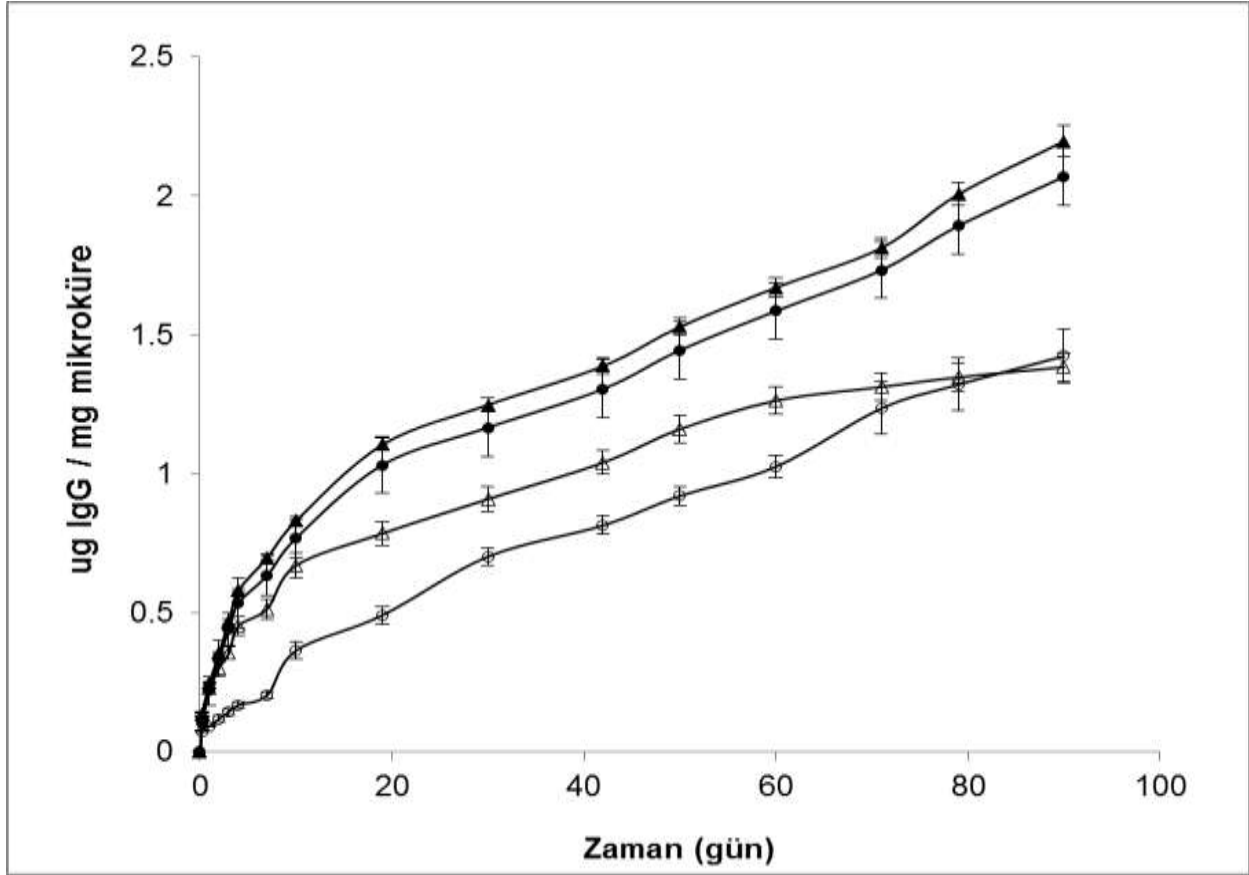
PCL ve PEG-PCL-PEG mikrokürelerden farklı zamanlarda ortama çıkan IgG proteinin biyoaktivitesinin korunup korunmadığını ölçmek için 90 gün boyunca farklı zamanlarda elde edilen salım örnekleri enzime bağlı immünosorban (ELİZA) testi ile incelenmiştir. IgG yüklü PCL ve PEG-PCL-PEG mikrokürelerden ortama salınan biyolojik olarak aktif IgG protein miktarları BCA yöntemiyle belirlenen protein yükleme miktarlarına bölünerek salım sırasında ortama çıkan %kümülatif protein miktarları belirlenmiştir (Şekil 25). Ayrıca, salım sırasında 1 miligram mikroküreden zamanla ortama çıkan proteinin mikrogram cinsinden miktarları da belirlenmiştir (Şekil 26).

ELIZA yöntemiyle incelenen salım örneklerinde (Şekiller 25 ve 26) 90 gün boyunca PCL ve PEG-PCL-PEG mikrokürelerden ortama salınan protein miktarlarının BCA yöntemi ile (Şekiller 23 ve 24) gözlemlenen miktarlardan daha düşük olduğu gözlemlenmiştir. BCA yönteminde, iki farklı tepkime yer almaktadır. İlk aşamada, Cu^{2+} iyonları proteinlerin peptid bağları ile etkileşerek Cu^+ iyonlarına dönüşmektedir. Daha sonra oluşan Cu^+ iyonları BCA ile etkileşerek 562 nm'de abzorban veren mor renkli ürün oluşumuna neden olmaktadır. Bu nedenle, bu renkli ürünün oluşması için ortamda peptid bağlarının olması yeterlidir ve bu yöntem proteinin üç boyutlu yapısının korunmasına bağlı değildir. Bu yöntem ile ortamda bulunan biyoaktivliğini kaybetmiş ve kaybetmemiş bütün protein miktarı (total protein)

belirlenmektedir. Fakat, ELİZA yöntemi ise özgül antijen-antikor bağlanmasına dayanmaktadır ve ortamdaki biyoaktivitesini koruyan protein miktarlarını ölçmektedir. Bu nedenle, ELİZA testi ile okunan protein miktarları BCA yöntemiyle okunan değerlere göre daha düşük okunmuştur.



Şekil 25. IgG yüklü PCL ve PEG-PCL-PEG mikrokürelerin ELİZA yöntemi ile incelenen 3 aylık salım profilleri Δ gama sterilizasyonu yapılmamış IgG yüklü PCL mikroküreler; ○ gama sterilizasyonu yapılmış IgG yüklü PCL mikroküreler; ▲ gama sterilizasyonu yapılmamış IgG yüklü PEG-PCL-PEG mikroküreler; ● gama sterilizasyonu yapılmış IgG yüklü PEG-PCL-PEG mikroküreler



Şekil 26. IgG yüklü PEG-PCL-PEG mikrokürelerin ELİZA yöntemi ile incelenen 3 aylık mg mikroküre başına ortama çıkan µg ilaç salım profilleri Δ gama sterilizasyonu yapılmamış IgG yüklü PCL mikroküreler; o gama sterilizasyonu yapılmış IgG yüklü PCL mikroküreler; ▲ gama sterilizasyonu yapılmamış IgG yüklü PEG-PCL-PEG mikroküreler; ● gama sterilizasyonu yapılmış IgG yüklü PEG-PCL-PEG mikroküreler

Gama sterilizasyonu yapılmış ve yapılmamış IgG yüklü PEG-PCL-PEG ve PCL mikrokürelerden 6. Saatte, 7.günde ve 90. günde ortama çıkan biyolojik aktivitesini korumuş protein miktarları Tablo 12'de karşılaştırılmıştır. 6 saatlik ve 7 günlük salım sonuçlarına bakıldığında, gama sterilizasyonu yapılmış PCL mikrokürelerden salım ortamına çıkan IgG miktarı diğer mikroküre gruplarından salım ortamına çıkan IgG miktarlarından belirgin olarak düşük bulunmuştur ($p \leq 0.05$). PCL mikrokürelerin aksine, gama sterilizasyonu sonrasında PEG-PCL-PEG mikrokürelerden salım ortamına çıkan biyolojik olarak aktif proteinin miktarında belirgin bir değişim gözlemlenmemiştir ($p > 0.05$). Bölüm 2.2.4'de bahsedildiği gibi, hidrofilik PEG segmentinin PCL zinciri ile kopolimerizasyonu sonucu PCL'in hidrofilik yapısı değiştirilerek

bozunma süresi değişmiştir. Bu nedenle, PEG-PCL-PEG mikrokürelerden salım ortamına protein çıkışı PCL mikrokürelerden salım ortamına protein çıkışına oranla daha hızlı olduğu düşünölmektedir. Salım ortamına daha çok protein çıktığı için ortamdaki biyolojik olarak aktif protein miktarı da artmıştır. Ayrıca, mikrokürelerin hazırlanmasında kullanılan kopolimerin yapısındaki PEG zincirlerinin proteinin kararlılığını koruduğu düşünölmektedir. Péan ve ark. (PEAN, 1999) yaptığı bir çalışmada sinir büyüme fakötörü (NGF) yüklü PLGA mikrokürelerin hazırlanma basamağında iç organik faza PEG400 eklenerek yüklenen proteinin kararlılığının korunması sağlanmıştır. Sisteme eklenen PEG molekülü NGF'nin emölsiyon sırasında organik faz ile etkileşmesini engelleyerek NGF'nin denatüre olmasını engellemiştir. Ayrıca, kovalent olarak yüzeyle bağlanan PEG zincirleri hidrofobik polimer yüzeyini maskeleyerek peptit ve proteinlerin adsorpsiyonunu azaltmakta ve in vivo kararlılığını arttırmaktadır (STOLNIK, 1994, LUCKE, 2000). 7. ve 90. günde, gama sterilizasyonu yapılmış PCL ve PEG-PCL-PEG mikroküreler karşılaştırıldığında ise, PEG-PCL-PEG mikrokürelerden ortama salım ortamına çıkan biyolojik olarak aktif proteinin miktarı PCL mikrokürelerden salım ortamına çıkan IgG miktarından belirgin olarak yüksek bulunmuştur ($p \leq 0.05$). Bu nedenle, PEG zincirinin gama sterilizasyonu sırasında protein yapısını koruduğu düşünölmektedir.

Tablo 12. Gama sterilizasyonu yapılmış ve yapılmamış PCL ve PEG-PCL-PEG mikrokürelerden farklı zamanlarda ortama çıkan ELİZA yöntemi ile belirlenen IgG miktarları

	Kümülatif Salım, %			ug IgG / mg mikroküre		
	6. saat	7. gün	90. gün	6. saat	7. gün	90. gün
Gama sterilizasyonu yapılmamış IgG yüklü PCL mikroküreler	2.66 ± 0.14 *,>,"	10.12 ± 0.20 *,"	27.33 ± 0.25 *,"	0.14 ± 0.01 "	0.51 ± 0.04 *,>,"	1.38 ± 0.05 *,>
Gama sterilizasyonu yapılmış IgG yüklü PCL mikroküreler	1.46 ± 0.03 <,"	4.01 ± 0.05 #,<,"	27.52 ± 0.38 <,"	0.08 ± 0.002 #,<,"	0.20 ± 0.01 #,<,"	1.42 ± 0.09 #,<
Gama sterilizasyonu yapılmamış IgG yüklü PEG-PCL-PEG mikroküreler	2.19 ± 0.10 *,<	11.36 ± 0.09 *,<	35.73 ± 0.15 *,^,<	0.13 ± 0.004 <	0.70 ± 0.01 *,<	2.19 ± 0.06 *,<
Gama sterilizasyonu yapılmış IgG yüklü PEG-PCL-PEG mikroküreler	1.73 ± 0.47 >	10.35 ± 1.41 #	33.69 ± 1.80 ^	0.11 ± 0.03 #	0.63 ± 0.07 #,>	2.06 ± 0.10 #,>

* Gama sterilizasyonu yapılmamış PCL ve PEG-PCL-PEG mikrokürelerden ortama çıkan aynı zaman dilimindeki IgG miktarları arasındaki belirgin farkları göstermektedir (p ≤ 0.05)

Gama sterilizasyonu yapılmış PCL ve PEG-PCL-PEG mikrokürelerden ortama çıkan aynı zaman dilimindeki IgG miktarları arasındaki belirgin farkları göstermektedir (p ≤ 0.05)

^ Gama sterilizasyonu yapılmış ve yapılmamış PEG-PCL-PEG mikrokürelerden ortama çıkan aynı zaman dilimindeki IgG miktarları arasındaki belirgin farkları göstermektedir (p ≤ 0.05)

> Gama sterilizasyonu yapılmamış PCL ve gama sterilizasyonu yapılmış PEG-PCL-PEG mikrokürelerden ortama çıkan aynı zaman dilimindeki IgG miktarları arasındaki belirgin farkları göstermektedir (p ≤ 0.05)

< Gama sterilizasyonu yapılmış PCL ve gama sterilizasyonu yapılmamış PEG-PCL-PEG mikrokürelerden ortama çıkan aynı zaman dilimindeki IgG miktarları arasındaki belirgin farkları göstermektedir (p ≤ 0.05)

“ Gama sterilizasyonu yapılmış ve yapılmamış PEG-PCL-PEG mikrokürelerden ortama çıkan aynı zaman dilimindeki IgG miktarları arasındaki belirgin farkları göstermektedir (p ≤ 0.05)

ELİZA yöntemi ile belirlenen farklı zamanlarda ortama çıkan protein miktarlarının BCA yöntemi ile gözlemlenen miktarlara oranları da Tablo 13'te verilmiştir. Bu sonuçlar incelendiğinde, gama sterilizasyonu yapılmamış PCL ve PEG-PCL-PEG mikrokürelerden ilk 6 saatte ortama salınan IgG proteininin biyoaktivitesinin büyük kısmı korunurken gama sterilizasyonu yapılmış PCL ve PEG-PCL-PEG mikrokürelerden ortama salınan IgG proteininin biyoaktivitesinin %58'i ve %46'sı korunabilmiştir. 7 günlük salım örnekleri incelendiğinde ise gama sterilizasyonu yapılmamış PCL mikrokürelerden ortama çıkan proteinin %52'si biyoaktivitesini korurken gama sterilizasyonu yapılan PCL mikrokürelerde ortama çıkan proteinin %22'si biyoaktivitesini korumaktadır. Fakat, gama sterilizasyonu yapılmış ve yapılmamış PEG-PCL-PEG mikrokürelerden ortama çıkan protein miktarları arasında bir fark gözlemlenmemiştir. Ayrıca, 90 günlük salım sonunda gama sterilizasyonu yapılmamış PCL ve PEG-PCL-PEG mikrokürelerden ortama çıkan proteinin %38 ve %54'ü biyoaktivitesini korurken gama sterilizasyonu yapılan PCL ve PEG-PCL-PEG mikrokürelerden ortama çıkan proteinin %36'sı ve %44'ü korunabilmiştir. PEG-PCL-PEG yapısındaki PEG zincirleri proteinin kararlılığının korunmasını sağladığı düşünülmektedir. Wang ve ark. (WANG, 2004) tarafından yapılan bir çalışmada IgG iki basamaklı w/o/w emülsiyon (water-in-oil-in- water) veya s/o/w (solid-in-oil-in- water) emülsiyon yöntemleri kullanılarak PLGA mikrokürelere hapsedilmiştir. Bu çalışmada, ilk salım örnekleri (initial burst) ELIZA yöntemiyle incelendiğinde s/o/w emülsiyonu ile hazırlanan mikrokürelerden ortama çıkan proteinin %37'si biyoaktifliğini korurken w/o/w emülsiyonu ile hazırlanan mikrokürelerden ortama çıkan proteinin sadece % 20'sinin biyoaktifliğini koruduğunu gözlemlenmiştir. Bu projede ise, 3 ay sonunda salınan IgG miktarları incelendiğinde gama sterilizasyonu yapılmamış PCL ve PEG-PCL-PEG mikrokürelerde ortama çıkan proteinin %38 ve %54'ü biyoaktivitesini korurken gama sterilizasyonu yapılan PCL ve PEG-PCL-PEG mikrokürelerde ortama çıkan proteinin %36'sı ve %44'ü biyoaktivitesini korumaktadır. Projede hazırlanan IgG yüklü mikrokürelerden 3 ay sonunda gözlenen biyoaktivite kaybı Wang ve ark'nın ilk 6 saat salımda gözlemledikleri kayba eşdeğer veya daha azdır. Projede kullanılan mikroküre yöntemi protein biyoaktivite kaybını minimize etmektedir.

Tablo 13. Gama sterilizasyonu yapılmış ve yapılmamış PCL ve PEG-PCL-PEG mikrokürelerden farklı zamanlarda ortama çıkan biyoaktif IgG miktarının (ELIZA yöntemiyle belirlenen) toplam salınan protein miktarına (BCA yöntemiyle belirlenen) oranı

	Salınan biyoaktif protein miktarının salınan toplam proteine oranı		
	6. saat	7. gün	90. gün
Gama sterilizasyonu yapılmamış IgG yüklü PCL mikroküreler	0.90 ± 0.02 >,”	0.52 ± 0.03 *,>,”	0.38 ± 0.04 *
Gama sterilizasyonu yapılmış IgG yüklü PCL mikroküreler	0.58 ± 0.03 #,<,”	0.22 ± 0.01 #,<,”	0.36 ± 0.02 <
Gama sterilizasyonu yapılmamış IgG yüklü PEG-PCL-PEG mikroküreler	0.99 ± 0.15 ^,<	0.40 ± 0.05 *,<	0.54 ± 0.04 *,<
Gama sterilizasyonu yapılmış IgG yüklü PEG-PCL-PCL mikroküreler	0.46 ± 0.08 #,^,>	0.39 ± 0.07 #,>	0.44 ± 0.04

* Gama sterilizasyonu yapılmamış PCL ve PEG-PCL-PEG mikrokürelerden ortama çıkan aynı zaman dilimindeki salınan biyoaktif protein miktarının salınan toplam proteine oranları arasındaki belirgin farkları göstermektedir ($p \leq 0.05$).

Gama sterilizasyonu yapılmış PCL ve PEG-PCL-PEG mikrokürelerden ortama çıkan aynı zaman dilimindeki salınan biyoaktif protein miktarının salınan toplam proteine oranları arasındaki belirgin farkları göstermektedir ($p \leq 0.05$).

^ Gama sterilizasyonu yapılmış ve yapılmamış PEG-PCL-PEG mikrokürelerden ortama çıkan aynı zaman dilimindeki salınan biyoaktif protein miktarının salınan toplam proteine oranları arasındaki belirgin farkları göstermektedir ($p \leq 0.05$).

> Gama sterilizasyonu yapılmamış PCL ve gama sterilizasyonu yapılmış PEG-PCL-PEG mikrokürelerden ortama çıkan aynı zaman dilimindeki salınan biyoaktif protein miktarının salınan toplam proteine oranları arasındaki belirgin farkları göstermektedir ($p \leq 0.05$).

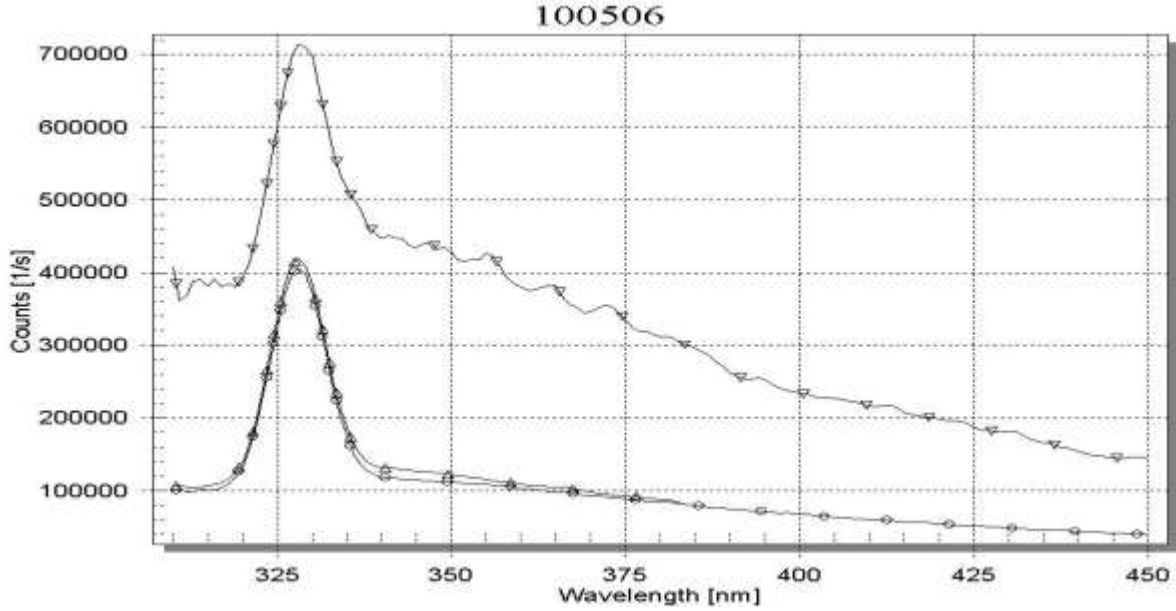
< Gama sterilizasyonu yapılmış PCL ve gama sterilizasyonu yapılmamış PEG-PCL-PEG mikrokürelerden ortama çıkan aynı zaman dilimindeki salınan biyoaktif protein miktarının salınan toplam proteine oranları arasındaki belirgin farkları göstermektedir ($p \leq 0.05$).

“ Gama sterilizasyonu yapılmış ve yapılmamış PCL mikrokürelerden ortama çıkan aynı zaman dilimindeki salınan biyoaktif protein miktarının salınan toplam proteine oranları arasındaki belirgin farkları göstermektedir ($p \leq 0.05$).

2.3.6. Protein Kararlılığı

Projenin ilk aşamalarında, salım sonrası proteinin kararlılığında herhangi bir değişim olup olmadığını incelemek için HPLC yöntemi kullanılmıştır. Bunun için, IgG yüklü PCL mikrokürelerden farklı zamanlarda alınan salım örneklerinin HPLC kromatogramları standart IgG çözeltilerinin kromatogramları ile karşılaştırılmıştır. Fakat, bu yöntemle sadece proteinin birincil yapısındaki değişimler incelenebildiği için projenin ilerleyen aşamalarında proteinin tersiyer ve sekonder yapısındaki bozulmaların incelenebildiği floresans ve FTIR spektrofotometresi yöntemleri salım sonrası proteinin kararlılığında herhangi bir değişim olup olmadığını incelemek için kullanılmıştır.

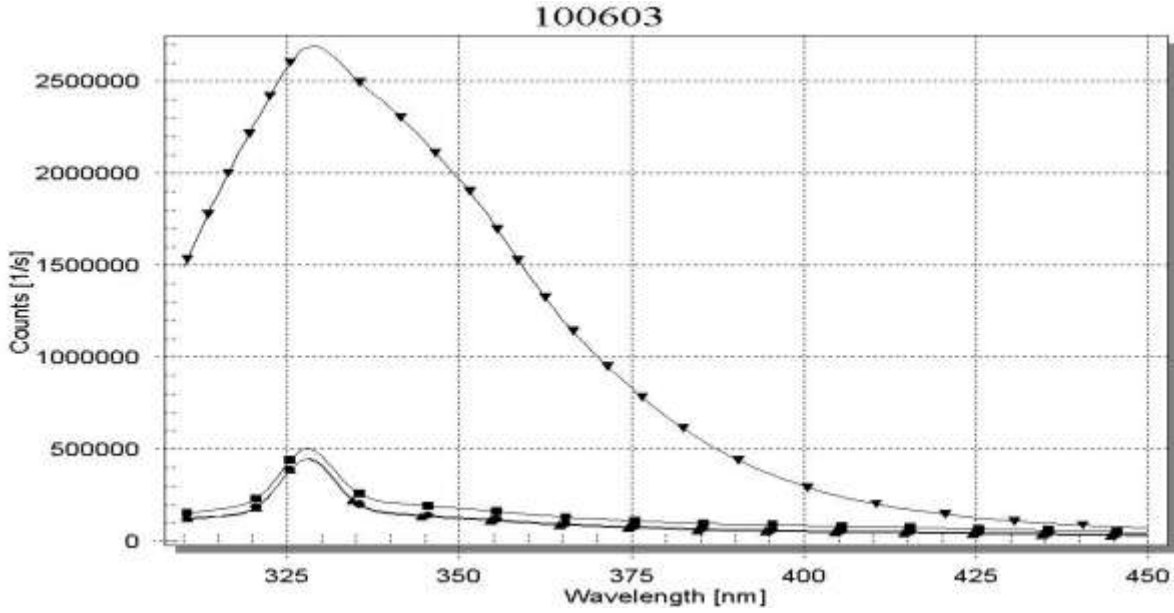
Mikrokürelerden ortama çıkan proteinlerin tersiyer yapısındaki değişimleri incelemek için triptofana bağlı intrinsik floresans yöntemi kullanılmıştır. IgG molekülünde 11 triptofan ve 28 tirozin rezidü bulunmaktadır. Hidrofobik bir amino asit olan triptofan katlanmış konformasyonda proteinin iç kısımlarında yer alır, ancak katlanmaların açılmasıyla (unfolding) yüzeye doğru çıkmaktadır. Bu durumda 335 nm'de görülen triptofan piki 345-380 nm aralığına doğru kaymaktadır (KIM J.H., 2005). Bu floresans yönteminin, salım ortamındaki proteinlerin yapısındaki değişimlerin incelenebilmesindeki etkinliğinin tayini için projenin ilk basamaklarında Tween 20 içeren salım ortamında belli konsantrasyonda hazırlanan IgG standard çözeltisi, boş Tween 20 içeren salım ortamı ve IgG yüklü PCL mikrokürelerin 6. saat salım örneklerinin floresans spektrumları karşılaştırılmıştır (Şekil 27). Ancak salım çalışmalarında mikrokürelerin birbirine yapışmasını ve salınan proteinin mikroküre yüzeyine adsorpsiyonunu engellemek amacıyla kullanılan Tween 20'nin IgG ile aynı dalga boyunda pik verdiği gözlemlenmiştir. Bu nedenle, projenin sonraki aşamalarında IgG yüklü PCL mikroküreler Tween 20 içermeyen fosfat tamponu ortamında çalkalamalı su banyosu içerisinde 37°C'de inkübe edilerek proteinin tersiyer yapısındaki tersiyer yapısındaki değişimlerin incelenmesi tekrar edilmiştir.



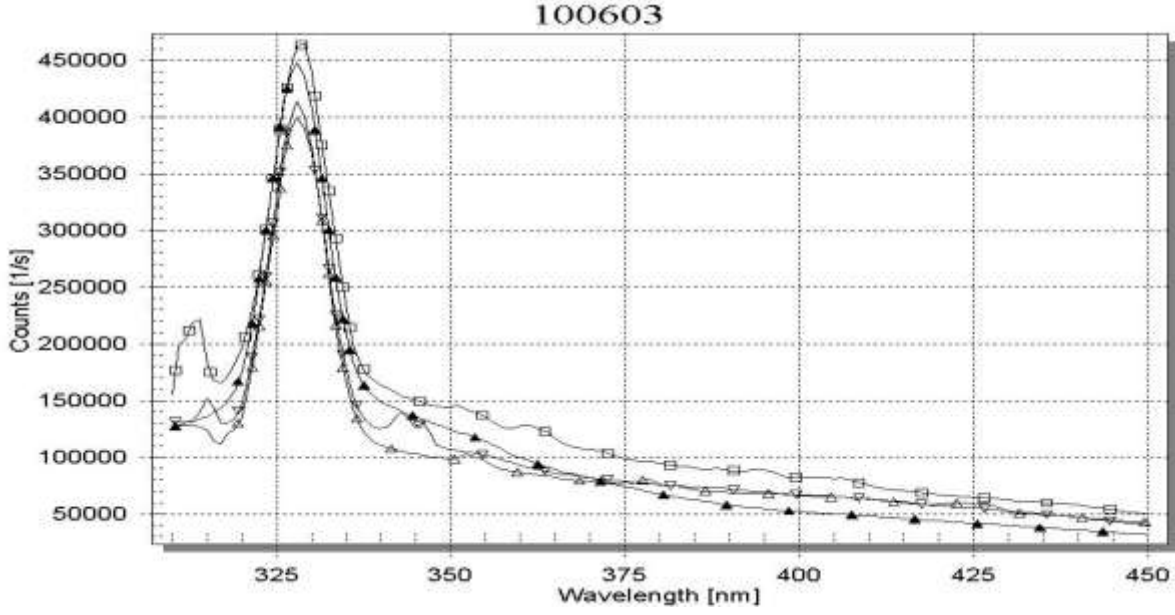
Şekil 27. Floresans Spektrumu (o: IgG standart çözeltisi; Δ: Tween 20 içeren salım ortamı; ∇: protein içeren salım ortamı (6. saat))

Tween 20 içermeyen salım ortamında belli konsantrasyonlarda hazırlanan IgG standard çözeltileri (50 ng/ml, 1 µg/ml ve 50 µg/ml), Tween 20 içermeyen boş (mikroküre eklenmemiş) salım ortamı ve IgG yüklü PCL mikrokürelerin 6. saat salım örneklerinin floresans spektrumları Şekiller 28 - 30'da verilmiştir. IgG standard çözeltileri ve 6. saat salım örneklerinin floresans spektrumları karşılaştırıldığında maksimum triptofan floresans emisyon piki 330 nm'de görülmüş ve salım örneklerinde triptofan floresans emisyon pikinde yukarı dalga boylarına herhangi bir kayma gözlemlenmemiştir. Floresans analizi sonucunda, PCL mikrokürelerden ortama çıkan IgG proteininin tersiyer yapısında belirgin bir değişiklik olmamıştır. Fakat, verilen 6 saatlik salım örneklerinin ELİZA yöntemi ile incelendiğinde (Bölüm 2.2.5 Tablo 13) gama sterilizasyonu yapılmamış mikrokürelerde ortama çıkan proteinin %90'ının ve gama sterilizasyonu yapılan mikrokürelerden ortama çıkan proteinin %58'inin biyoaktivitesini koruduğu görülmüştür. Gama sterilizasyonu yapılmış mikrokürelerden çıkan IgG üç boyutlu yapısında oluşan küçük değişiklikler nedeniyle ELİZA yönteminde antikorun liganda olan affinetesinde azalmalara neden olduğu ancak floresans kararlılık çalışmaları ile tam örtüşmediği gözlenmiştir. Floresans kararlılık okumalarında protein katlanma bölgelerinde olan triptofanların açığa çıkmadığı için belirgin değişikliklerin (örneğin maksimum emisyon dalga boyu kayması, floresans okuma değerleri)

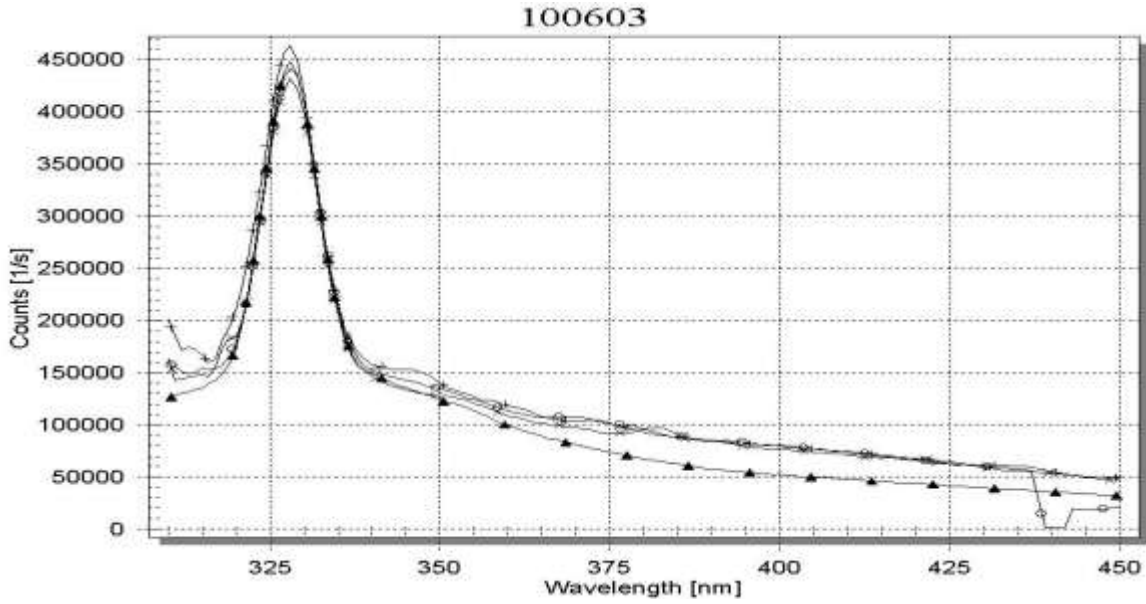
gözlenemediği düşünülmektedir. Ayrıca, zamana bağlı olarak ortama çıkan proteinin biyoaktivitesi düşmüştür. Bunun nedeni, 37°C'deki çalkalamalı su banyosu fosfat tampon ortamında yapılan uzun süreli salım çalışmasında ortama çıkan proteinler deney ortamı yüzünden zamanla biyoaktivitelerini kaybetmektedir. Projenin ilerleyen aşamalarında, salım sonrası proteinin kararlılığında herhangi bir değişim olup olmadığını incelemek için diğer bir yöntem olan FT-IR analizi yöntemi kullanılmıştır.



Şekil 28. 50 µg/ml IgG standard çözeltisinin (▼), 1 µg/ml IgG standard çözeltisinin (■), 50 ng/ml IgG standard çözeltisinin ve Tween 20 içermeyen salım ortamının (▲) floresans spektrumları



Şekil 29. Tween 20 içermeyen salım ortamının (▲) ve gama sterilizasyonu yapılmamış mikrokürelerin bekletildiği 6 saatlik salım ortamının (n=3; □, Δ, ▽) floresans spektrumları

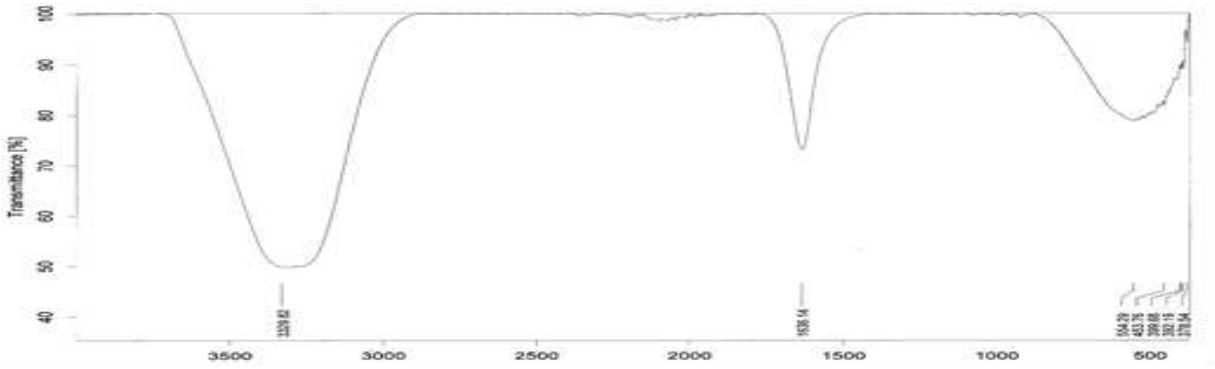


Şekil 30. Tween 20 içermeyen salım ortamının (▲) ve gama sterilizasyonu yapılmış mikrokürelerin bekletildiği 6 saatlik salım ortamının (n=3; x, +, o) floresans spektrumları

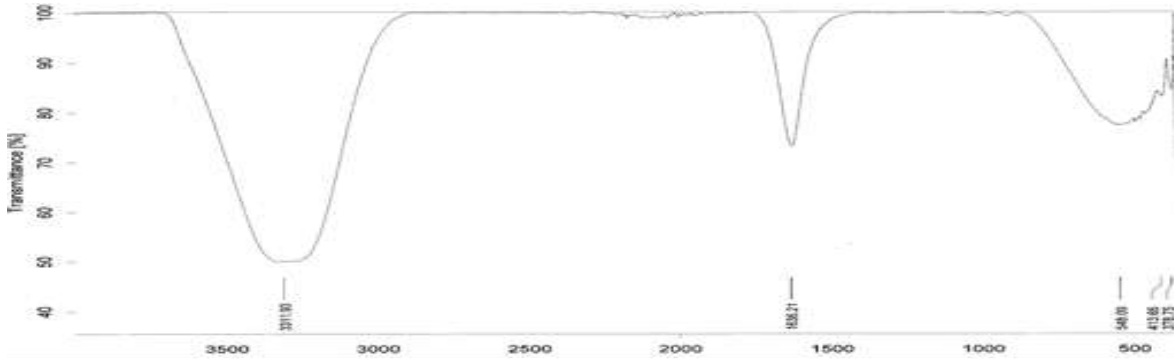
Mikrokürelere ortamına çıkan proteinlerin sekonder yapısındaki değişimleri incelemek için FT-IR analizi kullanılmıştır. Projenin ilk dönemlerinde, boş salım ortamının, gama sterilizasyonu yapılmamış PCL mikrokürelere bekletildiği 6 saatlik salım ortamının ve gama sterilizasyonu yapılmış PCL mikrokürelere bekletildiği 6 saatlik salım ortamının FTIR spektrumları alınarak karşılaştırılmıştır (Şekil 31). Boş salım ortamının spektrumu ile 6. saatteki salım ortamlarının spektrumları arasında fark gözlemlenmemiştir. FT-IR spektrumunda, PCL mikrokürelere ortamına çıkan proteinin düşük derişimde olması nedeniyle proteine ait pikler gözlemlenmemiştir. Literatürdeki benzer bir çalışmada, PLGA mikrokapsüllere yüklenen insulinin yapısında oluşabilecek değişimler ekstraksiyon örneklerinin FT-IR analizi ile incelenmiştir (EMAMI, 2009). Bu sebeple, sonraki proje dönemlerinde, mikrokürelere yüklenen proteinin ikincil yapısındaki değişimleri incelemek için ekstraksiyon yapılmış örnekler FT-IR spektrofotometresi ile incelenmiştir. Ayrıca, standard IgG çözeltisinin ve ekstraksiyon prosedürüne uygulanan boş mikroküre örneklerinin de FT-IR spektrumları çekilerek sırasıyla pozitif ve negatif kontrol olarak kullanılmıştır. Ekstraksiyon ortamından alınan örneklerin FTIR spektrumları ile standard IgG çözeltisinin FT-IR spektrumlarındaki amid I bölgesinin ($1720-1600\text{ cm}^{-1}$) ikincil türevlendirmesi sonucu elde edilen spektrumlar proteinlerin ikincil yapısını incelemek için kullanılmıştır (JOVANONIC, 2008) (Şekil 32). 1656 cm^{-1} civarında gözlemlenen pik proteinin sekonder yapısındaki α -heliks karbonil gerilmesinden kaynaklanmaktadır (CAPAN, 2003). Gama sterilizasyonu yapılmış ve yapılmamış mikrokürelere ekstraksiyon ile ortamına çıkarılmış IgG örneklerinin α -heliks yapısına ait piklerin dalgaboyunda herhangi belirgin bir kaymaya rastlanılmamıştır. PCL ve PEG-PCL-PEG mikrokürelere yüklenen IgG üç boyutlu yapısının mikroküre hazırlama aşamalarından etkilenmemiştir. Fakat, pik şiddetlerinde IgG standart çözeltisine göre bir düşüş gözlemlenmiştir. DMSO ve alkalik baz içeren ekstraksiyon ortamına çıkan IgG proteinin sekonder yapısı etkilenerek pik şiddetinde bir azalmaya neden olduğu düşünülmektedir.



(A)

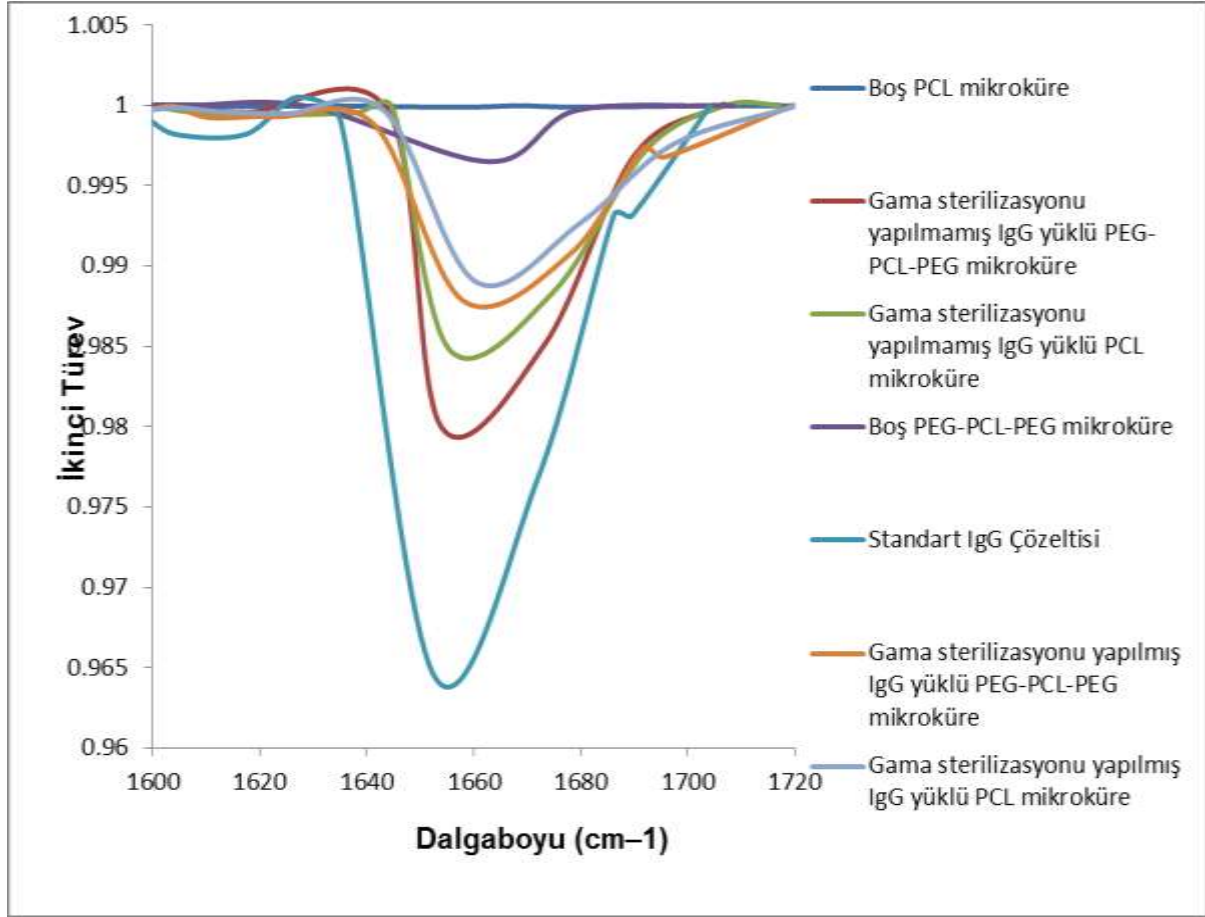


(B)



(C)

Şekil 31. FTIR Spektrumları (A) Boş salım ortamı, (B) Gama sterilizasyonu yapılmamış PCL mikrokürelerin bekletildiği 6 saatlik salım ortamı, (C) Gama sterilizasyonu yapılmış PCL mikrokürelerin bekletildiği 6 saatlik salım ortamı



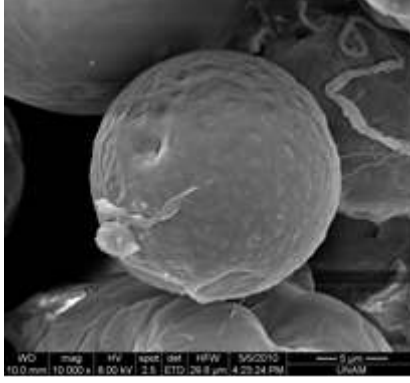
Şekil 32. Mikrokürelere yüklenen proteinin ikincil yapısındaki değişimlerin incelenmesi için gama sterilizasyonu yapılmış ve yapılmamış PCL ve PEG-PCL-PEG mikrokürelere ekstre edilmiş protein örneklerinin, pozitif ve negatif kontrolün amid I bölgesindeki ikincil türev grafikleri

2.3.7. Protein Yüklü Mikrokürelere İçin Bozunma (Degredasyon) Çalışması

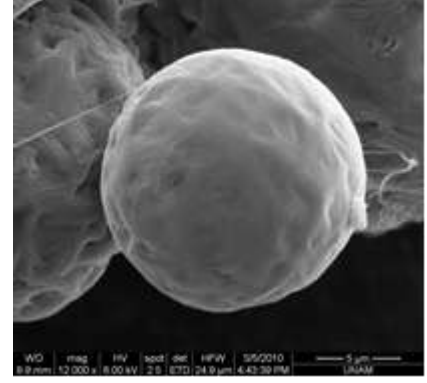
Polimer bazlı kontrollü ilaç salım sistemlerinde, ilacın sistemden ortama salım hızını belirleyen önemli parametrelerden biri de polimerin bozunma özellikleridir. Bu projede, yapısal bütünlüğünü en az 6 ay koruyan PCL ve PEG-PCL-PEG mikroküre protein taşıma sistemlerinin hazırlanması hedeflenmiştir. Bozunma çalışması sonunda, 6 ay fosfat tampon ile inkübe edilen model protein IgG yüklü gama sterilizasyonu yapılmış ve yapılmamış PCL ve PEG-PCL-PEG mikrokürelere morfolojilerindeki, boyutlarındaki, kimyasal yapılarındaki ve moleküler ağırlıklarındaki değişim fosfat tampon ortamına konmamış gama sterilizasyonu yapılmış ve

yapılmamış mikrokürelerin özellikleri ile karşılaştırılmıştır. Ayrıca, fosfat tampon ile inkübasyon öncesinde ve sonrasında ortam pH'sının değişimi incelenmiştir.

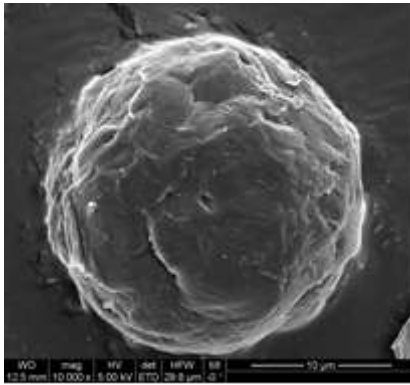
6 aylık bozunma çalışması sonunda, IgG yüklü PCL ve PEG-PCL-PEG mikrokürelerin yüzey morfoloji özelliklerindeki değişimleri incelemek için SEM analizi yapılmıştır. 6 ay fosfat tampon ile inkübe edilen gama sterilizasyonu yapılmış ve yapılmamış mikrokürelerin yüzey morfolojilerindeki değişim fosfat tampon ile inkübe edilmemiş gama sterilizasyonu yapılmış ve yapılmamış mikrokürelerin yüzey morfolojileri ile karşılaştırılmıştır (Şekiller 33 ve 34). 6 ay inkübasyon öncesinde PCL ve PEG-PCL-PEG mikrokürelerin gözeneksiz bir yüzey morfolojisine sahip oldukları gözlemlenmiştir. Fakat PCL mikroküreler PEG-PCL-PEG mikrokürelere oranla daha düzgün bir yüzey morfolojisi göstermiştir. 6 aylık inkübasyon sonunda, her iki mikroküre grubunun yüzeyinde bozulmaların oluşmasına karşın küre formunu korudukları gözlemlenmiştir (Şekil 33 ve Şekil 34). Gama sterilizasyonu yapılmış PEG-PCL-PEG mikrokürelerin yüzeyinde 6 aylık inkübasyon sonunda diğer gruplara oranla daha belirgin bir değişim olmuştur (Şekil 34D).



(A)



(B)

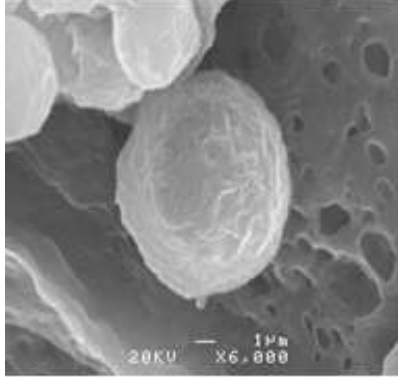


(C)

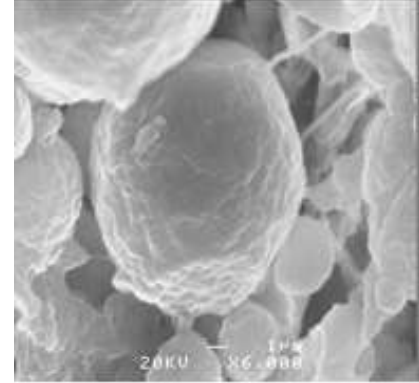


(D)

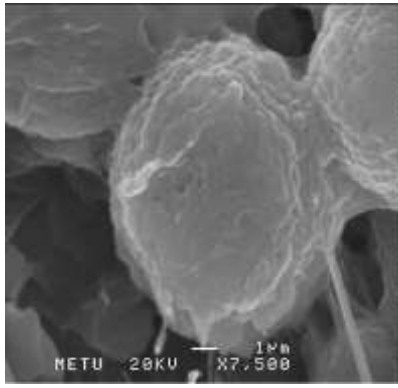
Şekil 33. Hazırlanan IgG yüklü PCL mikrokürelerin bozunma çalışması öncesinde ve sonrasında SEM görüntüleri: A) Gama sterilizasyonu yapılmamış mikrokürelerin bozunma çalışması öncesinde yüzey görüntüsü, B) Gama sterilizasyonu yapılmış mikrokürelerin bozunma çalışması öncesinde yüzey görüntüsü, C) Gama sterilizasyonu yapılmamış mikrokürelerin bozunma çalışması sonrasında yüzey görüntüsü, D) Gama sterilizasyonu yapılmış mikrokürelerin bozunma çalışması sonrasında yüzey görüntüsü



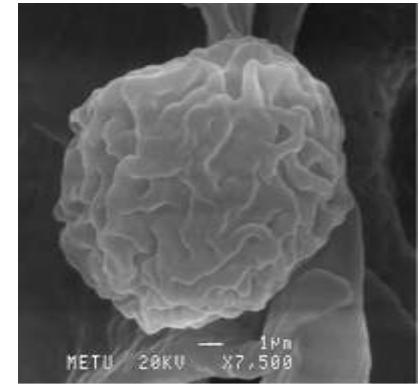
(A)



(B)



(C)



(D)

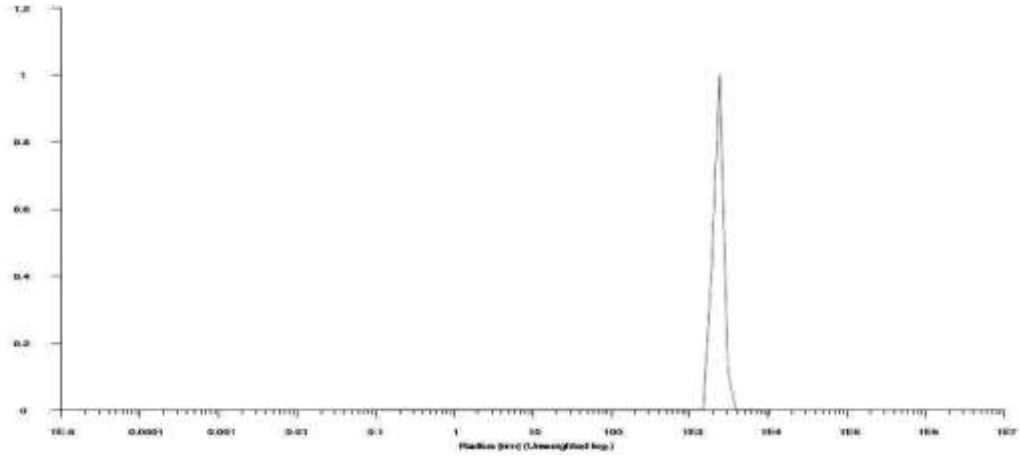
Şekil 34. Hazırlanan IgG yüklü PEG-PCL-PEG mikrokürelerin bozunma çalışması öncesinde ve sonrasında SEM görüntüleri: A) Gama sterilizasyonu yapılmamış mikrokürelerin bozunma çalışması öncesinde yüzey görüntüsü, B) Gama sterilizasyonu yapılmış mikrokürelerin bozunma çalışması öncesinde yüzey görüntüsü, C) Gama sterilizasyonu yapılmamış mikrokürelerin bozunma çalışması sonrasında yüzey görüntüsü, D) Gama sterilizasyonu yapılmış mikrokürelerin bozunma çalışması sonrasında yüzey görüntüsü

Projenin ilk aşamalarında, IgG yüklü PCL mikrokürelerin boyut ve boyut dağılımlarındaki değişimleri incelemek için 6 aylık bozunma çalışması sonunda DLS analizi yapılmıştır. DLS analizi sonucu gözlemlenen bozunma çalışması öncesi ve sonrası parçacık boyutları Tablo 14'de verilmiştir. Bozunma çalışması öncesinde gama ışınması ile sterilizasyon yapılmamış PCL mikrokürelerin yarıçapları 1.484 – 2.397 µm aralığında değişirken gama ışınması ile sterilizasyon yapılmış mikrokürelerin boyutları 2.389 – 6.236 µm aralığında değişmektedir. Bozunma çalışması sonrasında ise gama ışınması ile sterilizasyon yapılmamış PCL mikrokürelerin

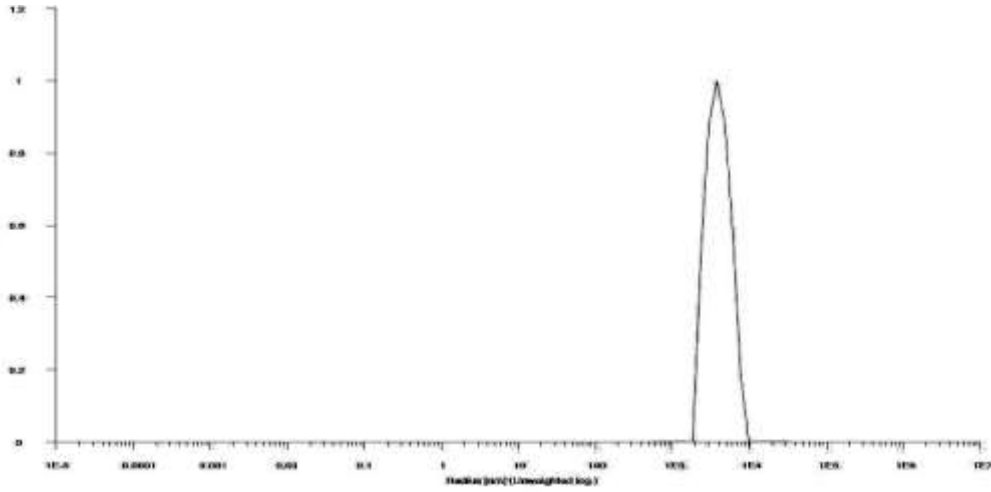
yarıçaplarının 1.562 – 2.639 μm aralığında değişirken gama ışması ile sterilizasyon yapılmış mikrokürelerin boyutları 2.052 – 6.807 μm aralığında bulunmuştur. 6 aylık inkübasyon öncesi gama sterilizasyonu yapılmış ve yapılmamış IgG yüklü PCL mikrokürelerin parçacık boyutları ve parçacık boyut dağılım eğrileri Bölüm 2.3.3’de verilmiştir. 6 aylık inkübasyon sonrası gama sterilizasyonu yapılmış ve yapılmamış IgG yüklü PCL mikrokürelerin parçacık boyutları ve parçacık boyut dağılım eğrileri ise Şekil 35’de verilmiştir. DLS analizi sonucunda, 6 aylık bozunma çalışması sonunda mikrokürelerin boyutlarında belirgin bir değişim olmamıştır. Bölüm 2.3.3’de belirtildiği gibi hazırlanan IgG yüklü PCL mikrokürelerin SEM görüntüleri ile DLS ile ölçülen boyut değeri arasında fark gözlemlendiğinden 6 aylık bozunma çalışması sonunda IgG yüklü PCL mikrokürelerin boyut ve boyut dağılımlarındaki değişimleri incelemek için SEM görüntülerinden boyut analizi projenin ilerleyen basamaklarında kullanılmıştır. Bu analizi sonucu gözlemlenen bozunma çalışması öncesi ve sonrası parçacık boyutları Tablo 15’de verilmiştir. 6 aylık bozunma çalışması sonunda mikrokürelerin boyutlarında belirgin bir değişim olmamıştır. 6 aylık bozunma çalışması sonunda mikrokürelerin boyutlarında belirgin bir değişim olmamıştır.

Tablo 14. Bozunma çalışması öncesinde ve sonrasında gama sterilizasyonu yapılmış veya yapılmamış IgG yüklü PCL mikrokürelerin parçacık boyutları

			Yarıçap (μm)	Çap (μm)
Gama sterilizasyonu yapılmamış mikroküreler (bozunma çalışması öncesi)			1.484 – 2.397	2.968 – 4.794
Gama sterilizasyonu yapılmış mikroküreler (bozunma çalışması öncesi)			1.562 – 2.639	3.124 – 5.278
Gama sterilizasyonu yapılmamış mikroküreler (bozunma çalışması sonrası)			2.389 – 6.236	4.778 – 12.472
Gama sterilizasyonu yapılmış mikroküreler (bozunma çalışması sonrası)			2.052 – 6.807	4.104 – 13.614



(A)



(B)

Şekil 35. IgG yüklü PCL mikrokürelerin yarıçap boyut dağılımı (A) Gama sterilizasyonu yapılmamış mikroküreler, (B) Gama sterilizasyonu yapılmış mikroküreler

Tablo 15. Bozunma çalışması öncesinde ve sonrasında gama sterilizasyonu yapılmış veya yapılmamış IgG yüklü PCL veya PEG-PCL-PEG mikrokürelerin parçacık boyutları

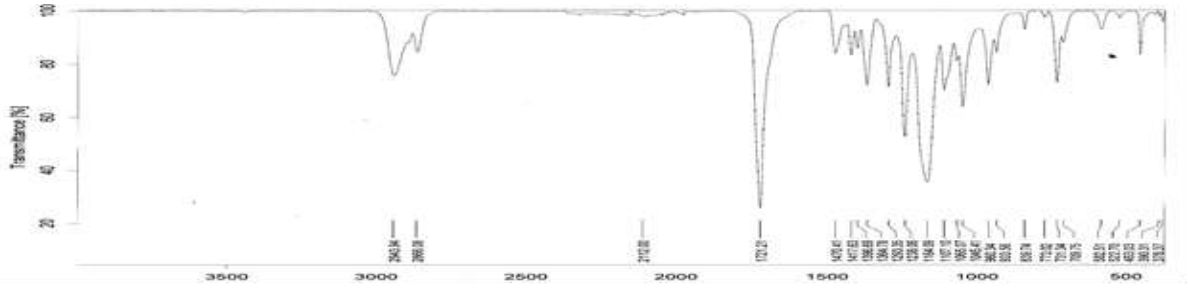
	Ortalama Parçacık Boyutu	Mod	Medyan
Gama sterilizasyonu yapılmamış IgG yüklü PCL mikroküreler (bozunma çalışması öncesi)	5.99 ± 0.12 µm	4.16 µm	5.41 µm
Gama sterilizasyonu yapılmış IgG yüklü PCL mikroküreler (bozunma çalışması öncesi)	5.79 ± 0.12 µm	3.47 µm	5.14 µm
Gama sterilizasyonu yapılmamış IgG yüklü PEG-PCL-PEG mikroküreler (bozunma çalışması öncesi)	6.05 ± 0.11 µm	3.88 µm	5.59 µm
Gama sterilizasyonu yapılmış IgG yüklü PEG-PCL-PEG mikroküreler (bozunma çalışması öncesi)	5.84 ± 0.10 µm	3.59 µm	5.34 µm
Gama sterilizasyonu yapılmamış IgG yüklü PCL mikroküreler (bozunma çalışması sonrası)	5.89 ± 0.09 µm	5.41 µm	5.67 µm
Gama sterilizasyonu yapılmış IgG yüklü PCL mikroküreler (bozunma çalışması sonrası)	5.76 ± 0.10 µm	4.16 µm	5.4 µm
Gama sterilizasyonu yapılmamış IgG yüklü PEG-PCL-PEG mikroküreler (bozunma çalışması sonrası)	5.78 ± 0.09 µm	4.70 µm	5.54 µm
Gama sterilizasyonu yapılmış IgG yüklü PEG-PCL-PEG mikroküreler (bozunma çalışması sonrası)	5.61 ± 0.08 µm	4.27 µm	5.32 µm

Tüm gruplar birbirinden p ≤ 0.05 seviyesinde istatistiksel olarak farklı bulunmamıştır.

6 ay salım ortamında bekletilmiş gama sterilizasyonu yapılmış ve yapılmamış IgG yüklü PCL mikrokürelerin FTIR spektrumları salım ortamında bekletilmemiş gama sterilizasyonu yapılmış ve yapılmamış IgG yüklü PCL mikrokürelerin FTIR spektrumları ile karşılaştırılarak bozunma çalışması sonunda mikrokürelerin kimyasal yapılarında oluşan değişimler incelenmiştir (Şekiller 36 ve 37). Salım ortamına konmamış gama sterilizasyonu yapılmış ve yapılmamış IgG yüklü PCL mikrokürelerin FTIR spektrumları arasında belirgin bir fark gözlemlenmemiştir (Şekil 36). Her iki spektrumda da PCL'in karakteristik pikleri (ELZEIN, 2004) olan 2949 cm^{-1} civarında gözlemlenen asimetric CH_2 gerilme piki, 2865 cm^{-1} civarında gözlemlenen simetric CH_2 gerilme piki, 1727 cm^{-1} civarında gözlemlenen karbonil gerilme piki, 1293 cm^{-1} civarında gözlemlenen C-O ve C-C gerilme pikleri, 1240 cm^{-1} civarında gözlemlenen asimetric C-O-C gerilme piki ve 1157 cm^{-1} civarında gözlemlenen C-O ve C-C gerilme pikleri gözlemlenmiştir. Mikrokürelerin bozunma çalışması sonrası FTIR spektrumlarında PCL'in karakteristik FTIR piklerine ek olarak 2360 , 2337 , 1558.4 ve 668 cm^{-1} civarında yeni pikler gözlemlenmiştir. Bu pikler PCL'in bozunma ürünlerinden karbondioksitin (CO_2) varlığından kaynaklanmaktadır. 2360 ve 2337 cm^{-1} 'de görülen pikler CO_2 'e ait gerilme piki ve 668 cm^{-1} de görülen CO_2 'e ait eğilme titreşme pikidir. Literatüre bakıldığında karbondioksit 667 ve 2349 cm^{-1} 'de infrared aktif titreşmesine sahiptir (MURATA, 1997). 1558 cm^{-1} 'de gözlemlenen pik ise asimetric karboksilat anyonun gerilmesine aittir.

Bozunma çalışması sonucu elde edilen gama sterilizasyonu yapılmış ve yapılmamış IgG yüklü PEG-PCL-PEG mikrokürelerin FTIR spektrumları ile bozunma çalışması öncesinde elde edilen gama sterilizasyonu yapılmamış IgG yüklü PEG-PCL-PEG mikrokürelerin FT-IR spektrumları arasında belirgin bir fark gözlemlenmemiştir (Şekil 37). Bütün spektrumlarda PEG-PCL-PEG triblok kopolimerinin karakteristik pikleri gözlemlenmiştir. Kısaca, PCL segmentinden kaynaklanan $2935 - 2938\text{ cm}^{-1}$ aralığında gözlemlenen asimetric CH_2 gerilme piki, PCL ve PEG segmentinden kaynaklanan 2865 cm^{-1} civarında gözlemlenen C-H bağının gerilme ve titreşmesi piki, PCL segmentinden kaynaklanan 1721 cm^{-1} civarında gözlemlenen karbonil piki, PCL segmentinden kaynaklanan 1238 cm^{-1} 'de gözlemlenen asimetric C-O-C gerilme piki ve 1293 cm^{-1} 'de gözlemlenen C-O ve C-C gerilme pikleri, PEG segmentinden kaynaklanan 1105 cm^{-1} civarında gözlemlenen OCH_2CH_2 yapısındaki C-O gerilmesine ait pik ve 1065 cm^{-1} civarında gözlemlenen C-O-C gerilmesi piki ve son olarak 840 cm^{-1} 'de gözlemlenen PEG segmenti kaynaklı metilen grubu piki bu karakteristik pikleri oluşturmaktadır. Ayrıca, bağlayıcı ajandan kaynaklanan ve 1470 cm^{-1} civarında gözlemlenen N-H bükülme titreşme piki de bütün spektrumlarda gözlemlenmiştir. Fakat 6 aylık inkübasyon sonunda gama sterilizasyonu yapılmış

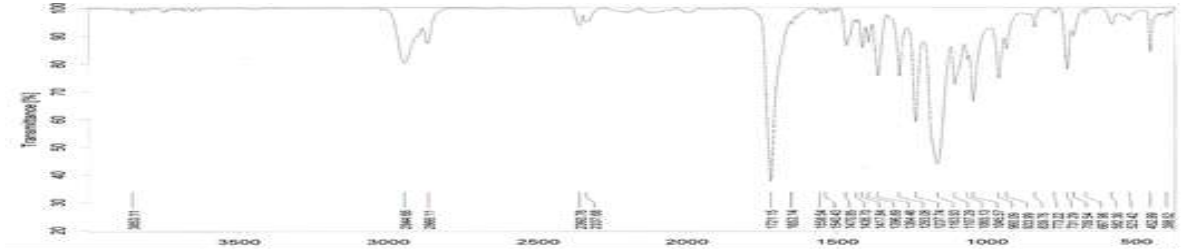
IgG yüklü PEG-PCL-PEG mikrokürelerin FT-IR spektrumunda 3329.47 cm^{-1} civarındaki bant bozunma çalışması öncesindeki PEG-PCL-PEG mikrokürelerin FT-IR spektrumundaki banda oranla daha belirginleşmiştir. Bu pik, PCL zincir kopması sonucunda oluşan hidroksil ve karboksil uç gruplarının oluştuğunu göstermektedir. Daha önceki bir çalışmada, polikaprolakton diolü ve polietilenglikol diasit kullanılarak sentezlenen polioksietilen-polikaprolakton multiblok kopolimeri ile hazırlanan filmlerin 37°C 'de fosfat tamponda (pH 7.4) 70 hafta boyunca bozunma çalışılmıştır (LI, 1998). Benzer şekilde, PCL zincir kopması sonucunda oluşan hidroksil ve karboksil uç gruplarının oluşmasını gösteren 3520 cm^{-1} 'deki bandın 11. haftadan itibaren süre arttıkça daha belirginleştiğini gözlemlemişlerdir.



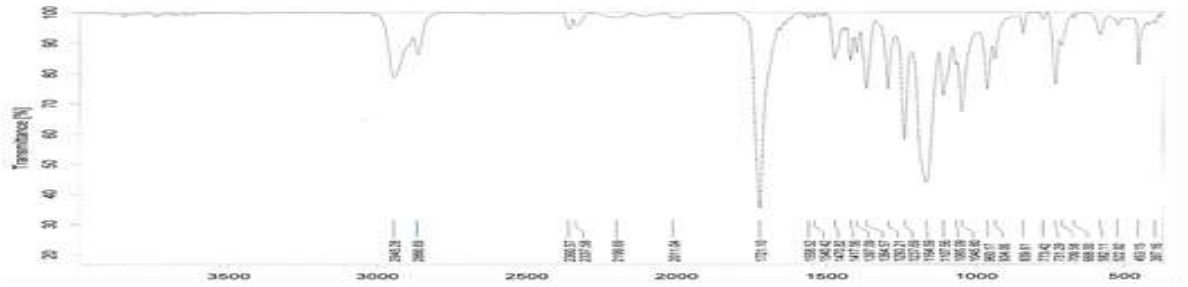
(A)



(B)

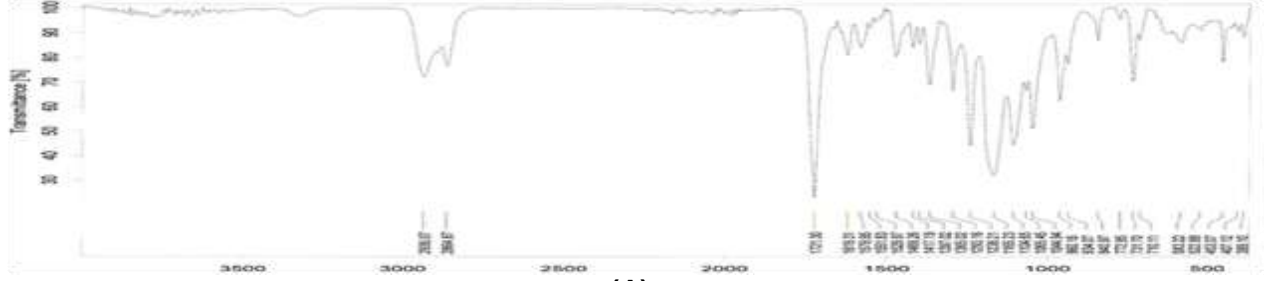


(C)



(D)

Şekil 36. Hazırlanan IgG yüklü PCL mikrokürelerin bozunma çalışması öncesinde ve sonrasında FTIR spektrumları: Bozunma çalışması öncesinde A) Gama sterilizasyonu yapılmamış, B) Gama sterilizasyonu yapılmış mikrokürelerin FTIR spektrumları, Bozunma çalışması sonrasında C) Gama sterilizasyonu yapılmamış, D) Gama sterilizasyonu yapılmış mikrokürelerin FTIR spektrumları



(A)



(B)



(C)



(D)

Şekil 37. Hazırlanan IgG yüklü PEG-PCL-PEG mikrokürelerin bozunma çalışması öncesinde ve sonrasında FTIR spektrumları: Bozunma çalışması öncesinde A) Gama sterilizasyonu yapılmamış, B) Gama sterilizasyonu yapılmış mikrokürelerin FTIR spektrumları bozunma

çalışması sonrasında C) Gama sterilizasyonu yapılmamış, D) Gama sterilizasyonu yapılmış mikrokürelerin FTIR spektrumları

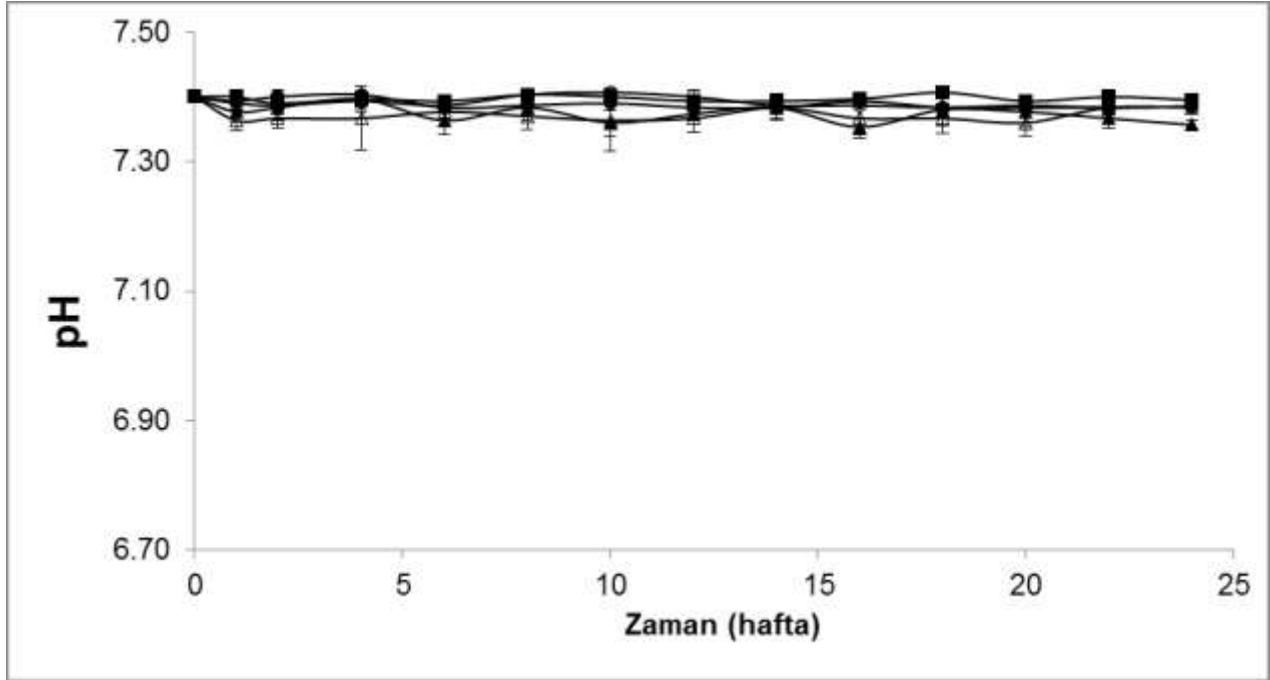
6 ay boyunca fosfat tamponunda bekletilmiş gama sterilizasyonu yapılmış veya yapılmamış IgG yüklü PCL veya PEG-PCL-PEG mikrokürelerin sayıca ortalama moleküler ağırlıkları (M_n) ve ağırlıkça ortalama molekül ağırlıkları (M_w) Tablo 16'da verilmiştir. GPC sonuçlarına bakıldığında, her iki mikroküre grubunda da gama sterilizasyonu sonrasında sayıca ortalama molekül ağırlığı azalırken ağırlıkça ortalama molekül ağırlığı artmıştır. Cottam ve ark. (COTTAM, 2009) gama sterilizasyonun PCL'in biyomalzeme özellikleri üzerindeki etkilerini incelemiş ve gama ışınması ile sterilize edilen PCL'in M_n değerinde düşüş ve M_w değerinde artış gözlemlemişlerdir. Gama ışınması semikristalin yapıdaki PCL'in amorf bölgelerine etki ederek zincir kopmasına neden olduğundan M_n değerinde düşüş, aynı zamanda çapraz bağlanmaya neden olduğundan M_w değerinde artış görülmektedir (MASSON, 1997, COTTAM, 2009). Gama ışınması ile sterilize edilen PEG-PCL-PEG mikrokürelerin ise M_n ve M_w değerlerinin ikisinde de düşüş gözlemlenmiştir. Fakat, M_n değerindeki düşüş M_w değerindeki düşüşe oranla daha fazladır. Daha önceki bir çalışmada, farklı dozlardaki gama ışınlamalarının (5, 15, 25 and 50 kGy doz) PEGd, IPLA ve PEG-PLGA multiblok kopolimerleri üzerindeki etkileri incelenmiştir ve gama ışınlamasının bütün dozlarında M_n değerindeki düşüşün M_w değerindeki düşüşe oranla daha yüksek olduğunu gözlemlemişlerdir (DORATI, 2008a). Bu sonucun, gama ışınlamasının tetiklediği bozunma reaksiyonunun daha çok polimer zincirlerindeki son gruplar üzerinden ilerleyen bir mekanizma (unzipping mechanism) olması sonucu gözlemlendiğini ve bu mekanizmanın M_w değerlerinden daha çok M_n değerlerini etkilediğini düşünmektedirler. 6 aylık bozunma çalışması sonunda, gama sterilizasyonu yapılmış veya yapılmamış PCL mikrokürelerin M_n ve M_w değerlerinde belirgin bir değişim olmamıştır. PCL yapısındaki ester bağlarının kütleli (bulk) hidrolizi ile bozunmaktadır ve bozunma/erozyon düzeyleri ve hızları kimyasal ve kristal yapıya, molekül ağırlığına ve diğer faktörlere bağlı olarak değişebilmektedir (LIN W.J., 2008) Oldukça kristal yapılı ve hidrofobik olmasından dolayı PCL'in in vivo ortamda bozunma süresi yaklaşık iki yıldır (PRABHAKAR, 2005). PCL ve PCL-TCP kompozit yapısının alkali vasat kullanılarak hızlandırılmış bozunma koşulları ile fosfat tampon çözeltisi kullanılarak sağlanan bozunma koşullarının karşılaştırıldığı bir çalışmada PCL hızlandırılmış ortamda 4 haftada bozunurken fosfat tamponunda ancak 60 ayda tamamen bozunduğunu gözlemlemişlerdir (LAM, 1977). 6 aylık inkübasyon sonunda, gama sterilizasyonu yapılmamış PEG-PCL-PEG mikrokürelerin M_n ve M_w değerlerinde belirgin bir değişim olmamıştır. Fakat, gama sterilizasyonu yapılmış PEG-PCL-PEG mikrokürelerin M_n ve M_w değerlerinde diğer

gruplara oranla daha fazla bir düşüş olmuştur. Kopolimerlerde bulunan PEG segmenti gama ışınlamasına bağlı olarak oksidasyondan daha kolay etkilenebilmektedir (DECKER, 1977). Daha önceki bir çalışmada da, 25 kGy gama ışınlamasına maruz bırakılan PEGd, IPLA and PEG-PLGA multiblok kopolimerlerin ışınlama sonucu oluşan bozunma reaksiyonlarını oksijen varlığının nasıl etkilediği çalışılmıştır (DORATI, 2008b). Oksijen moleküllerinin polimerin amorf kısmına girdiğinde, serbest hidrojen atomları ile reaksiyona girerek amorf alanları arttırdığını ve M_n ve M_w değerlerinde düşmeye neden olan yarıklar oluşturabildiğini düşünmektedirler.

Tablo 16. Bozunma çalışması öncesinde ve sonrasında gama sterilizasyonu yapılmış veya yapılmamış IgG yüklü PCL veya PEG-PCL-PEG mikrokürelerin sayıca ortalama moleküler ağırlıkları (M_n) ve ağırlıkça ortalama molekül ağırlıkları (M_w)

	M_n (g/mol)	M_w (g/mol)
Gama sterilizasyonu yapılmamış PCL mikroküreler (bozunma çalışması öncesi)	29 250	69 702
Gama sterilizasyonu yapılmış PCL mikroküreler (bozunma çalışması öncesi)	10 072	73 866
Gama sterilizasyonu yapılmamış PCL mikroküreler (bozunma çalışması sonrası)	27 350	65 702
Gama sterilizasyonu yapılmış PCL mikroküreler (bozunma çalışması sonrası)	9678	70 678
Gama sterilizasyonu yapılmamış PEG- PCL-PEG mikroküreler (bozunma çalışması öncesi)	20 007	56 089
Gama sterilizasyonu yapılmış PEG-PCL-PEG mikroküreler (bozunma çalışması öncesi)	16 275	55 349
Gama sterilizasyonu yapılmamış PEG-PCL-PEG mikroküreler (bozunma çalışması sonrası)	17 784	51 686
Gama sterilizasyonu yapılmış PEG-PCL-PEG mikroküreler (bozunma çalışması sonrası)	10 978	46 920

Salım ortamının pH değerindeki değişimler polimer bozunma hızına ve mikrokürelere ortamı çıkan proteinin kararlılığına etki etmektedir (GITEAU, 2008). Ortamın asidik veya bazik olması durumunda protein denaturasyonu hızlanmaktadır. Ayrıca, salım ortamının pH'ı protein konformasyonuna da etki etmektedir. Asidik ortamlarda bazı proteinler agregat oluşturabilmektedir. Bu nedenlerden dolayı, bozunma çalışması boyunca belli aralıklarla gama sterilizasyonu yapılmış veya yapılmamış IgG yüklü PCL veya PEG-PCL-PEG mikrokürelere bulunduğu salım ortamının pH'sı ölçülmüştür. Ayrıca, bozunma çalışmasının koşullarında beklenen mikroküre içermeyen salım ortamının da pH'ı ölçülmüştür. Boş salım ortamı ile gama sterilizasyonu yapılmış veya yapılmamış mikroküre içeren salım örneklerinin 6 aylık zaman içindeki pH değişimleri Şekil 38'de verilmiştir. 6 ay boyunca salım ortamlarının pH değerleri çok fazla değişmemiştir ve mikroküre içeren salım ortamı ile boş salım ortam pH değerlerinin 7.36 ve 7.41 aralığında olduğu gözlemlenmiştir. Ortamının pH'ının korunması, mikrokürelere bozunma ürünlerinin ortamın pH'sını değiştirmediğini göstermektedir. Polilaktik asit (PLA) gibi diğer polimerlerle karşılaştırıldığında PCL ortam koşullarında daha kararlı bir yapı göstermektedir (HUTMACHER, 2000). Polilaktik asit ve poliglikolik asit gibi bozunma sırasında asidik ortam oluşmasına sebep olan diğer sentetik ilaç salım sistemleri ile karşılaştırıldığında PCL'in uzun süreli bozunma özelliği ilaç salımı sırasında asidik bir ortam oluşmasını engellemektedir (RAMESH, 2002). Ayrıca, PEG de bozunma sırasında pH değişimine neden olmamaktadır (BROWNSTEIN, 1981).



Şekil 38. Degradasyon çalışması süresi boyunca salım ortamının pH değişimi ■ mikrokürelerle inkübe edilmemiş fosfat tampon, o gama sterilizasyonu yapılmamış PCL mikrokürelerin bekletildiği fosfat tampon, ● gama sterilizasyonu yapılmış PCL mikrokürelerin bekletildiği fosfat tampon, △ gama sterilizasyonu yapılmamış PEG-PCL-PEG mikrokürelerin bekletildiği fosfat tampon, ▲ gama sterilizasyonu yapılmış PEG-PCL-PEG mikrokürelerin bekletildiği fosfat tampon

2.3.8. Biyouyumluluk Çalışması

Mikroküre hazırlama aşamasından kaynaklanabilecek sitotoksik etkileri incelemek için 3T3 fibroblastik hücreler boş mikrokürelerle 48 saat inkübe edilmiş ve inkübasyon sonrasında hücre morfolojisi, canlılığı ve sayısındaki değişimler incelenmiştir. 3T3 hücrelerde morfolojik değişimler, kontrol grubu hücrelerinin ve 2 gün boyunca PCL veya PEG-PCL-PEG mikroküreler ile inkübe edilmiş hücrelerin 10x ve 20x büyütmelemlerde faz kontrast mikrografilerinin karşılaştırılması ile incelenmiştir (Şekil 39). Kontrol grubu hücreler ve mikrokürelerle inkübe edilmiş hücrelerin morfolojilerinde bir farklılık gözlemlenmemiştir.



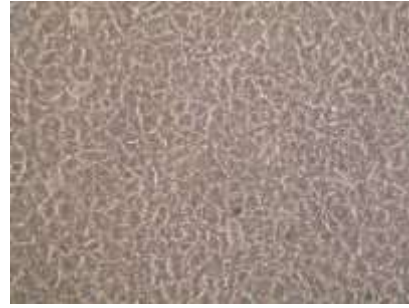
Kontrol Grubu (10x)



Kontrol Grubu (20x)



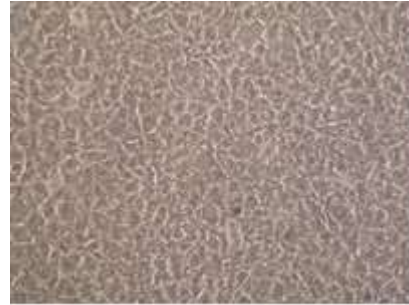
PCL mikroküreler ile inkübe edilmiş 3T3 hücreler (10x)



PCL mikroküreler ile inkübe edilmiş 3T3 hücreler (20x)



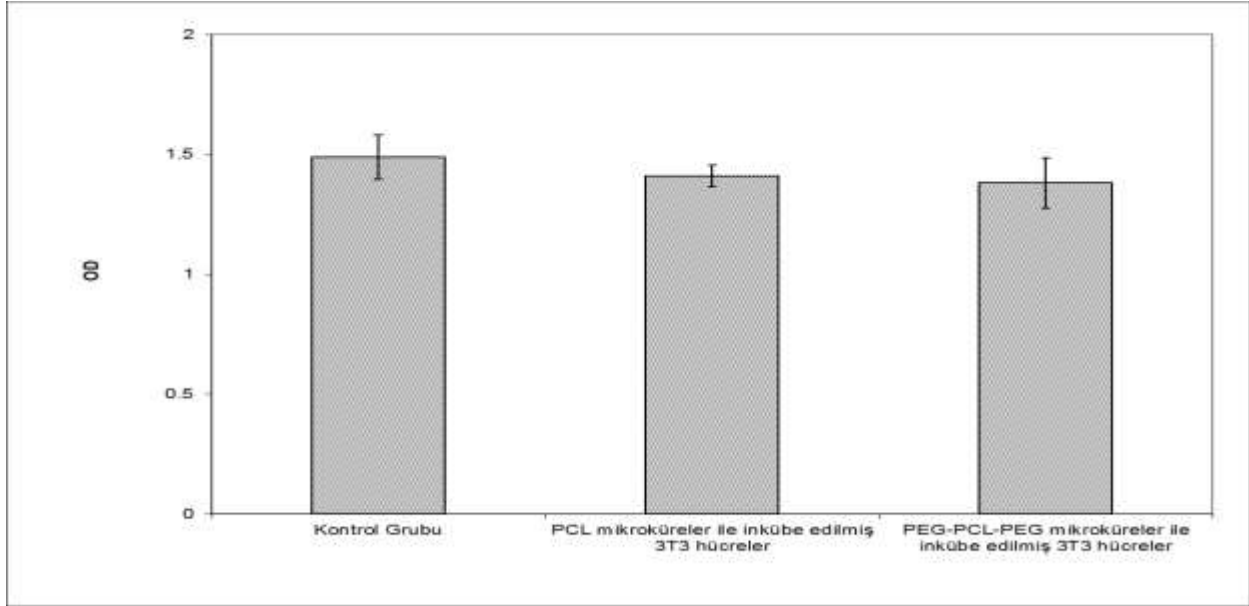
PEG-PCL-PEG mikroküreler ile inkübe edilmiş 3T3 hücreler (10x)



PEG-PCL-PEG mikroküreler ile inkübe edilmiş 3T3 hücreler (20x)

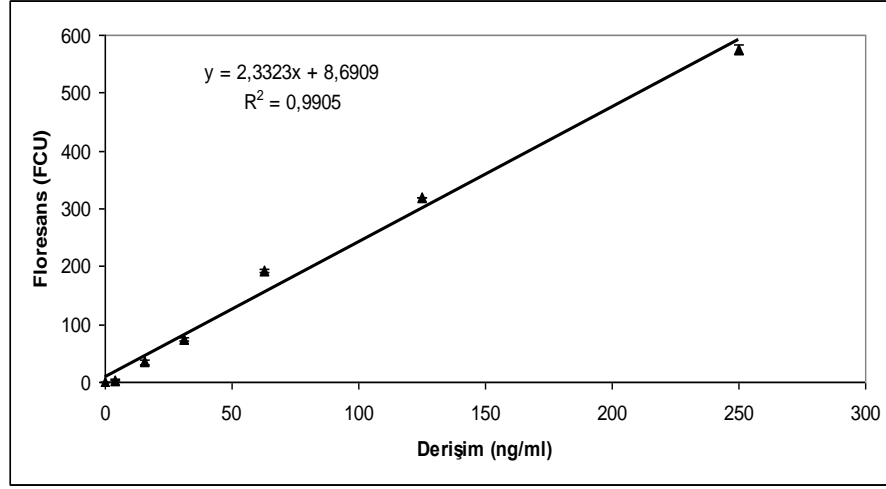
Şekil 39. Kontrol grubu ve 2 gün boyunca PCL veya PEG-PCL-PEG mikroküreler ile inkübe edilmiş 3T3 hücrelerinin 10x ve 20x büyütmelerde faz kontrast mikrografileri

3T3 hücrelerinin hücre canlılığı ise MTT testi sonrasında örneklerin ışık yoğunluklarının (optical density, OD) ölçülmesiyle değerlendirilmiştir (Şekil 40). MTT test sonunda kontrol grubu ve PCL veya PEG-PCL-PEG mikroküre ile inkübe edilmiş hücre gruplarının OD değerleri arasında istatistiksel bir fark görülmemiştir ($p \geq 0.05$).

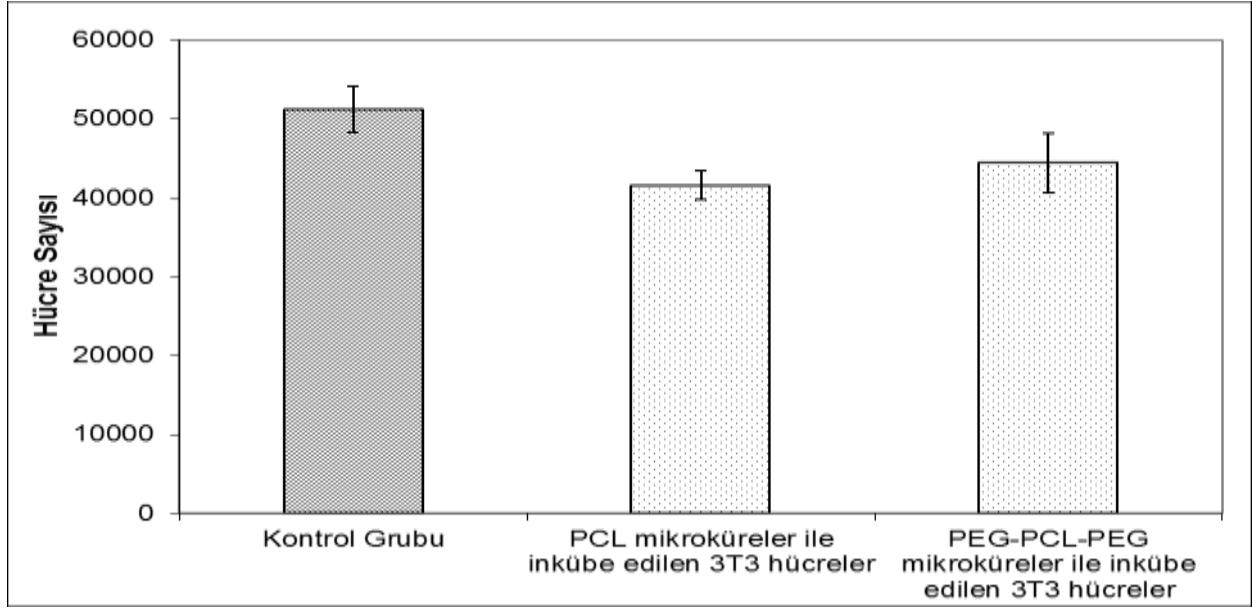


Şekil 40. Kontrol grubu ve 2 gün boyunca PCL veya PEG-PCL-PEG mikroküreler ile inkübe edilmiş 3T3 hücrelerinin OD değerleri

Boş PCL veya PEG-PCL-PEG mikrokürelerin 3T3 hücrelerle iki günlük inkübasyonu sonucunda, 3T3 hücre sayılarındaki değişim florimetrik olarak tayin edilen DNA miktarından hesaplanmıştır. İnkübasyon sonunda 3T3 hücre miktarını belirleyebilmek için distile su ile patlatılan hücrelerden ortama çıkan DNA miktarına bağlı floresans değerleri kullanılmıştır. Bu nedenle, DNA miktarlarını belirleyebilmek için belli derişimlerde siğır DNA'sı içeren standart çözeltilerinde floresansları okunarak kalibrasyon eğrisi oluşturulmuştur (Şekil 41). Bu kalibrasyon eğrisi kullanılarak ölçülen DNA miktarları hücre başına 7.2 pg DNA oranı kullanılarak hücre sayısına çevrilmiştir (Şekil 42). Kontrol grubu ve PCL veya PEG-PCL-PEG mikrokürelerle inkübe edilmiş hücre grubunun hücre sayıları arasında istatistiksel bir fark görülmemiştir ($p \geq 0.05$).



Şekil 41. DNA miktarlarını belirleyebilmek için belli derişimlerde sığır DNA'sı ile oluşturulan kalibrasyon eğrisi



Şekil 42. 2 günlük inkübasyon sonunda kontrol grubunda ve PCL veya PEG-PCL-PEG mikroküreler ile inkübe edilmiş grupta 3T3 hücre sayıları

İki basamaklı emülsiyon-çözücü uçurma metodunda kullanılan kloroform ve diklorometan gibi organik çözücüler hazırlanan mikrokürelerin yapısında rezidüel olarak kalabilmekte ve toksik etkiye neden olabilmektedir (O'DONNELL, 1997,DIAB, 2010). Bu nedenle, bu projede kullanılan hazırlama koşullarından kaynaklanabilecek herhangi bir toksik etkinin olup olmadığını incelemek için in vitro sitotoksisite deneyleriyle biyoyumluluk testleri yapılmıştır. Mikroskopik inceleme, MTT ve florimetri testi sonuçlarına bakıldığında PCL ve PEG-PCL-PEG mikrokürelere ortamda hücre canlılığını ve sayısını etkileyecek düzeyde herhangi bir toksik bir malzeme çıkmadığı gözlemlenmiştir. Ayrıca, biyobozunur, ve biyoyumlu bir polimer olan PCL kontrollü ilaç salım sistemleri ve diğer biyomalzeme araştırmalarında da sıklıkla kullanılan bir malzemedir (WILLIAMS, 2005,OH, 2007,LUCIANI, 2008,KARATAS, 2009,ERDEMLI, 2010). Bunun yanında, toksik özellik taşımayan PCL bozunma ürünleri vücut tarafından tamamen yok edilmektedir (HAO, 2002). Sudaki çözünürlüğü yüksek olan PEG, herhangi bir toksik, immunojenik veya antijenik etkiye neden olmamaktadır (VERONESE, 2005). Ayrıca, protein emilmesini engellemesi ve kanla temas eden malzemelerin biyoyumluluğunu artırması nedeniyle PEG biyomedikal alanda umut vaat eden polimerlerden biridir (KIM M.S., 2006). PCL ve PEG, ABD İlaç ve Gıda Uygulama Yönetimi (FDA) tarafından klinikte uygulanması onaylanmış birer biyomalzemedir (PITT, 1990,OH, 2007,ALEXIS, 2008,CHEN, 2008). Bu özelliklerinden dolayı, PCL ve PEG-PCL-PEG mikrokürelerin hücre canlılığına toksik bir etkisi gözlemlenmemiştir.

Aşama 3: Anti-TNF α Yüklü Polikaprolakton (PCL) ve Polietilen glikol-Polikaprolakton-Polietilen glikol (PEG-PCL-PEG) Mikrokürelerin Hazırlanması ve Karakterizasyonu

Aşama 3.1. Anti-TNF α Yüklü PCL ve PEG-PCL-PEG Mikrokürelerin Hazırlanması

Anti-TNF yüklü PCL mikroküreler model protein IgG kullanılarak belirlenen optimum mikroküre hazırlama koşullarıyla 10 mg/ml derişim ile hazırlanmıştır ve bu mikrokürelerin karakterizasyon analizleri yapılmıştır. Daha sonra anti-TNF α yüklü PCL mikrokürelerin serum içeren hücre kültür vasatı içerisindeki salım profillerinin incelenmesi çalışmasına 25 ve 50 mg/ml anti-TNF yüklü PCL mikroküreler de dahil edilmiştir. Hazırlanan üç farklı konsantrasyonda anti-

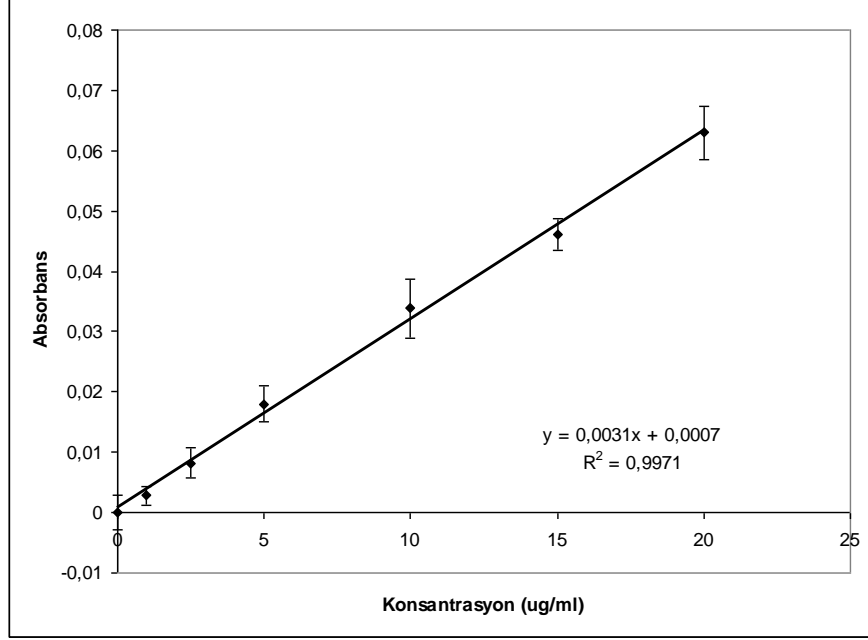
TNF α içeren PCL mikrokürenin yükleme verimliliği, fosfat tampon ortamındaki 7 günlük ve hücre kültür vasatı içerisindeki 60 günlük salım profilleri karşılaştırılarak projenin ilerleyen aşamalarında kullanılacak olan PCL ve PEG-PCL-PEG mikrokürelere 25 mg/ml anti-TNF α yüklenmesine karar verilmiştir. Daha sonra, hazırlanan 25 mg/ml anti-TNF α yüklü PCL ve PEG-PCL-PEG mikrokürelere karakterizasyon analizleri yapılmıştır.

Aşama 3.2. Anti-TNF α Yüklü PCL ve PEG-PCL-PEG Mikrokürelere Karakterizasyonu

3.2.1. Protein Yükleme Verimliliği

PCL ve PEG-PCL-PEG mikrokürelere hapsedilen anti-TNF α protein miktarının belirlenmesi için verilen BCA metodu kullanılmış ve belli konsantrasyonlarda anti-TNF α standart çözeltileri ile kalibrasyon eğrisi oluşturulmuştur (Şekil 43).

Projenin son aşamasında hücre kültür çalışmalarında kullanılacak mikrokürelere belirlenmesi için hazırlama aşamasında kullanılan protein miktarının hapsedme yüzdesi üzerinde etkisi incelenmiştir. Bunun için farklı konsantrasyonlarda anti-TNF α (10, 25 ve 50 mg/ml) yüklenerek hazırlanmış PCL mikrokürelere protein yükleme verimlilikleri karşılaştırılmıştır (Tablo 17). Hazırlanan 10 mg/ml anti-TNF α yüklü PCL mikrokürelere protein yükleme verimliliği (% 50.29 \pm 3.03) optimizasyon basamağında hazırlanan IgG model protein yüklü PCL mikrokürelere protein yükleme verimliliğine (% 54.0 \pm 1.32) oldukça yakın bir değer olduğu gözlemlenmiştir. Hazırlanan 25 ve 50 mg/ml anti-TNF α yüklü PCL mikrokürelere protein yükleme verimliliği ise IgG model protein yüklü PCL mikrokürelere protein yükleme verimliliğine oranla daha yüksek çıkmıştır. Önceki çalışmalara bakıldığında, iki basamaklı emülsiyon-çözücü uçurma metoduyla hazırlanan insulin yüklü PCL mikrokürelere protein yükleme verimlilikleri hazırlama koşullarının değiştirilmesiyle % 28.3 ile % 53 aralığında bulunmuştur (MUKERJEE, 2006). Yine iki basamaklı emülsiyon-çözücü uçurma metoduyla hazırlanan BSA yüklü PCL mikrokürelere protein yükleme verimlilikleri hazırlama koşullarının değiştirilmesiyle % 29.1'den % 62.9'ye değişen değerlerde gözlemlenmiştir (COCCOLI, 2008).



Şekil 43. Anti-TNF α yüklü PCL ve PEG-PCL-PEG mikrokürelerin protein yükleme verimliliğinin belirlenmesi için BCA analizi ile oluşturulan anti-TNF α kalibrasyon eğrisi

Hazırlanan 25 ve 50 mg/ml anti-TNF α yüklü PCL mikrokürelerin protein yükleme verimliliği, 10 mg/ml anti-TNF α yüklü PCL mikrokürelerin protein yükleme verimliliğinden belirgin olarak yüksek bulunmuştur ($p \leq 0.05$). Fakat, 25 ve 50 mg/ml anti-TNF α yüklü PCL mikrokürelerin protein yükleme verimlilikleri arasında belirgin bir fark gözlemlenmemiştir ($p > 0.05$). Youan ve ark. (YOUAN, 1999) yaptığı bir çalışmada, iki basamaklı emülsiyon-çözücü uçurma yöntemi ile hazırlanan protein yüklü PCL mikrokürelerin organik çözücü, protein/polimer oranı, PCL'in moleküler ağırlığı ve iç faz/organik faz oranı gibi parameterleri değiştirilerek protein yükleme verimliliğine etkileri incelenmiş ve protein polimer oranı arttıkça protein yükleme verimliliğinin arttığını gözlemlemişlerdir.

Farklı iç faz anti-TNF α konsantrasyonu (10, 25 ve 50 mg/ml) ile hazırlanan PCL mikrokürelerin karakterizasyonu sonucunda projenin son aşamasında kullanılacak anti TNF α yüklü mikrokürelerin iç faz anti-TNF α konsantrasyonu 25 mg/ml olarak belirlenmiştir. Bu nedenle, bu iç faz protein konsantrasyonuna sahip anti-TNF α yüklü PEG-PCL-PEG mikroküreler hazırlanmıştır ve protein yükleme verimliliği Tablo 17'de verilmiştir. Anti-TNF α yüklü PEG-PCL-PEG mikrokürelerin protein yükleme verimliliği ($75.91 \pm 1.16\%$), sonuçları Bölüm 2.3.1'de verilen IgG yüklü PEG-PCL-PEG mikrokürelerin protein yükleme verimliliğine ($74.32 \pm 3.45\%$)

yakın bulunmuştur. Hazırlanan anti-TNF α yüklü PEG-PCL-PEG mikrokürelerin yükleme verimliliği, farklı konsantrasyonlarda anti-TNF α yüklenmiş PCL mikrokürelerin protein yükleme verimliliklerinden belirgin olarak yüksek gözlemlenmiştir ($p \leq 0.05$). Bölüm 2.3.1’de bahsedildiği gibi, PEG-PCL-PEG yapısındaki hidrofilik PEG segmenti hidrofobik PCL polimer ve protein arasındaki etkileşimi geliştirerek mikrokürelerin protein yükleme verimliliklerinin artmasına neden olmuştur.

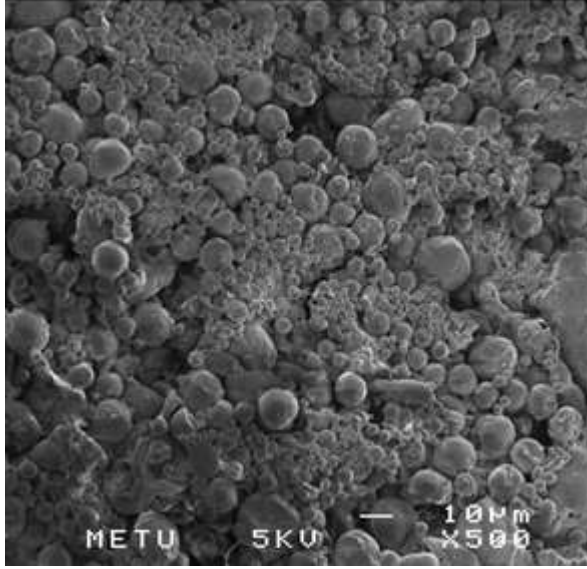
Tablo 17. Farklı miktarlarda anti-TNF α yüklü PCL ve 25 mg/ml anti-TNF α yüklü PEG-PCL-PEG mikrokürelerin protein yükleme verimliliği

	Protein Yükleme Verimliliği, %
10 mg/ml anti-TNF α yüklü PCL mikroküreler	50.29 \pm 3.03 *, #, ^
25 mg/ml anti-TNF α yüklü PCL mikroküreler	65.37 \pm 1.80 *, <
50 mg/ml anti-TNF α yüklü PCL mikroküreler	60.09 \pm 4.56 #, >
25 mg/ml anti-TNF α yüklü PEG-PCL-PEG mikroküreler	75.91 \pm 1.16 ^, <, >

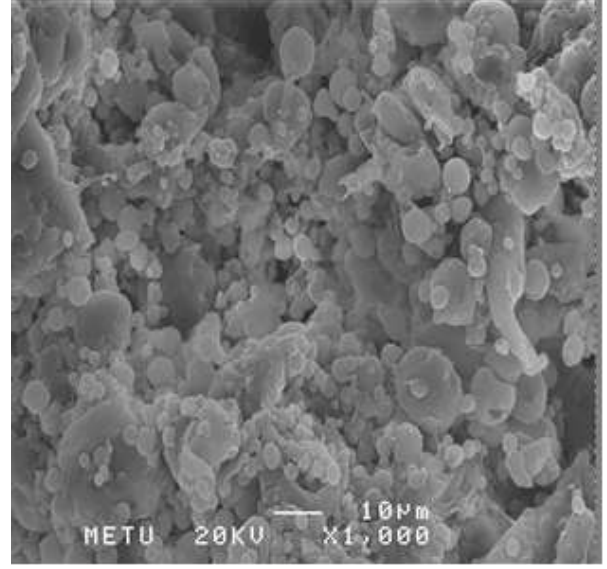
***, #, ^, <, > Gruplar arası belirgin farklılıkları göstermektedir ($p \leq 0.05$)**

3.2.2. Yüzey Morfolojisi

Hazırlanan anti-TNF α yüklü PCL ve PEG-PCL-PEG mikrokürelerin genel görünüşleri ve yüzey morfoloji özellikleri SEM analizi ile incelenmiş ve Şekil 44’de verilmiştir. SEM analizi sonucunda, hazırlanan mikrokürelerin küre şeklinde oldukları gözlemlenmiştir. Ayrıca, hazırlanan mikrokürelerin gözeneksiz bir yüzeye sahip oldukları görülmüştür.



(A)

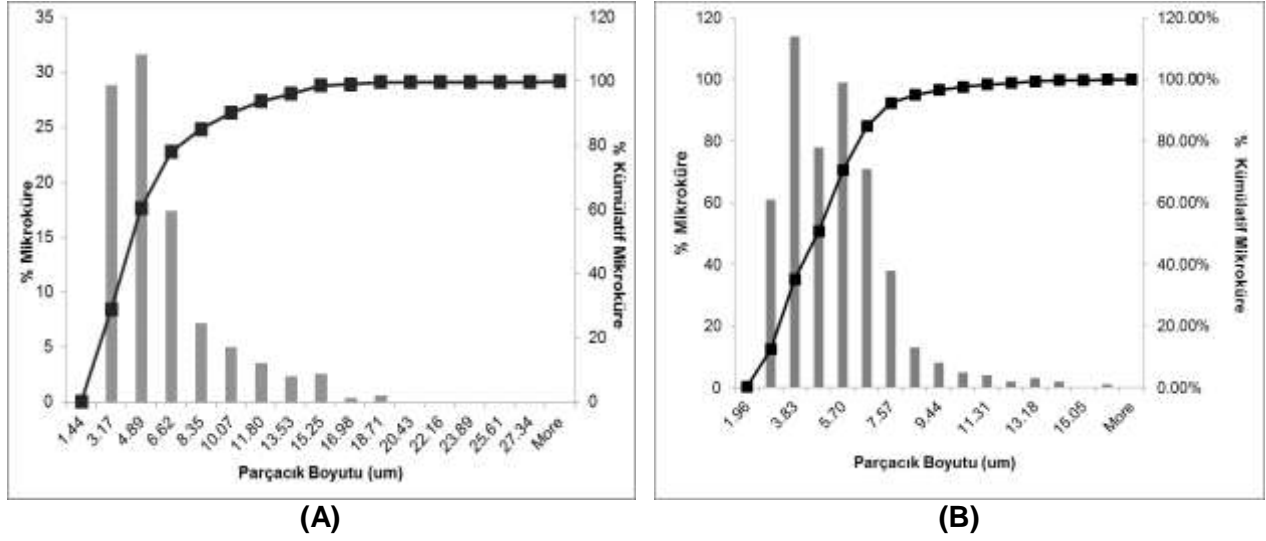


(B)

Şekil 44. Gama sterilizasyonu yapılmış anti-TNF α yüklü PCL (A) ve PEG-PCL-PEG (B) mikrokürelerin genel SEM görüntüsü

3.2.3. Boyut Analizi

Gama sterilizasyonu yapılmış anti-TNF α yüklü PCL ve PEG-PCL-PEG mikrokürelerin ortalama parçacık büyüklüğü ve dağılımını belirlemek için SEM görüntülerinden Image J programı kullanılarak mikrokürelerin çaplarının belirlenmesi yöntemi kullanılmıştır. Bu analiz sonucunda, mikrokürelerin parçacık boyut dağılımını gösteren eşit aralıklarla oluşturulmuş mikroküre boyutuna karşı yüzde miktarları histogramı ve kümülatif aritmetik eğri elde edilmiştir (Şekil 45). Ayrıca, hazırlanan mikrokürelere ait parçacık boyut ölçüm parametreleri de belirlenmiştir (Tablo 18). Tablo 18’de verilen anti-TNF α yüklü PCL mikrokürelerin ortalama parçacık boyutu ($5.22 \pm 0.15 \mu\text{m}$) ile anti-TNF α yüklü PEG-PCL-PEG mikrokürelerin ortalama parçacık boyutu ($4.96 \pm 0.09 \mu\text{m}$) arasında belirgin bir fark gözlemlenmemiştir ($p > 0.05$). Ayrıca, anti-TNF α yüklü PCL ve PEG-PCL-PEG mikrokürelerin boyutları ve Bölüm 2.3.3 Tablo 10’da verilen IgG yüklü PCL ve PEG-PCL-PEG mikrokürelerin boyutları arasında da belirgin bir fark gözlemlenmemiştir ($p > 0.05$).



Şekil 45. Gama sterilizasyonu yapılmış anti-TNF α yüklü PCL (A) ve PEG-PCL-PEG (B) mikrokürelerin parçacık boyut dağılımını gösteren histogram ve % kümülatif mikroküre eğrileri

Tablo 18. Gama sterilizasyonu yapılmış anti-TNF α yüklü PCL ve PEG-PCL-PEG mikrokürelerin SEM görüntülerinden elde edilen parçacık boyut ölçüm değerleri

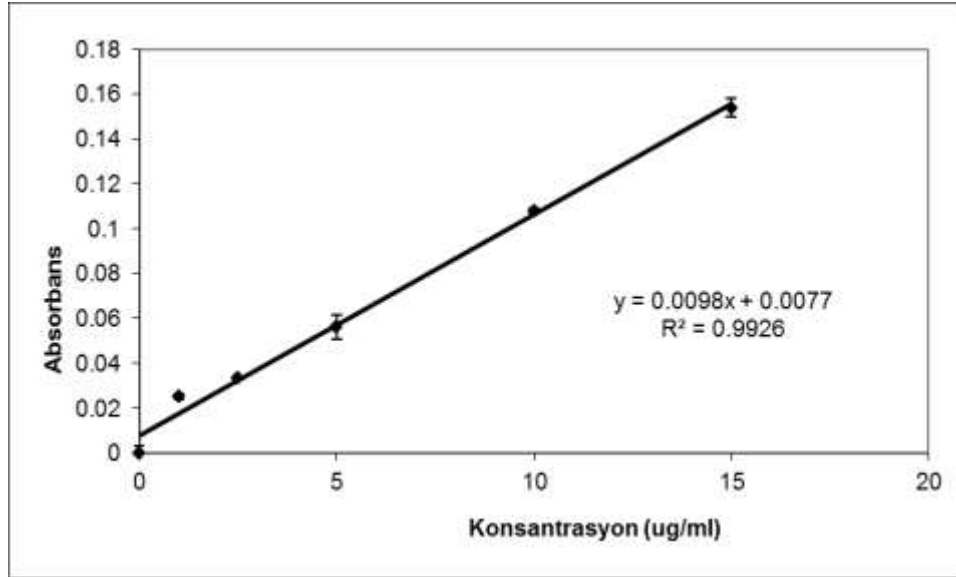
	Ortalama Parçacık Boyutu	Mod	Medyan
Gama sterilizasyonu yapılmış anti-TNF α yüklü PCL mikroküreler	5.22 \pm 0.15 μ m	3.67 μ m	4.12 μ m
Gama sterilizasyonu yapılmış anti-TNF α yüklü PEG-PCL-PEG mikroküreler	4.96 \pm 0.09 μ m	3.67 μ m	4.72 μ m

Tüm gruplar birbirinden $p \leq 0.05$ seviyesinde istatistiksel olarak farklı bulunmamıştır.

3.2.4. Salım Profili

3.2.4.1. Fosfat Tampon Ortamında Salım Profili

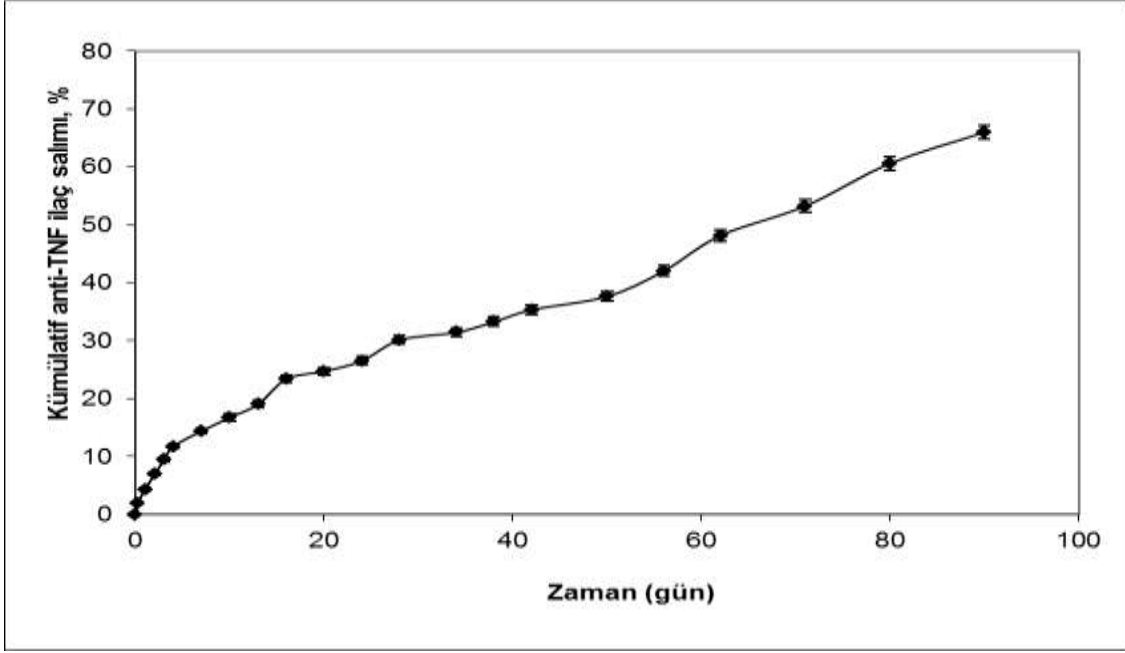
Bu projede, en az 3 ay kontrollü salım sağlayacak bir biyoaktif ajan yüklü mikroküre sistemi geliştirilmesi hedeflenmektedir. Bu amaçla, model protein IgG kullanılarak belirlenen optimum mikroküre hazırlama koşullarıyla hazırlanan anti-TNF α yüklü mikrokürelerin gama sterilizasyonu sonrasında ortama salınan anti-TNF α ilaç miktarlarını belirleyebilmek için BCA yöntemi kullanılmıştır. Salım çalışmaları sırasında PCL ve PEG-PCL-PEG mikrokürelerden ortama salınan anti-TNF α ilaç miktarını belirleyebilmek için belli konsantrasyonlarda salım ortamı içinde anti-TNF α standart çözeltileri hazırlandıktan sonra BCA metodu kullanılarak kalibrasyon eğrisi oluşturulmuştur (Şekil 46).



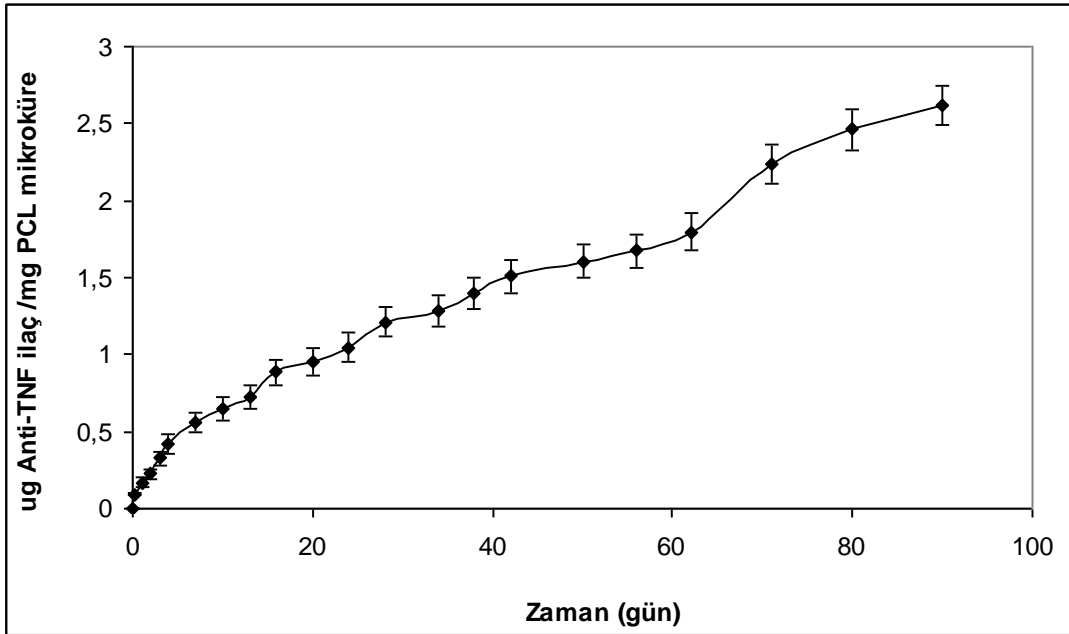
Şekil 46. Salım çalışmaları için BCA analizinde kullanılan anti-TNF α kalibrasyon eğrisi

Projenin ilk aşamalarında, 10 mg/ml anti-TNF α yüklü PCL mikroküreler hazırlanmış ve hazırlanan mikrokürelerin gama sterilizasyonu sonrasında ortama salınan anti-TNF ilaç miktarları belirlenmiştir. Ortama salınan protein miktarları mikrokürelerin BCA yöntemiyle belirlenen protein yükleme verimliliğine bölünerek salım sırasında ortama çıkan %

kümülatif protein miktarları belirlenmiştir (Şekil 47). Ayrıca, salım sırasında 1 miligram mikroküreden zamanla ortama çıkan proteinin mikrogram cinsinden miktarları da belirlenmiştir. (Şekil 48). Gama sterilizasyonu yapılmış 10 mg/ml anti-TNF α yüklü PCL mikrokürelerden ve sonuçları Bölüm 2.2.4'de verilen gama sterilizasyonu yapılmış IgG yüklü PCL mikrokürelerden 3 aylık kümülatif protein salımlarının benzer bir profile sahip olduğu gözlemlenmiştir. Gama sterilizasyonu yapılmış IgG yüklü PCL mikroküreler ve anti-TNF α yüklü PCL mikrokürelerden 6. saatte, 7. ve 90. günde ortama çıkan toplam protein miktarları Tablo 19'da verilmiştir. IgG yüklü PCL mikroküreler ve anti-TNF α yüklü PCL mikrokürelerden ilk 6 saatte ortama çıkan toplam protein miktarları (initial burst), 7. gün ve 90. günde ortama çıkan toplam protein miktarları kendi aralarında karşılaştırıldığında ortama salınan protein miktarları arasında belirgin bir fark gözlemlenmiştir ($p = 0.05$). PCL mikrokürelerden ortama çıkan anti-TNF miktarları ortama çıkan IgG miktarlarından belirgin olarak azdır. Anti-TNF α , IgG proteinine göre daha yavaş bir salım profili göstermiştir. BCA analizi sonrasında elde edilen sonuçlara bakıldığında PCL mikroküre sisteminin projede hedeflendiği gibi 3 ay boyunca model proteinin (IgG) ve anti-TNF ilacın kontrollü salımını sağladığı gözlemlenmiştir.



Şekil 47. Gama sterilizasyonu yapılmış anti-TNF α yüklü PCL mikrokürelerin BCA yöntemi ile incelenen 3 aylık salım profili (n=4)



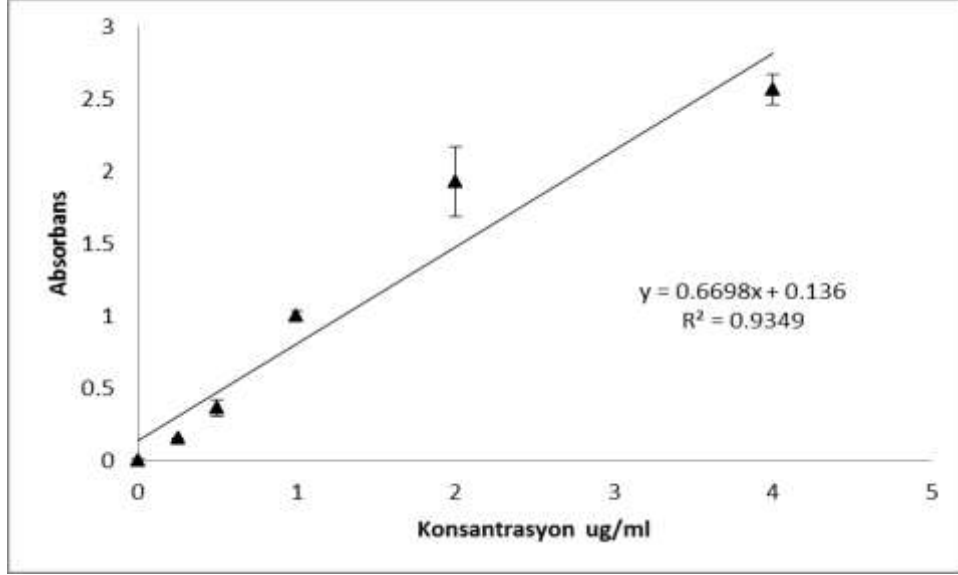
Şekil 48. Gama sterilizasyonu yapılmış anti-TNF α yüklü PCL mikrokürelerin BCA yöntemi ile incelenen 3 aylık mg mikroküre başına ortama çıkan μ g ilaç salım profili (n=4)

Tablo 19. Farklı zamanlarda gama sterilizasyonu yapılmış PCL mikrokürelerden ortama çıkan IgG ve anti-TNF α BCA yöntemi ile belirlenen miktarları

	IgG yüklü PCL mikroküreler		Anti-TNF α yüklü PCL mikroküreler	
	Kümülatif salım, %	μg protein/mg mikroküre	Kümülatif salım, %	μg protein/mg mikroküre
6. saat salım örneği	2.51 \pm 0.37 *	0.13 \pm 0.01 <	1.99 \pm 0.12 *	0.09 \pm 0.004 <
7. gün salım örneği	18.69 \pm 0.82 ^	0.96 \pm 0.14 >	14.41 \pm 0.49 ^	0.56 \pm 0.06 >
90. gün salım örneği	75.93 \pm 1.61 #	3.54 \pm 0.38 ‘	65.99 \pm 1.26 #	2.62 \pm 0.13 ‘

*,#,<,>,' Gruplar arası belirgin farklılıkları göstermektedir ($p \leq 0.05$)

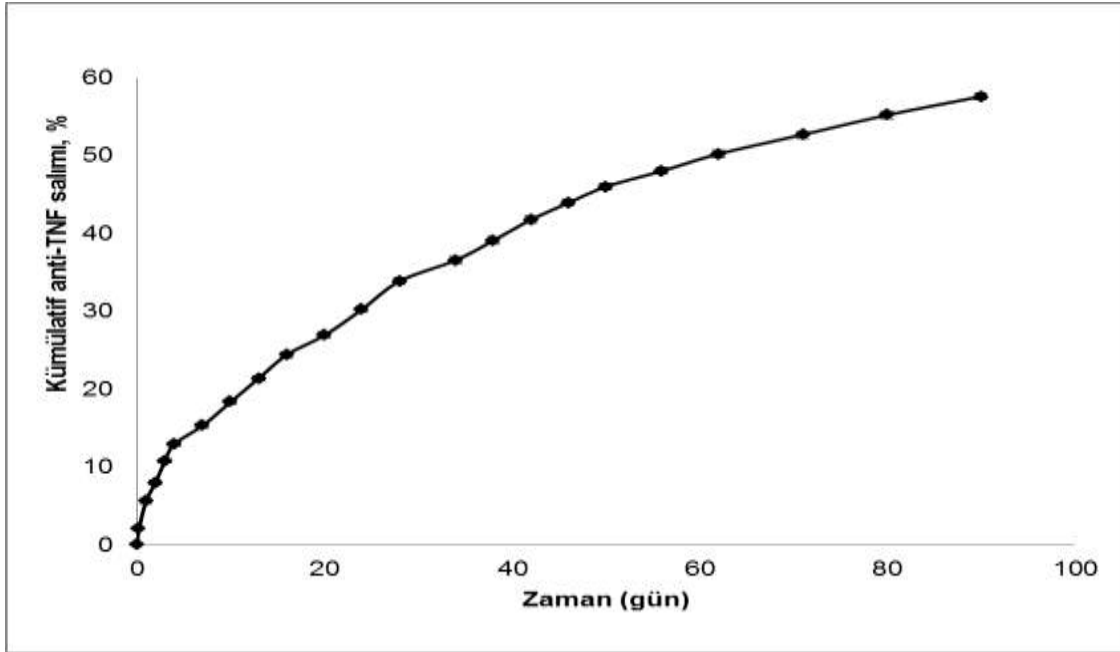
10 mg/ml anti-TNF α yüklü PCL mikrokürelerden farklı zamanlarda ortama çıkan biyolojik olarak aktif anti-TNF protein ilaç miktarını belirlemek için 3 ay boyunca farklı zamanlarda salım ortamından alınan örnekler enzime bağlı immünosorban (ELİZA) testi ile incelenmiştir. Salım çalışmaları sırasında PCL mikrokürelerden ortama salınan anti-TNF α ilaç miktarını belirleyebilmek için belli konsantrasyonlarda anti-TNF α standart çözeltileri hazırlandıktan sonra ELİZA yöntemi kullanılarak kalibrasyon eğrisi oluşturulmuştur (Şekil 49).



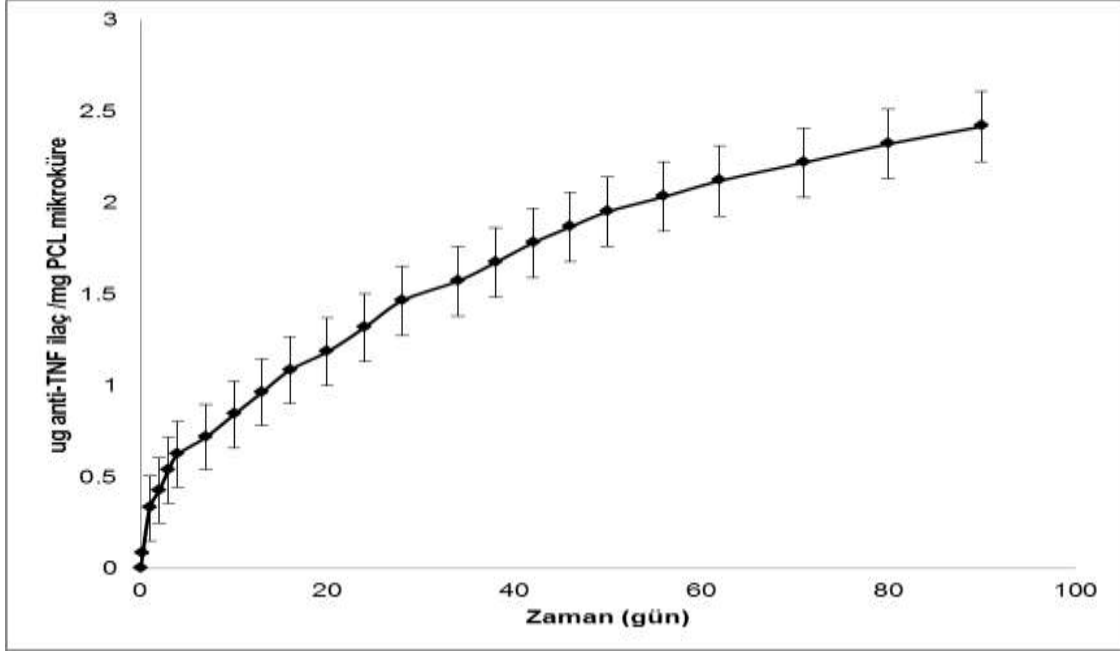
Şekil 49. Salım çalışmaları için ELİZA analizinde kullanılan anti-TNF α kalibrasyon eğrisi

10 mg/ml anti-TNF α yüklü PCL mikrokürelerin gama sterilizasyonu sonrasında ortama salınan biyolojik olarak aktif anti-TNF α ilaç miktarları mikrokürelerin BCA yöntemiyle belirlenen protein yükleme miktarlarına bölünerek salım sırasında ortama çıkan %kümülatif protein miktarları belirlenmiştir (Şekil 50). Ayrıca, salım sırasında 1 miligram mikroküreden zamana bağlı ortama çıkan proteinin mikrogram cinsinden miktarları da belirlenmiştir. (Şekil 51). Gama sterilizasyonu yapılmış anti-TNF yüklü mikrokürelerden ve sonuçları 2.2.5’de verilen gama sterilizasyonu yapılmış IgG yüklü PCL mikrokürelerden 3 aylık kümülatif protein salımlarının benzer bir profile sahip olduğu gözlemlenmiştir. Gama sterilizasyonu yapılmış IgG yüklü PCL mikroküreler ve anti-TNF α yüklü PCL mikrokürelerden farklı zamanlarda ortama çıkan biyolojik olarak aktif protein miktarları Tablo 20’de verilmiştir. IgG yüklü veya anti-TNF α yüklü PCL mikrokürelerden ilk 6 saatte ortama çıkan biyolojik olarak aktif protein miktarları (initial burst) karşılaştırıldığında ortama salınan biyolojik olarak aktif protein miktarları arasında belirgin bir fark gözlemlenmemiştir ($p > 0.05$). 7. gün ve 90. günde ortama çıkan protein miktarları kendi aralarında karşılaştırıldığında ise ortama salınan biyolojik olarak aktif protein miktarları arasında belirgin bir fark gözlemlenmiştir ($p = 0.05$). PCL mikrokürelerden ortama çıkan biyolojik olarak aktif anti-TNF α miktarları ortama çıkan biyolojik olarak aktif IgG miktarlarına göre belirgin olarak artmıştır. Ayrıca, ELİZA yöntemi ile belirlenen farklı zamanlarda ortama çıkan protein miktarlarının BCA yöntemi ile gözlemlenen miktarlara oranları da Tablo 21’de verilmiştir. Bu sonuçlar incelendiğinde, PCL mikrokürelerden ilk 6 saatte ve 7. günde ortama salınan anti-

TNF α ilaç biyolojik aktivitesini tamamen korurken ortama salınan IgG ilk 6 saatte biyolojik aktivitesinin % 58.4'ünü, 7. günde ise biyolojik aktivitesinin % 21.7'sini koruyabilmiştir. 3 aylık salım sonunda ortama çıkan toplam anti-TNF α ilacın % 87'si biyoaktivitesini korurken ortama çıkan toplam IgG proteinin sadece % 36.2'si biyoaktivitesini koruyabilmiştir. Anti-TNF α ilacın biyoaktivitesini büyük ölçüde korumasının nedeni, anti-TNF ilacın içeriğinde bulunan proteinin kararlılığını korumasını sağlayan yardımcı maddelerdir. Wyeth firmasının Enbrel® (etanercept) ilaç dökümanında belirtilen bu yardımcı maddeler mannitol, sukroz ve trometamoldür. Literatüre bakıldığında, biyolojik aktivitesini koruyan proteinlerin kontrollü salımını sağlamak amacıyla şekerler, polialkoller ve heparin gibi çeşitli protein kararlılığını koruyucu maddeler mikroküre hazırlama basamaklarında katkı maddesi olarak kullanılmaktadır (SAEZ, 2008).



Şekil 50. Gama sterilizasyonu yapılmış anti-TNF α yüklü PCL mikrokürelerin ELİZA yöntemi ile incelenen 3 aylık salım profili (n=3)



Şekil 51. Gama sterilizasyonu yapılmış anti-TNFα yüklü PCL mikrokürelerin ELİZA yöntemi ile incelenen 3 aylık mg mikroküre başına ortama çıkan µg ilaç salım profili (n=3)

Tablo 20. Farklı zamanlarda gama sterilizasyonu yapılmış PCL mikrokürelerden ortama çıkan biyoaktif IgG ve anti-TNFα ELİZA yöntemi ile belirlenen miktarları

	IgG yüklü PCL mikroküreler		Anti-TNFα yüklü PCL mikroküreler	
	Kümülatif salım, %	µg protein/mg mikroküre	Kümülatif salım, %	µg protein/mg mikroküre
6. saat salım örneği	1.46 ± 0.03	0.07 ± 0.002	2.07 ± 0.02	0.08 ± 0.003
7. gün salım örneği	4.01 ± 0.05 *	0.20 ± 0.01 #	15.28 ± 0.31 *	0.72 ± 0.18 #
90. gün salım örneği	27.52 ± 0.38 ^	1.42 ± 0.10 <	57.59 ± 0.45 ^	2.42 ± 0.19 <

*, ^, #, < Gruplar arası belirgin farklılıkları göstermektedir (p ≤ 0.05).

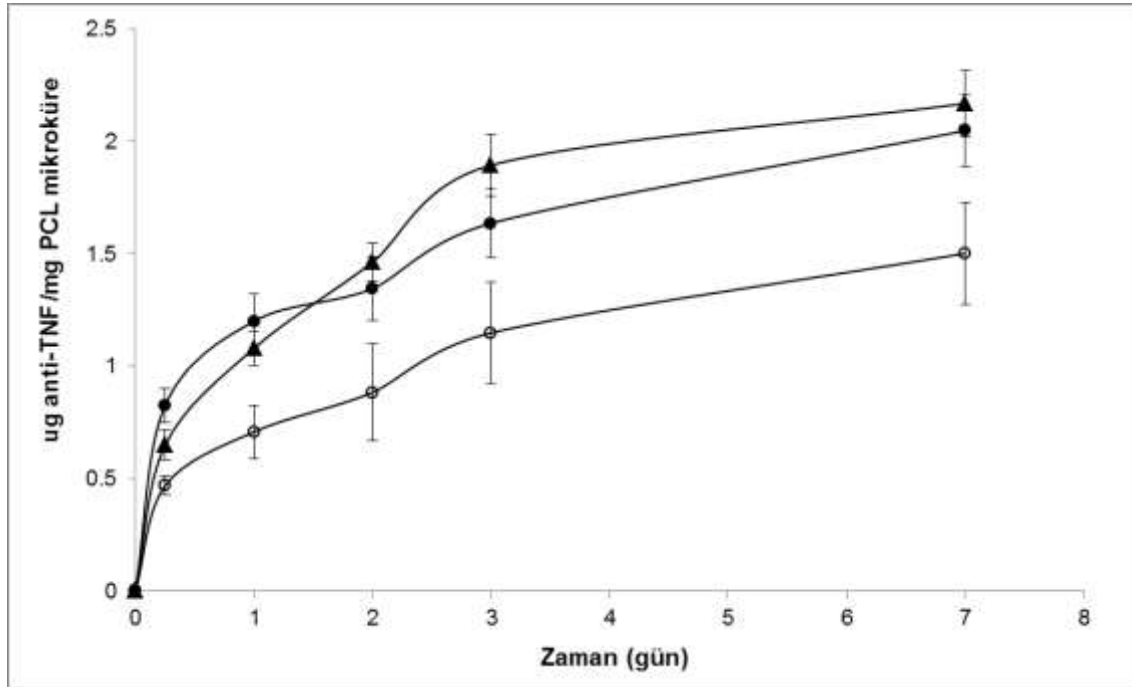
Tablo 21. PCL mikrokürelerden ortama çıkan biyoaktif anti-TNF α miktarının (ELIZA yöntemiyle belirlenen) toplam salınan protein miktarına (BCA yöntemiyle belirlenen) oranı

	Salınan kümülatif biyoaktif protein miktarının Salınan toplam protein miktarına oranı	
	IgG yüklü PCL mikroküreler	Anti-TNFα yüklü PCL mikroküreler
6. saat salım örneği	0.58 \pm 0.03 #,*	1.04 \pm 0.05 *
7. gün salım örneği	0.22 \pm 0.01 #, <	1.06 \pm 0.01 <
90. gün salım örneği	0.36 \pm 0.02 #, >	0.87 \pm 0.01 >

***,#,<,> Gruplar arası belirgin farklılıkları göstermektedir ($p \leq 0.05$).**

Projenin ilerleyen basamaklarında, 10 mg/ml anti-TNF α yüklü PCL mikroküre grubunun yanında iç faz protein miktarı arttırılmış iki PCL mikroküre grubu (25 ve 50 mg/ml) daha bu çalışmaya dahil edilmiştir. Bu yeni iki grup çalışmaya dahil edilmeden önce bu çalışmanın ön denemesi olarak gama sterilizasyonu yapılmamış mikrokürelerin protein yükleme verimliliği ve fosfat tampon çözeltisindeki bir haftalık salım profilleri incelenmiştir. Dahil edilen mikrokürelerin protein yükleme verimliliği sonuçları Bölüm 3.2.1'de verilmiştir. Gama sterilizasyonu öncesinde, hazırlanan farklı miktarlarda anti-TNF α yüklü PCL mikrokürelerden fosfat tampon ortamına salınan anti-TNF α ilaç miktarlarını karşılaştırabilmek için BCA yöntemi kullanılmıştır. Salım çalışması sırasında PCL mikrokürelerden ortama salınan anti-TNF α ilaç miktarını belirleyebilmek için Şekil 46'da verilen kalibrasyon eğrisi kullanılmıştır. Bu yöntem ile salım sırasında 1 miligram mikroküreden zamanla ortama çıkan proteinin mikrogram cinsinden miktarları belirlenerek karşılaştırılmıştır (Şekil 52). Farklı miktarlarda anti-TNF α ilaç yüklü PCL mikrokürelerden yedi günlük salım profilleri protein salımları benzer bir profil göstermiştir. Gama sterilizasyonu yapılmamış farklı miktarlarda anti-TNF α yüklü PCL mikrokürelerden 6. Saatte ve 7. günde ortama çıkan toplam protein miktarları Tablo 22'de verilmiştir. Farklı miktarlarda anti-TNF α ilaç yüklü PCL mikrokürelerden ilk 6 saatte ortama çıkan protein miktarları (initial burst) karşılaştırıldığında, 50 mg/ml anti-TNF α yüklü mikrokürelerden ortama çıkan ilaç miktarı 10 ve 25 mg/ml anti-TNF α yüklü mikrokürelerden ortama çıkan ilaç miktarına oranla belirgin olarak yüksek çıkmıştır ($p \leq 0.05$). Ayrıca, 25 mg/ml anti-TNF α yüklü mikrokürelerden ortama çıkan ilaç miktarı da 10 mg/ml anti-TNF α yüklü mikrokürelerden ortama çıkan ilaç miktarına oranla belirgin olarak yüksek çıkmıştır ($p \leq 0.05$). 7. günde ortama çıkan protein miktarları karşılaştırıldığında

ise 25 ve 50 mg/ml anti-TNF α yüklü mikrokürelere ortamdan çıkan ilaç miktarı 10 mg/ml anti-TNF α yüklü mikrokürelere ortamdan çıkan ilaç miktarından belirgin olarak yüksek gözlemlenmiştir ($p \leq 0.05$). Fakat, 25 ve 50 mg/ml anti-TNF α yüklü mikrokürelere ortamdan çıkan protein miktarları karşılaştırıldığında ortamdan salınan protein miktarları arasında belirgin bir fark gözlemlenmiştir ($p = 0.05$). Literatüre bakıldığında, mikroparçacık taşıma sistemlerine yüklenen protein miktarı arttıkça ilk salım (initial release) örneklerindeki protein miktarı da artmaktadır (HORA, 1990, O'HAGAN, 1994, SAH, 1994). Protein yükleme miktarlarının ilk salıma etkisi iki türlü açıklanabilir. İlk olarak, proteinlerin yüzeyden ayrılması sonucu oluşan kanalların su ile dolması mikroparçacıklar içindeki proteinlerin yapıdan uzaklaşmasına neden olmaktadır. Yüksek miktarda protein yüklenmesi sonucunda bu kanalların oluşumu artırılarak yüksek miktarda proteinin ortamdan çıkmasına neden olmaktadır (HORA, 1990). Diğer bir görüş olarak, mikrokürelere ve salım ortamı arasındaki büyük protein konsantrasyon farkı ilk salım örneklerinde yüksek miktarda proteinin ortamdan çıkmasına neden olmaktadır (YANG, 2001).



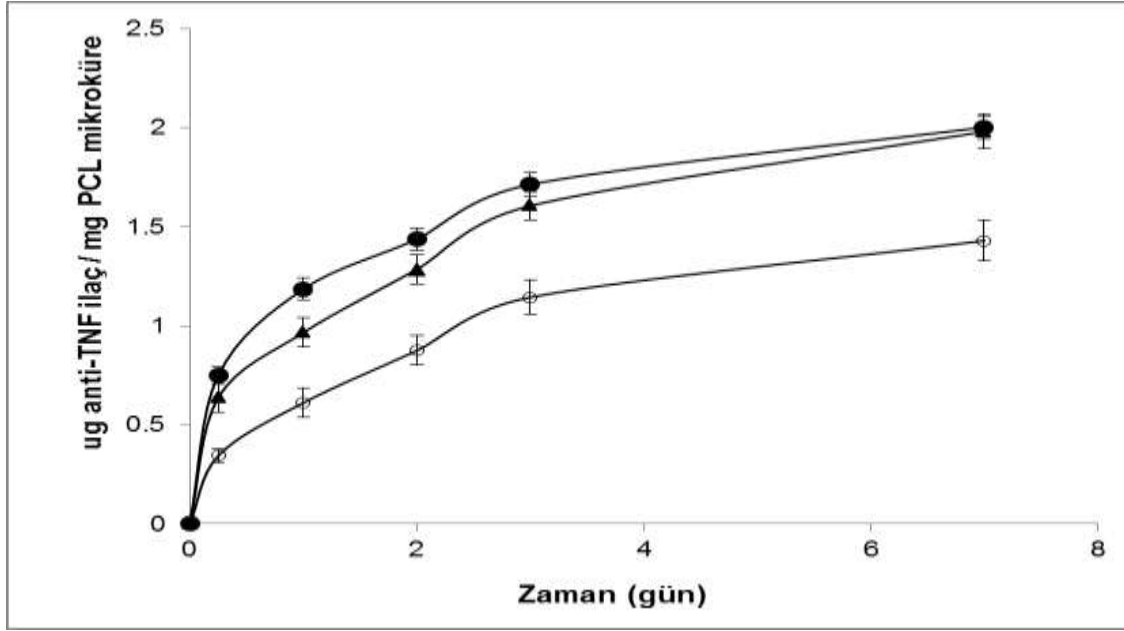
Şekil 52. Gama sterilizasyonu yapılmamış farklı miktarlarda anti-TNF α yüklü PCL mikrokürelere BCA yöntemi ile incelenen 7 günlük mg mikrokürelere başına ortamdan çıkan μg ilaç salım profili ($n=3$). ○ 10 mg/ml, ▲ 25 mg/ml ve ● 50 mg/ml anti-TNF α yüklü PCL mikrokürelere

Tablo 22. Farklı zamanlarda gama sterilizasyonu yapılmamış PCL mikrokürelerden ortama çıkan anti-TNF α 'ın BCA yöntemi ile belirlenen miktarları

	ug anti-TNF α / mg PCL mikroküre	
	6. saat	7.gün
10 mg/ml anti-TNF α yüklü PCL mikroküreler	0.47 \pm 0.04 *,<	1.50 \pm 0.23^, #
25 mg/ml anti-TNF α yüklü PCL mikroküreler	0.65 \pm 0.07 *,>	2.17 \pm 0.15#
50 mg/ml anti-TNF α yüklü PCL mikroküreler	0.83 \pm 0.08 <,>	2.05 \pm 0.16 ^

*, #, <,>^ Gruplar arası belirgin farklılıkları göstermektedir (p \leq 0.05).

Gama sterilizasyonu öncesinde, farklı miktarlarda anti-TNF α ilaç yüklü PCL mikrokürelerden farklı zamanlarda ortama çıkan biyolojik olarak aktif anti-TNF α protein ilaç miktarını belirlemek için 7 gün boyunca farklı zamanlarda salım ortamından alınan örnekler enzime bağlı immünosorban (ELİZA) testi ile incelenmiştir. Salım çalışmaları sırasında PCL mikrokürelerden ortama salınan anti-TNF α ilaç miktarını belirleyebilmek için Şekil 49'da verilen kalibrasyon eğrisi kullanılmıştır. Bu yöntem ile salım sırasında 1 miligram mikroküreden zamanla ortama çıkan proteinin mikrogram cinsinden miktarları belirlenerek karşılaştırılmıştır (Şekil 53). Gama sterilizasyonu yapılmamış farklı miktarlarda anti-TNF α yüklü PCL mikrokürelerden 6. saatte ve 7. günde ortama çıkan biyolojik olarak aktif protein ilaç miktarları Tablo 23'de verilmiştir. 6. saat ve 7. günde ortama çıkan biyolojik olarak aktif anti-TNF α miktarları karşılaştırıldığında, 25 ve 50 mg/ml anti-TNF α yüklü mikrokürelerden ortama çıkan biyolojik olarak aktif ilaç miktarı 10 mg/ml anti-TNF α yüklü mikrokürelerden ortama çıkan biyolojik olarak aktif ilaç miktarından belirgin olarak yüksek gözlemlenmiştir (p \leq 0.05). Fakat, 25 ve 50 mg/ml anti-TNF α yüklü mikrokürelerden 6. saat ve 7. günde ortama çıkan protein miktarları kendi aralarında karşılaştırıldığında ortama salınan protein miktarları arasında belirgin bir fark gözlemlenmemiştir (p = 0.05). Bu sonuçlar, BCA yöntemi sonucu elde edilen sonuçlarla uyumludur. PCL mikrokürelere yüklenen protein miktarı arttıkça ortama salınan protein miktarları da artmaktadır.



Şekil 53. Gama sterilizasyonu yapılmamış farklı miktarlarda anti-TNF α yüklü PCL mikrokürelerin ELİZA yöntemi ile incelenen 7 günlük mg mikroküre başına ortama çıkan μ g ilaç salım profili (n=3). ○ 10 mg/ml, ▲ 25 mg/ml ve ● 50 mg/ml anti-TNF α yüklü PCL mikroküreler

Tablo 23. Farklı zamanlarda gama sterilizasyonu yapılmamış PCL mikrokürelerden ortama çıkan anti-TNF α 'in ELİZA yöntemi ile belirlenen miktarları

	ug anti-TNF α / mg PCL mikroküre	
	6. saat	7. gün
10 mg/ml anti-TNF yüklü PCL mikroküreler	0.34 \pm 0.04 *,#	1.43 \pm 0.10 <,>
25 mg/ml anti-TNF yüklü PCL mikroküreler	0.64 \pm 0.07 *	1.98 \pm 0.09 <
50 mg/ml anti-TNF yüklü PCL mikroküreler	0.75 \pm 0.04 #	2.00 \pm 0.06 >

*, #, <,> Gruplar arası belirgin farklılıkları göstermektedir ($p \leq 0.05$).

Gama sterilizasyonu öncesinde, farklı miktarlarda anti-TNF α ilaç yüklü PCL mikrokürelerden farklı zamanlarda ortama çıkan anti-TNF α 'in biyolojik aktivitesinin ne kadarının korunup korunmadığını belirleyebilmek için ELİZA yöntemi ile belirlenen ortama çıkan protein miktarlarının BCA yöntemi ile gözlemlenen miktarlara oranları hesaplanmış ve Tablo 24'de verilmiştir. Bu sonuçlar incelendiğinde, 25 ve 50 mg/ml anti-TNF α yüklü PCL mikrokürelerden ilk 6 saatte ortama salınan anti-TNF ilaç biyolojik aktivitesini neredeyse tamamen korumuştur. 10 mg/ml anti-TNF α yüklü PCL mikrokürelerden ilk 6 saatte ortama salınan ilacın ise biyoaktivitesi % 73.3 oranında korunmuştur. 7. Günde ise bütün gruplarda ortama salınan anti-TNF α 'in biyolojik aktivitesinin büyük kısmı korunmuştur. Daha önce de belirtildiği gibi, anti-TNF α ilacın içeriğinde bulunan proteinin kararlılığını korumasını sağlayan yardımcı maddeler anti-TNF α ilacın biyoaktivitesini büyük ölçüde korumasına neden olmuştur.

Tablo 24. Gama sterilizasyonu yapılmamış farklı miktarlarda anti-TNF α yüklü PCL mikrokürelerden ortama çıkan biyoaktif anti-TNF miktarının (ELIZA yöntemiyle belirlenen) toplam salınan protein miktarına (BCA yöntemiyle belirlenen) oranı

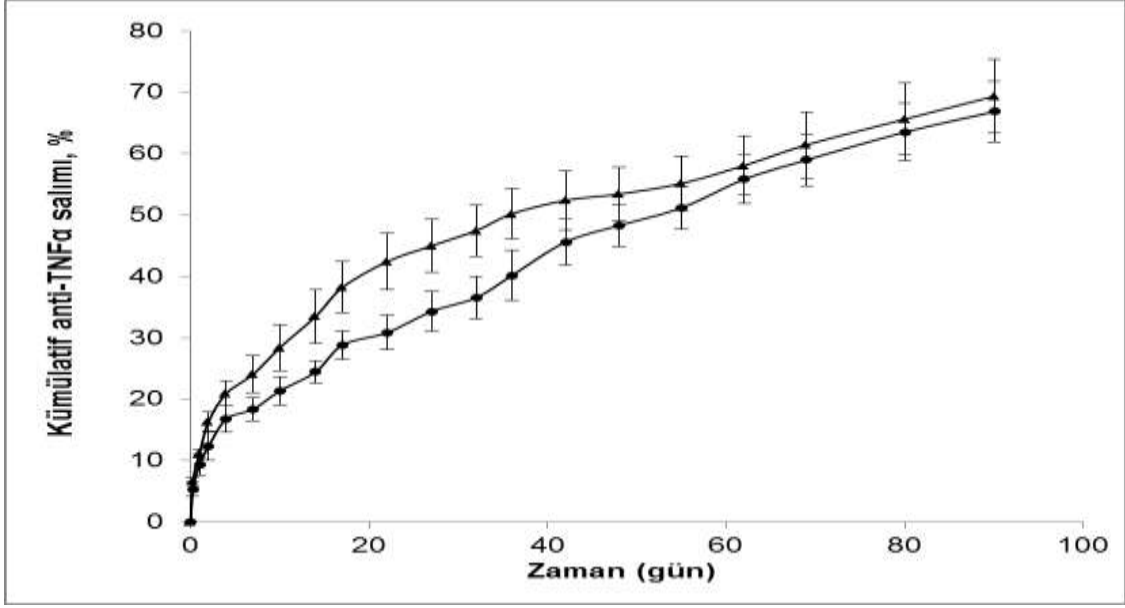
	Salınan biyoaktif protein miktarının salınan toplam proteine oranı	
	6. saat	7. gün
10 mg/ml anti-TNF α yüklü PCL mikroküreler	0.73 \pm 0.01 *,#	0.96 \pm 0.08
25 mg/ml anti-TNF α yüklü PCL mikroküreler	0.98 \pm 0.01 *,<	0.92 \pm 0.02
50 mg/ml anti-TNF α yüklü PCL mikroküreler	0.91 \pm 0.03 #,<	0.98 \pm 0.05

*, #, <, > Gruplar arası belirgin farklılıkları göstermektedir ($p \leq 0.05$)

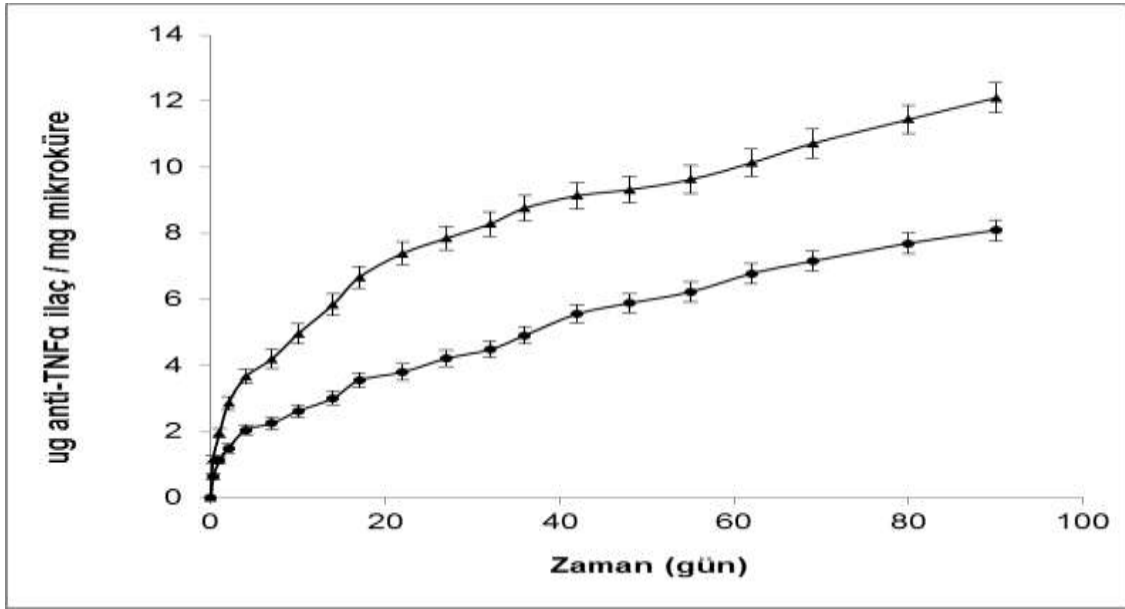
Farklı miktarlarda anti-TNF α ilaç yüklü PCL mikroküreler ile yapılan çalışma sonucunda, çalışmanın ilerleyen basamaklarında 25 mg/ml anti-TNF α yüklü PCL ve PEG-PCL-PEG mikrokürelerin kullanılmasına karar verilmiştir. Bu nedenle, 25 mg/ml anti-TNF α yüklü PCL ve PEG-PCL-PEG mikrokürelerin gama sterilizasyonu sonrasında fosfat tampon ortamına 3 ay boyunca salınan anti-TNF ilaç miktarları belirlenmiştir. Ortama salınan protein miktarları mikrokürelerin BCA yöntemiyle belirlenen protein yükleme verimliliğine bölünerek salım sırasında ortama çıkan %kümülatif protein miktarları belirlenmiştir (Şekil 54). Ayrıca, salım

sırasında 1 miligram mikroküreden zamanla ortama çıkan proteinin mikrogram cinsinden miktarları da belirlenmiştir (Şekil 55). Gama sterilizasyonu yapılmış anti-TNF α yüklü PCL ve PEG-PCL-PEG mikrokürelerden 6. saatte, 7. günde ve 90. günde ortama çıkan toplam protein miktarları Tablo 25’de karşılaştırılmıştır.

Gama sterilizasyonu yapılmış PCL ve PEG-PCL-PEG mikrokürelerden 3 aylık kümülatif anti-TNF α ilaç salımlarının benzer bir profile sahip olduğu gözlemlenmiştir (Şekiller 54 ve 55). 7. günden sonra, 1 mg PEG-PCL-PEG mikroküreden ortama çıkan mikrogram anti-TNF α ilaç miktarı 1 mg PCL mikroküreden ortama çıkan anti-TNF α miktarına oranla belirgin olarak artmıştır (Şekil 55). Tablo 25’de verilen sonuçlara bakıldığında, 25 mg/ml anti-TNF α yüklü PCL ve PEG-PCL-PEG mikrokürelerden 7. günde ortama çıkan protein yüzdeleri arasında belirgin bir fark gözlemlenirken ($p \leq 0.05$) 6. saat ve 90. günde ortama çıkan protein yüzdeleri arasında belirgin bir fark gözlemlenmemiştir ($p > 0.05$). Fakat, mg mikroküre başına ortama çıkan μg protein miktarları kendi aralarında karşılaştırıldığında 6. saatte, 7. günde ve 90. günde ortama çıkan toplam protein miktarları arasında belirgin bir fark gözlemlenmiştir ($p \leq 0.05$). Bölüm 2.2.4’de de bahsedildiği gibi, hidrofobik PCL polimer matris yapısına eklenen hidrofilik PEG polimer ve protein arasındaki hidrofobik etkileşimleri düşürmektedir. Ayrıca, yapıdaki PEG zincirleri suyun taşıma sisteminin içine daha kolay girmesini sağlayarak polimer matrisin erozyona uğramasına neden olmaktadır. Bu nedenlerle, PEG-PCL-PEG mikrokürelerden salım ortamına protein çıkışı PCL mikrokürelerden salım ortamına protein çıkışına oranla daha hızlı olduğu düşünülmektedir. Benzer bir çalışmada, iki basamaklı emülsiyon yöntemi kullanılarak albumin yüklü PEG-PCL ve PEG-PLLA mikroküreler hazırlanmıştır (KIM, 2004). Sentezlenen PEG-PCL ve PEG-PLLA kopolimerlerinde hidrofilik PEG segment oranı arttırıldıkça ortama çıkan albumin miktarının da arttığı gözlemlenmiştir. Mikrokürelerin hidrofilik özelliği arttıkça su tutma oranı artacağından bu mikrokürelerden salım ortamına daha hızlı bir şekilde protein çıkmıştır. Bölüm 3.2.1 Tablo 17’de verilen protein yükleme verimlilikleri karşılaştırıldığında PEG-PCL-PEG mikrokürelerin ilaç yükleme verimliliği (% 75.91 ± 1.16) PCL mikrokürelerin protein yükleme verimliliğine (% 65.37 ± 1.80) göre daha yüksek olduğu için 1 mg PEG-PCL-PEG mikroküreden zamanla çıkan μg miktarları da PCL mikrokürelere oranla daha yüksek bulunmuştur.



Şekil 54. Gama sterilizasyonu yapılmış 25 mg/ml anti-TNFα yüklü PCL ve PEG-PCL-PEG mikrokürelerin BCA yöntemi ile incelenen 3 aylık salım profili (n=4)



Şekil 55. Gama sterilizasyonu yapılmış 25 mg/ml anti-TNFα yüklü PCL ve PEG-PCL-PEG mikrokürelerin BCA yöntemi ile incelenen 3 aylık mg mikroküre başına ortama çıkan µg ilaç salım profili (n=4)

Tablo 25. Gama sterilizasyonu yapılmış 25 mg/ml anti-TNF α yüklü PCL ve PEG-PCL-PEG mikrokürelerden farklı zamanlarda ortama çıkan anti-TNF α 'nın BCA yöntemi ile belirlenen miktarları

	Anti-TNF α yüklü PCL mikroküreler		Anti-TNF α yüklü PEG-PCL-PEG mikroküreler	
	Kümülatif salım, %	μ g protein/mg mikroküre	Kümülatif salım, %	μ g protein/mg mikroküre
6. saat salım örneği	5.37 \pm 1.21	0.64 \pm 0.09 #	6.64 \pm 0.57	1.16 \pm 0.12 #
7. gün salım örneği	18.37 \pm 1.89 *	2.25 \pm 0.17 <	24.06 \pm 2.99 *	4.20 \pm 0.29 <
90. gün salım örneği	66.86 \pm 4.88	8.10 \pm 0.32 >	69.37 \pm 6.03	12.10 \pm 0.45 >

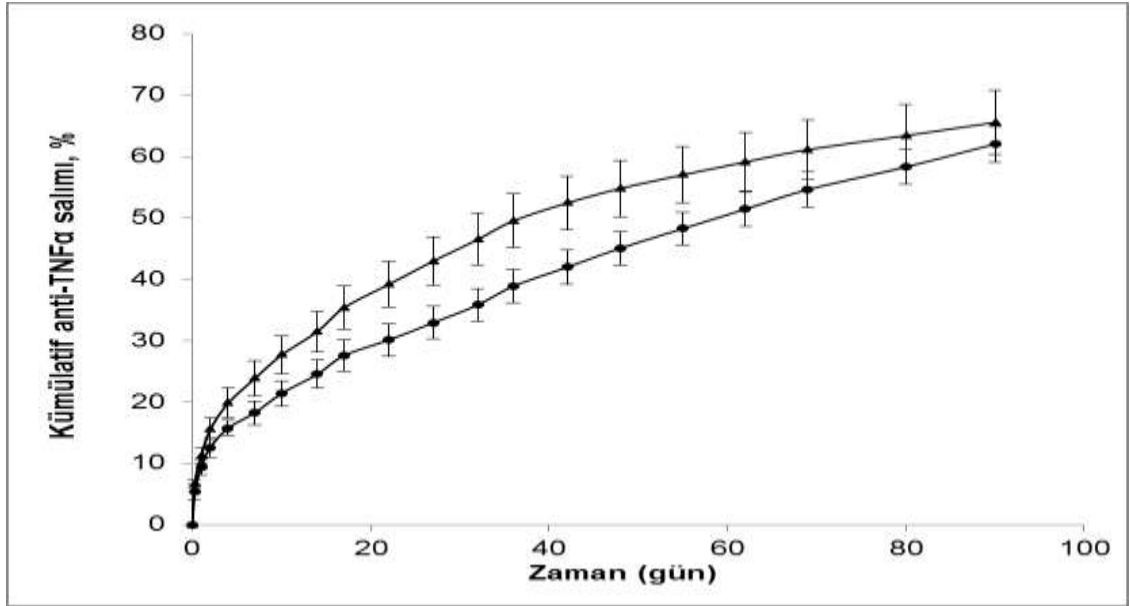
*,#,<,> Gruplar arası belirgin farklılıkları göstermektedir ($p \leq 0.05$)

25 mg/ml anti-TNF α yüklü PCL ve PEG-PCL-PEG mikrokürelerden farklı zamanlarda ortama çıkan anti-TNF α proteinin biyoaktivitesinin korunup korunmadığını ölçmek için 90 gün boyunca farklı zamanlarda elde edilen salım örnekleri enzime bağlı immünosorban (ELİZA) testi ile incelenmiştir. Anti-TNF α yüklü PCL ve PEG-PCL-PEG mikrokürelerden ortama salınan biyolojik olarak aktif anti-TNF α protein miktarları BCA yöntemiyle belirlenen protein yükleme miktarlarına bölünerek salım sırasında ortama çıkan %kümülatif protein miktarları belirlenmiştir (Şekil 56). Ayrıca, salım sırasında 1 miligram mikroküreden zamanla ortama çıkan proteinin mikrogram cinsinden miktarları da belirlenmiştir (Şekil 57).

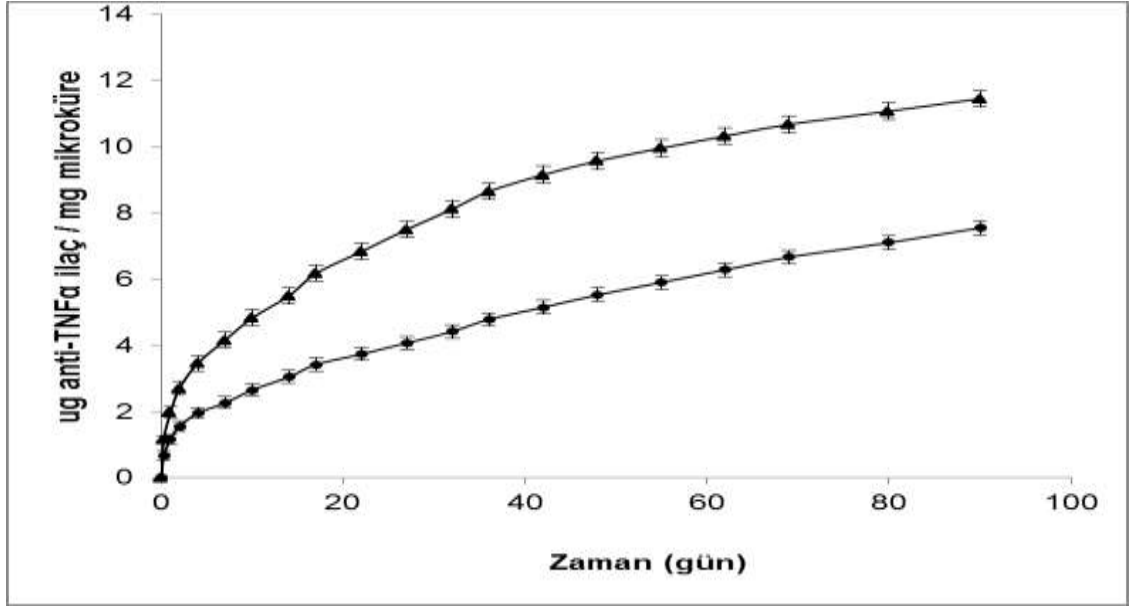
Gama sterilizasyonu yapılmış PCL ve PEG-PCL-PEG mikrokürelerden 3 aylık kümülatif anti-TNF α ilaç salımlarının benzer bir profile sahip olduğu gözlemlenmiştir (Şekiller 56 ve 57). 4. günden sonra, 1 mg PEG-PCL-PEG mikroküreden ortama çıkan mikrogram anti-TNF α ilaç miktarı 1 mg PCL mikroküreden ortama çıkan anti-TNF α miktarına oranla belirgin olarak artmıştır (Şekil 57).

25 mg/ml anti-TNF α yüklü PEG-PCL-PEG ve PCL mikrokürelerden 6. Saatte, 7.günde ve 90. günde ortama çıkan biyolojik aktivitesini korumuş protein miktarları Tablo 26'da karşılaştırılmıştır. 6. saat ve 90. günde 25 mg/ml anti-TNF α yüklü PCL ve PEG-PCL-PEG mikrokürelerden ortama çıkan biyolojik aktivitesini korumuş protein yüzdeleri arasında belirgin

bir fark gözlemlenmemiştir ($p > 0.05$). 7. günde ise, 25 mg/ml anti-TNF α yüklü PCL ve PEG-PCL-PEG mikrokürelerden ortama çıkan biyolojik aktivitesini korumuş protein yüzdeleri arasında belirgin bir fark gözlemlenmiştir ($p \leq 0.05$). Fakat, BCA analizi sonuçlarına benzer olarak mg mikroküre başına ortama çıkan biyolojik aktivitesini korumuş μ g protein miktarları kendi aralarında karşılaştırıldığında 6. saatte, 7. günde ve 90. günde ortama çıkan toplam protein miktarları arasında belirgin bir fark gözlemlenmiştir ($p \leq 0.05$).



Şekil 56. Gama sterilizasyonu yapılmış 25 mg/ml anti-TNF α yüklü PCL ve PEG-PCL-PEG mikrokürelerin ELİZA yöntemi ile incelenen 3 aylık salım profili (n=3) ● 25 mg/ml anti-TNF α yüklü PCL ve ▲ 25 mg/ml anti-TNF α yüklü PEG-PCL-PEG mikroküreler



Şekil 57. Gama sterilizasyonu yapılmış 25 mg/ml anti-TNFα yüklü PCL ve PEG-PCL-PEG mikrokürelerin ELİZA yöntemi ile incelenen 3 aylık mg mikroküre başına ortama çıkan µg ilaç salım profili (n=4) ● 25 mg/ml anti-TNFα yüklü PCL ve ▲ 25 mg/ml anti-TNFα yüklü PEG-PCL-PEG mikroküreler

Tablo 26. Gama sterilizasyonu yapılmış 25 mg/ml anti-TNFα yüklü PCL ve PEG-PCL-PEG mikrokürelerden farklı zamanlarda ortama çıkan anti-TNFα'nın ELİZA yöntemi ile belirlenen miktarları

	Anti-TNFα yüklü PCL mikroküreler		Anti-TNFα yüklü PEG-PCL-PEG mikroküreler	
	Kümülatif salım, %	µg protein/mg mikroküre	Kümülatif salım, %	µg protein/mg mikroküre
6. saat salım örneği	5.35 ± 1.22	0.66 ± 0.14 #	6.62 ± 0.58	1.16 ± 0.12 #
7. gün salım örneği	18.25 ± 1.92 *	2.27 ± 0.18 <	23.83 ± 2.83 *	4.16 ± 0.24 <
90. gün salım örneği	62.05 ± 2.93	7.55 ± 0.21 >	65.58 ± 5.25	11.45 ± 0.26 >

*,#,<,> Gruplar arası belirgin farklılıkları göstermektedir (p ≤ 0.05).

ELİZA yöntemi ile belirlenen farklı zamanlarda ortama çıkan protein miktarlarının BCA yöntemi ile gözlemlenen miktarlara oranları da Tablo 27’de verilmiştir. Bu sonuçlar incelendiğinde, PCL ve PEG-PCL-PEG mikrokürelerden ilk 6 saatte ve 7. günde ortama salınan anti-TNF α ilaç biyolojik aktivitesini tamamen korumuştur. 3 aylık salım sonunda, PCL mikrokürelerden ortama çıkan toplam anti-TNF α ilacın %93’ü korunurken PEG-PCL-PEG mikrokürelerden ortama çıkan toplam anti-TNF α ilacın %94.6’sı biyoaktivitesini korumuştur. Anti-TNF α ilacın biyoaktivitesini büyük ölçüde korumasının nedeni, Bölüm 2.2.5’te belirtildiği gibi ilacın içeriğinde bulunan yardımcı maddeler proteinin kararlılığını korumasını sağlamıştır.

Tablo 27. Gama sterilizasyonu yapılmış 25 mg/ml anti-TNF α yüklü PCL ve PEG-PCL-PEG mikrokürelerden farklı zamanlarda ortama çıkan biyoaktif anti-TNF α miktarının (ELIZA yöntemiyle belirlenen) toplam salınan protein miktarına (BCA yöntemiyle belirlenen) oranı

	Salınan biyoaktif protein miktarının salınan toplam proteine oranı		
	6. saat	7. gün	90. gün
Gama sterilizasyonu yapılmış anti-TNF α yüklü PCL mikroküreler	0.996 \pm 0.002	0.993 \pm 0.006	0.930 \pm 0.032
Gama sterilizasyonu yapılmış anti-TNF α yüklü PEG-PCL-PCL mikroküreler	0.998 \pm 0.001	0.991 \pm 0.007	0.946 \pm 0.015

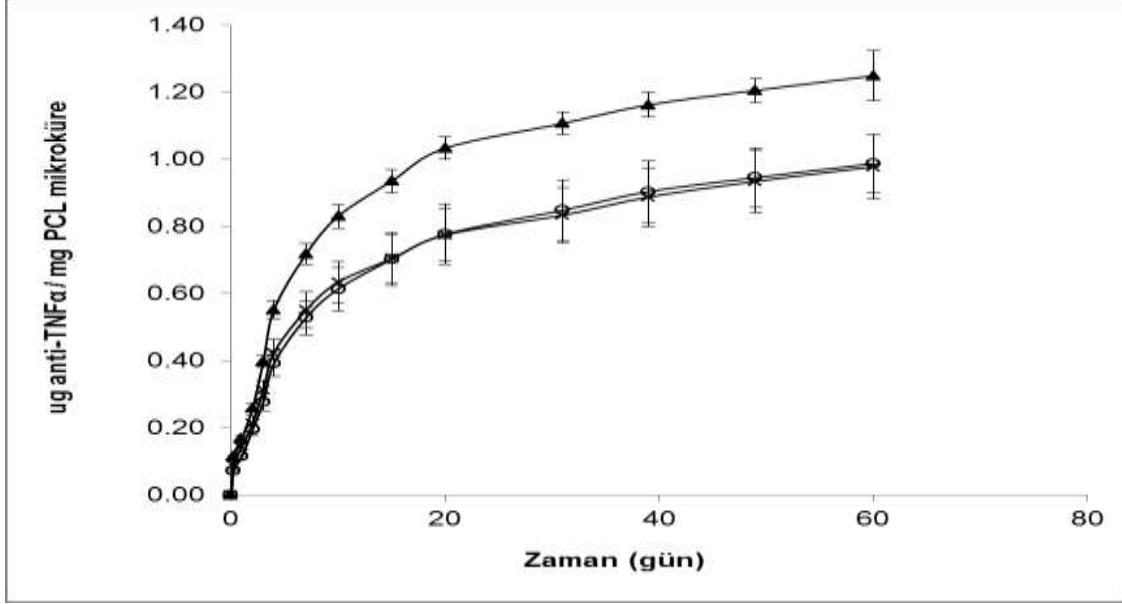
Tüm gruplar birbirinden $p \leq 0.05$ seviyesinde istatistiksel olarak farklı bulunmamıştır.

3.2.4.2. Hücre Kültür Vasatı Ortamında Salım Profili

Projenin son aşamasında, mikroküre salım sistemlerinin RA’li hasta kaynaklı sinoviyal fibroblast hücreler üzerindeki etkilerinin inceleneceği çalışmanın ön görüşü için hazırlanan anti-TNF α yüklü PCL ve PEG-PCL-PEG mikrokürelerin %5 serum içeren hücre kültür vasatı içerisinde salım çalışmaları 2 ay boyunca yapılmıştır.

Projenin ilk aşamalarında, farklı miktarlarda anti-TNF α yüklü PCL mikrokürelerden (10, 25 ve 50 mg/ml) hücre kültür vasatı ortamına salınan anti-TNF α ilaç miktarlarını karşılaştırabilmek için ELİZA yöntemi kullanılmıştır. Salım çalışması sırasında PCL mikrokürelerden ortama salınan anti-TNF α ilaç miktarını belirleyebilmek için Şekil 49'da verilen kalibrasyon eğrisi kullanılmış ve salım sırasında 1 miligram mikroküreden zamanla ortama çıkan proteinin mikrogram cinsinden miktarları belirlenerek karşılaştırılmıştır (Şekil 58). Ayrıca, PCL mikrokürelerden hücre vasatı ortamına salınan biyolojik olarak aktif anti-TNF α ilaç miktarları Tablo 28'de verilmiştir. 6. saat salım örnekleri karşılaştırıldığında, 25 ve 50 mg/ml anti-TNF α yüklü PCL mikrokürelerden hücre kültür ortamına salınan biyolojik olarak aktif ilacın miktarları 10 mg/ml anti-TNF α yüklü PCL mikrokürelerden hücre kültür ortamına salınan biyolojik olarak aktif ilacın miktarına oranla istatistiksel anlamlı olarak yüksek bulunmuştur ($p \leq 0.05$). Ayrıca, 50 mg/ml anti-TNF α yüklü PCL mikrokürelerden hücre kültür ortamına salınan biyolojik olarak aktif ilacın miktarı 25 mg/ml anti-TNF α yüklü PCL mikrokürelerden hücre kültür ortamına salınan biyolojik olarak aktif ilacın miktarından da belirgin olarak yüksek bulunmuştur ($p \leq 0.05$). 7. ve 90. günlerde, 50 mg/ml anti-TNF α yüklü PCL mikrokürelerden hücre kültür ortamına salınan biyolojik olarak aktif ilaç miktarları diğer iki gruptan hücre kültür ortamına salınan biyolojik olarak aktif ilaç miktarlarından belirgin olarak yüksek bulunmuştur ($p \leq 0.05$). Fakat, 10 ve 25 mg/ml anti-TNF α yüklü PCL mikrokürelerden hücre kültür ortamına 7. ve 90. günlerde salınan toplam biyolojik olarak aktif ilacın miktarları arasında belirgin bir fark gözlemlenmemiştir ($p > 0.05$).

Bölüm 3.2.4.1 Tablo 23'de verilen, gama sterilizasyonu yapılmamış PCL mikrokürelerden farklı zamanlarda fosfat tampon ortamına çıkan biyolojik olarak anti-TNF α 'in ELİZA yöntemi ile belirlenen ilaç miktarları ve Tablo 28'de verilen gama sterilizasyonu yapılmış PCL mikrokürelerden farklı zamanlarda hücre kültür ortamına çıkan biyolojik olarak anti-TNF α miktarları karşılaştırıldığında, % 5 serum içeren hücre kültürü vasatı içinde yapılan salım çalışmasının 6. saat, 7. gün ve 90. günlerinde ortama çıkan ilaç miktarı fosfat tampon ortamında yapılan salım çalışmasının 6. saat, 7. gün ve 90. günlerinde ortama çıkan ilaç miktarından belirgin olarak düşüktür. Bunun sebebi, hücre vasatı içindeki serum proteinlerinin mikrokürelerin yüzeyine adsorpsiyonu sonucu anti-TNF α ilacın dış ortama difüzyonun sınırlanmasıdır. Non-spesifik protein adsorpsiyonu polimerik ilaç salım sistemlerinden ortama çıkan proteinin in vivo salım kinetiğini etkileyerek yavaş bir salım kinetiği göstermesine neden olmaktadır (CROTTS, 1997).



Şekil 58. Gama sterilizasyonu yapılmış farklı miktarlarda anti-TNF α yüklü PCL mikrokürelerin % 5 serum içeren hücre kültür vasatı içerisinde ELİZA yöntemi ile incelenen 2 aylık mg mikroküre başına ortama çıkan μ g ilaç salım profili (n=3). ○ 10 mg/ml, x 25 mg/ml ve ▲ 50 mg/ml anti-TNF α yüklü PCL mikroküreler

Farklı iç faz anti-TNF α konsantrasyonu (10, 25 ve 50 mg/ml) ile hazırlanan PCL mikrokürelerin protein verimliği ve fosfat tampon salım profillerinin karakterizasyonu sonucunda projenin son aşamasında kullanılacak anti TNF α yüklü PCL ve PEG-PCL-PEG mikrokürelerin iç faz anti-TNF α konsantrasyonu 25 mg/ml olarak belirlenmiştir. Bu nedenle, bu iç faz protein konsantrasyonuna sahip anti-TNF α yüklü PEG-PCL-PEG mikroküreler hazırlanmıştır ve anti-TNF α yüklü PCL ve PEG-PCL-PEG mikrokürelerin %5 serum içeren hücre kültür vasatı içerisinde salım kinetiği analizleri 60 gün boyunca yapılmıştır. Şekil 59'da anti-TNF α yüklü PCL ve PEG-PCL-PEG %5 serum içeren hücre kültür vasatı içerisinde 60 günlük salım profilleri verilmiştir. Ayrıca, gama sterilizasyonu yapılmış 25 mg/ml anti-TNF α yüklü PCL ve PEG-PCL-PEG mikrokürelerden 6. saatte, 7. günde ve 90. Günde %5 serum içeren hücre kültürü ortamına çıkan toplam biyolojik olarak aktif protein miktarları Tablo 29'da karşılaştırılmıştır.

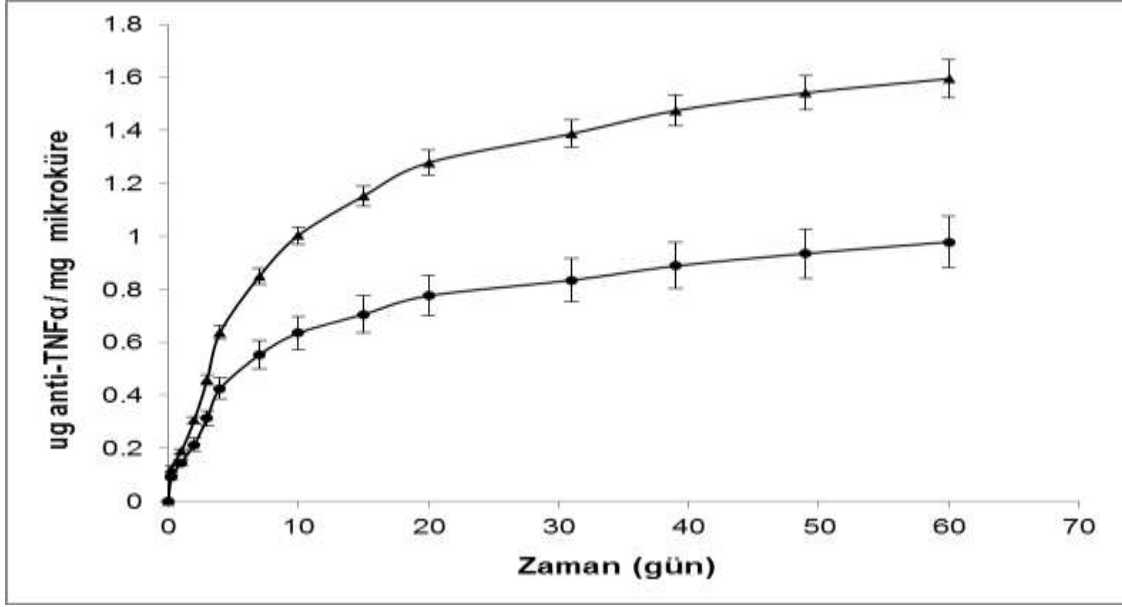
Table 28. Farklı zamanlarda gama sterilizasyonu yapılmış farklı miktarlarda anti-TNF α yüklü PCL mikrokürelerden %5 serum içeren hücre kültür vasatı ortamına çıkan anti-TNF α 'in ELİZA yöntemi ile belirlenen miktarları

				ug anti-TNF α / mg PCL mikroküre			
				6 hour	7 day	60 day	
10 mg/ml anti-TNF α yüklü mikroküreler	PCL	0.074 \pm 0.004	*,#	0.529 \pm 0.050	>	0.988 \pm 0.088	\$
25 mg/ml anti-TNF α yüklü mikroküreler	PCL	0.091 \pm 0.008	*,<	0.552 \pm 0.053	^	0.979 \pm 0.097	&
50 mg/ml anti-TNF α yüklü mikroküreler	PCL	0.116 \pm 0.004	#,<	0.718 \pm 0.031	>,^	1.308 \pm 0.075	,\$&

*, #, <, >, ^, \$, & Gruplar arası belirgin farklılıkları göstermektedir (p \leq 0.05).

4. günden sonra, 1 mg PEG-PCL-PEG mikroküreden hücre kültürü ortamına çıkan mikrogram anti-TNF α ilaç miktarı 1 mg PCL mikroküreden ortama çıkan anti-TNF α miktarına oranla belirgin olarak artmıştır (Şekil 59). Tablo 29'da görüldüğü gibi, 25 mg/ml anti-TNF α yüklü PCL ve PEG-PCL-PEG mikrokürelerden farklı zamanlarda ortama çıkan protein miktarları kendi aralarında karşılaştırıldığında aralarında belirgin bir fark gözlemlenmiştir (p \leq 0.05). 25 mg/ml anti-TNF α yüklü PEG-PCL-PEG mikrokürelerin protein yükleme verimliliği (%75.91 \pm 1.16) PCL mikrokürelerin protein yükleme verimliliğine (%65.37 \pm 1.80) oranla daha yüksek olduğu için PEG-PCL-PEG mikrokürelerden ortama daha çok anti-TNF α çıktığı düşünülmektedir. PEG segmentinden dolayı da, mikrokürelerin hidrofilik özelliği arttıkça su tutma oranı arttığından PEG-PCL-PEG mikrokürelerden salım ortamına daha hızlı bir şekilde protein çıkımıştır. Daha önceki bir çalışmada, MPEG-PLA kopolimeri sentezlenerek hazırlanan nanoparçacıklardan salım ortamına çıkan ilaç (paklitaksel) miktarı, PLA nanoparçacıklardan salım ortamına çıkan ilaç miktarına oranla daha yüksek bulunmuştur (DONG, 2004). İlk 7 gün, ilacın %85'i MPEG-PLA nanoparçacıklardan salım ortamına çıkarken PLA nanoparçacıklardan salım ortamına 1 ayda ilacın %30'u çıkabilmiştir. Ayrıca, PEG-PCL-PEG mikrokürelerin yapısındaki PEG'in hücre vasatı içindeki serum proteinlerinin mikrokürelerin yüzeyine adsorpsiyonunu engelleyerek anti-TNF α ilacın dış ortama daha rahat çıkmasına neden olduğu düşünülmektedir. Cho ve arkadaşlarının yaptığı bir çalışmada (CHO, 2009), tek PCL ve farklı oranlarda PCL-g-PEG ile karıştırılmış PCL fimler hazırlanarak film yüzeyine protein adsorpsiyonu incelenmiştir. Yaptıkları

analizler sonucunda, yapıya PEG'in dahil olmasıyla protein adsorpsiyon düzeyinin azaldığını gözlemlemişlerdir. Başka bir çalışmada da, plazma proteinlerinin PLGA homopolimeri ve PEG-PLGA diblok kopolimerlerden hazırlanmış nanoküreler üzerine adsorpsiyonu karşılaştırılmış ve PEG ile modifiye edilen PLGA nanokürelerin yüzeyine protein adsorpsiyon miktarı PLGA nanokürelerin yüzeyine protein adsorpsiyon miktarından belirgin olarak düşük bulunmuştur (GREF, 1995).



Şekil 59. Anti-TNF α yüklü PCL ve PEG-PCL-PEG mikrokürelerin %5 serum içeren hücre kültür vasatı içerisinde ELİZA yöntemi ile incelenen 60 günlük mg mikroküre başına ortama çıkan μg ilaç salım profili (n=4) ▲ 25 mg/ml anti-TNF α yüklü PCL ve ● 25 mg/ml anti-TNF α yüklü PEG-PCL-PEG mikroküreler

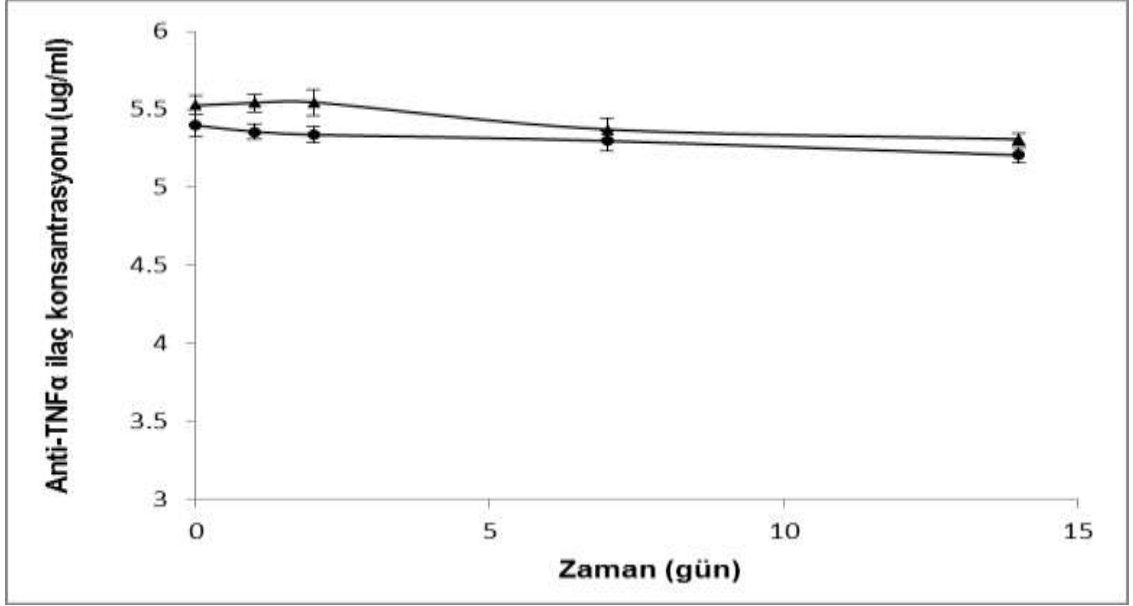
Tablo 29. Gama sterilizasyonu yapılmış 25 mg/ml anti-TNF α yüklü PCL ve PEG-PCL-PEG mikrokürelerden %5 serum içeren hücre kültür vasatı ortamına farklı zamanlarda çıkan anti-TNF α 'in ELİZA yöntemi ile belirlenen miktarları

	ug anti-TNF α / mg mikroküre		
	6. saat	7. gün	60. gün
25 mg/ml anti-TNF α yüklü PCL mikroküreler	0.091 \pm 0.008	0.552 \pm 0.053	0.979 \pm 0.097
	*	#	<
25 mg/ml anti-TNF α yüklü PEG-PCL-PEG mikroküreler	0.123 \pm 0.010	0.848 \pm 0.304	1.595 \pm 0.072
	*	#	<

***, #, < Gruplar arası belirgin farklılıkları göstermektedir ($p \leq 0.05$).**

3.2.4.3. Sinoviyal Sıvı Ortamında Salım Profili

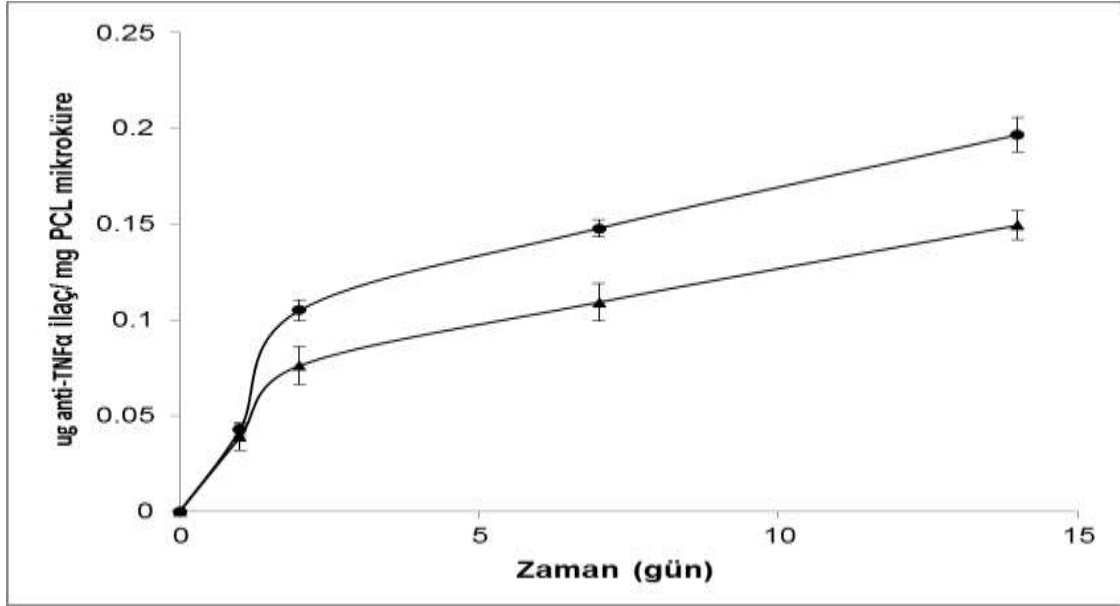
Anti-TNF α yüklü mikrokürelerin in vivo stabilitesinin ön görüşü için, anti-TNF α ilaç yüklü PCL ve PEG-PCL-PEG mikroküreler ve ilacın kendisi sağlıklı (travmaya bağlı veya osteoartrit hastalığı sürecinde total protez ameliyatı geçiren) veya RA'li hastalardan alınan sinoviyal sıvı ile 2 hafta boyunca inkübe edilmiştir. Sağlıklı veya RA'li hastalardan alınan sinoviyal sıvılara eklenen belli konsantrasyondaki anti-TNF α ilacın zamanla konsantrasyon miktarındaki değişim Şekil 60'da verilmiştir. 2 hafta boyunca sinoviyal sıvıda bekletilen anti-TNF α ilacının ELIZA yöntemiyle belirlenen konsantrasyonunda zamana bağlı olarak belirgin bir değişim olmamıştır ve ilaç biyolojik aktivitesini 37°C, %5'lik CO₂ ortamında 14 gün boyunca büyük ölçüde korumuştur.



Şekil 60. Sağlıklı ve RA'li hastalardan alınan sinoviyal sıvılara eklenen belli konsantrasyondaki anti-TNF ilacın zamanla konsantrasyonunda değişim (n=3) ▲ sağlıklı sinoviyal sıvı ortamına eklenen anti-TNF ilaç, ● RA'li hastalardan alınan sinoviyal sıvı ortamına eklenen anti-TNF ilaç

Projenin ilk aşamalarında, 10 mg/ml anti-TNF α ilaç yüklü PCL mikroküreler sağlıklı veya RA'li hastalardan alınan sinoviyal sıvı ile 2 hafta boyunca inkübe edilmiştir. Anti-TNF α yüklü PCL mikrokürelerden farklı zamanlarda sağlıklı veya RA'li hastalardan alınan sinoviyal sıvı ortamına çıkan biyoaktif anti-TNF α ilaç miktarı ELİZA yöntemi ile belirlenerek 1 miligram mikroküreden zamanla ortama çıkan biyoaktif ilacın mikrogram cinsinden miktarları Şekil 61'de verilmiştir. Sağlıklı ve RA'li hastalardan alınan sinoviyal sıvılardaki salım miktarları karşılaştırıldığında, ilk gün mikrokürelerden ortama çıkan anti-TNF α miktarları arasında belirgin bir fark gözlemlenmezken ($p > 0.05$), 2. günden sonra RA'li hastalardan alınan sinoviyal sıvılardaki salım miktarı artmış ve 14. günde ortama çıkan anti-TNF α miktarları arasında belirgin bir fark gözlemlenmiştir ($p \leq 0.05$). Eklemde sinoviyum tarafından salgılanan sinoviyal sıvı, lenfosit, monositler ve nötrofiller gibi çeşitli hücrelerin yanında proteinler, elektrolitler, glikoz ve hiyalüranik asit içeren oldukça viskoz bir sıvıdır (LIPOWITZ, 1985). Sağlıklı yetişkinlerin sinoviyal sıvısında, 2.5 – 4 mg/ml konsantrasyon aralığında $4 - 5 \times 10^6$ moleküler ağırlığına sahip hiyalüranik asit bulunmaktadır. Bu doğal polisakkarit sinoviyal sıvının viskoelastik davranışında, şok emiliminde ve eklemin kayganlığının sağlanmasında önemli bir rol oynamaktadır (RINAUDO, 2009). Osteoartirit ve Romatoid Artirit gibi dejeneratif hastalıklarda, sinoviyal sıvıdaki hiyalüranik asit miktarının azalmasına bağlı olarak sinoviyal sıvının miktarı ve

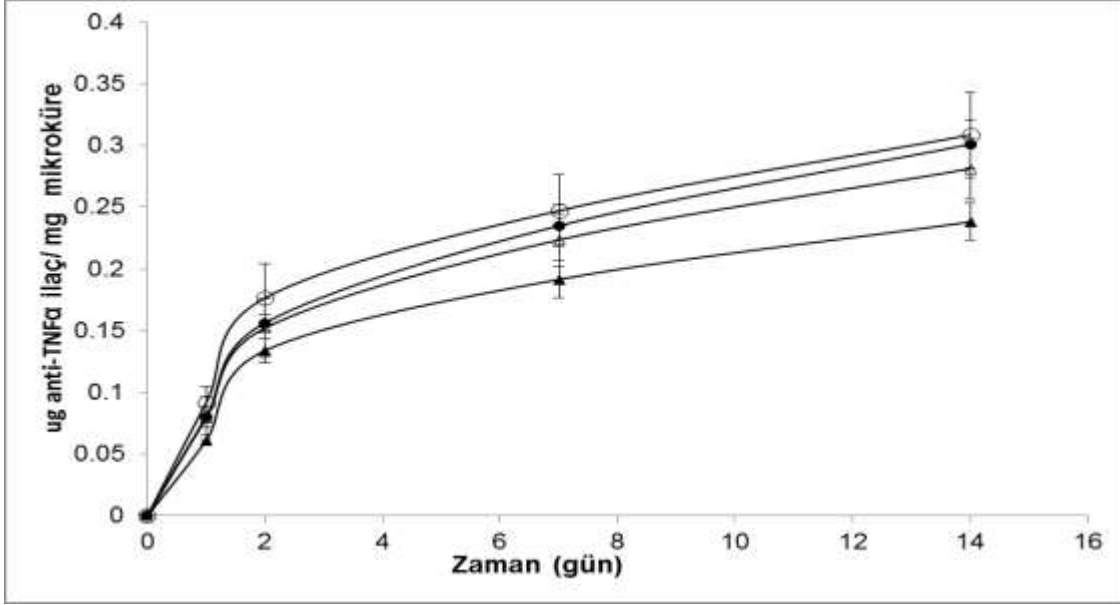
vizkozitesi de azalmaktadır (ALY, 2008,RINAUDO, 2009) . RA'li hastalardan alınan sinoviyal sıvının vizkozitesinin sağlıklı sinoviyal sıvıya göre daha düşük olması nedeniyle, PCL mikrokürelerden ortama salınan anti-TNF α miktarları RA'li hastalardan alınan sinoviyal sıvıda sağlıklı sinoviyal sıvıda bulunan miktardan belirgin olarak daha fazladır.



Şekil 61. Sağlıklı veya RA'li hastalardan alınan sinoviyal sıvı ortamında bekletilen 10 mg/ml anti-TNF α yüklü PCL mikrokürelerin ELİZA yöntemi ile incelenen 2 haftalık mg mikroküre başına ortama çıkan μ g ilaç salım profilleri (n=3) ▲ sağlıklı sinoviyal sıvı ortamında bekletilen anti-TNF α yüklü mikroküreler, ● RA'li hastalardan alınan sinoviyal sıvı ortamında bekletilen anti-TNF α yüklü mikroküreler

Projenin ilerleyen aşamalarında, projenin son aşamasında kullanılacak anti-TNF α yüklü PCL ve PEG-PCL-PEG mikrokürelerin iç faz anti-TNF α konsantrasyonu 25 mg/ml olarak belirlenmiştir. Bu iç faz protein konsantrasyonuna sahip anti-TNF α yüklü PEG-PCL-PEG mikroküreler sağlıklı veya RA'li hastalardan alınan sinoviyal sıvı ile 2 hafta boyunca inkübe edilmiştir. 25 mg/ml anti TNF α yüklü PCL ve PEG-PCL-PEG mikrokürelerden farklı zamanlarda sağlıklı veya RA'li hastalardan alınan sinoviyal sıvı ortamına çıkan biyoaktif anti-TNF α ilaç miktarı ELİZA yöntemi ile belirlenmiştir. 1 miligram mikroküreden zamanla ortama çıkan biyoaktif ilacın mikrogram cinsinden miktarları Şekil 62'de verilmiştir.. Ayrıca, gama sterilizasyonu yapılmış 25 mg/ml anti-TNF α yüklü PCL ve PEG-PCL-PEG mikrokürelerden 7. ve

14. günde sağlıklı veya RA'li hastalardan alınan sinoviyal sıvı ortamına çıkan toplam biyolojik olarak aktif protein miktarları Tablo 30'da karşılaştırılmıştır.



Şekil 62. Sağlıklı veya RA'li hastalardan alınan sinoviyal sıvı ortamında bekletilen 25 mg/ml anti-TNFα yüklü PCL ve PEG-PCL-PEG mikrokürelerin ELİZA yöntemi ile incelenen 2 haftalık mg mikroküre başına ortama çıkan µg ilaç salım profilleri (n=3) ▲ sağlıklı sinoviyal sıvı ortamında bekletilen 25 mg/ml anti-TNFα yüklü PCL mikroküreler, Δ RA'li hastalardan alınan sinoviyal sıvı ortamında bekletilen 25 mg/ml anti-TNFα yüklü PCL mikroküreler, ● sağlıklı sinoviyal sıvı ortamında bekletilen 25 mg/ml anti-TNFα yüklü PEG-PCL-PEG mikroküreler, ○ RA'li hastalardan alınan sinoviyal sıvı ortamında bekletilen 25 mg/ml anti-TNFα yüklü PEG-PCL-PEG mikroküreler

25 mg/ml anti-TNFα yüklü PCL mikrokürelerden sağlıklı ve RA'li hastalardan alınan sinoviyal sıvı ortamına salınan anti-TNFα miktarları karşılaştırıldığında, 7. günde PCL mikrokürelerden ortama çıkan anti-TNFα miktarları arasında belirgin bir fark gözlemlenmezken ($p > 0.05$), 14. günde sağlıklı ve RA'li hastalardan alınan sinoviyal sıvı ortamına salınan anti-TNFα miktarları arasında belirgin bir fark gözlemlenmiştir ($p \leq 0.05$). 25 mg/ml anti-TNFα yüklü PEG-PCL-PEG mikrokürelerden sağlıklı ve RA'li hastalardan alınan sinoviyal sıvı ortamına salınan anti-TNFα miktarları karşılaştırıldığında ise, 7. ve 14. günlerde sağlıklı ve RA'li hastalardan alınan sinoviyal sıvı ortamına salınan anti-TNFα miktarları arasında belirgin bir fark

gözlemlenmemiştir ($p > 0.05$). Tüm zamanlarda, PEG-PCL-PEG mikrokürelerden sağlıklı veya RA'li hastalardan alınan sinoviyal sıvı ortamına salınan anti-TNF α miktarları PCL mikrokürelerden sinoviyal sıvı ortamına salınan anti-TNF α miktarlarından belirgin olarak yüksek çıkmıştır ($p \leq 0.05$). Daha önceki bölümlerde de belirtildiği gibi, yüksek protein yükleme verimliliğinin ve PEG segmentinin varlığının 25 mg/ml anti-TNF α yüklü PCL mikrokürelere oranla PEG-PCL-PEG mikrokürelerden ortama daha çok ilacın çıkmasına neden olduğu düşünülmektedir. Ayrıca, Bölüm 3.2.4.2'de bahsedildiği gibi PEG-PCL-PEG mikrokürelerin yapısındaki PEG'in hücre vasatı içindeki serum proteinlerinin mikrokürelerin yüzeyine adsorpsiyonunu engelleyerek anti-TNF α ilacın dış ortama daha rahat çıkmasına neden olduğu düşünülmektedir.

25 mg/ml anti-TNF α yüklü PCL ve PEG-PCL-PEG mikrokürelerin, sağlıklı ve RA'li hastalardan alınan sinoviyal sıvı ortamında yapılan salım çalışmasının 7. gününde ortama çıkan anti-TNF α miktarı %5 serum içeren kültür vasatı ve PBS ortamında yapılan salım çalışmalarının 7. gününde ortama çıkan anti-TNF α miktarı ile Tablo 31'de karşılaştırılmıştır. Tüm salım ortamlarında PEG-PCL-PEG mikrokürelerden ortama çıkan anti-TNF α miktarları PCL mikrokürelerden ortama çıkan anti-TNF α miktarlarından belirgin olarak yüksek bulunmuştur ($p \leq 0.05$). PEG-PCL-PEG mikrokürelerin yüksek verimliliği ve hidrofilik PEG segmentinin yapıda olmasından dolayı bu mikrokürelerden ortama daha çok anti-TNF α 'nın çıktığı düşünülmektedir. Her iki mikroküre grubu için de, %5 serum içeren hücre kültürü vasatı içinde yapılan salım çalışmasının 7. gününde ortama çıkan ilaç miktarı sinoviyal sıvılar içinde yapılan salım çalışmalarının 7. gününde ortama çıkan ilaç miktarlarından yüksek olmasına karşın PBS içinde yapılan salım çalışmasının 7. gününde ortama çıkan ilaç miktarından belirgin olarak düşüktür. Bunun sebebi, hücre kültür vasatı içindeki serum proteinlerinin mikrokürelerin yüzeyine adsorpsiyonu sonucu anti-TNF α ilacın dış ortama difüzyonun sınırlanmasıdır. Non-spesifik protein adsorpsiyonu polimerik ilaç salım sistemlerinden ortama çıkan proteinin in vitro salım kinetiğini etkileyerek yavaş bir salım kinetiği göstermesine neden olmaktadır (CROTTS, 1997). Fakat, bu sınırlanma sinoviyal sıvıdaki kadar etkin olmadığı için hücre vasatı ortamındaki salım çalışmalarında ortama çıkan ilaç miktarı sinoviyal sıvı ortamındaki salım çalışmalarında ortama çıkan ilaç miktarından fazladır. Ayrıca, PCL ve PEG-PCL-PEG mikrokürelerden ortama salınan anti-TNF α miktarları RA'li hastalardan alınan sinoviyal sıvıda sağlıklı sinoviyal sıvıda bulunan miktardan belirgin olarak daha fazladır. Bunun nedeni, RA'li hastalardan alınan sinoviyal sıvının vizkozitesinin sağlıklı sinoviyal sıvıya göre daha düşük olmasıdır.

Table 30. Gama sterilizasyonu yapılmış 25 mg/ml anti-TNF α yüklü PCL ve PEG-PCL-PEG mikrokürelerden sağlıklı veya RA'li hastalardan alınan sinoviyal sıvı ortamına 7. ve 14. günde çıkan toplam biyolojik olarak aktif anti-TNF α 'in ELİZA yöntemi ile belirlenen miktarları

	$\mu\text{g anti-TNF}\alpha/\text{mg mikroküre}$	
	7.gün	14. gün
25 mg/ml anti-TNF α yüklü PCL mikroküreler (Sağlıklı sinoviyal sıvı salım çalışması)	0.19 \pm 0.02 *,>	0.24 \pm 0.02 #,<,'
25 mg/ml anti-TNF α yüklü PCL mikroküreler (RA'li hastalardan alınan sinoviyal sıvı salım çalışması)	0.22 \pm 0.02 &	0.28 \pm 0.02 #,\$
25 mg/ml anti-TNF α yüklü PEG-PCL-PEG mikroküreler (Sağlıklı sinoviyal sıvı salım çalışması)	0.23 \pm 0.02 *	0.30 \pm 0.02 <
25 mg/ml anti-TNF α yüklü PEG-PCL-PEG mikroküreler (RA'li hastalardan alınan sinoviyal sıvı salım çalışması)	0.25 \pm 0.03 >,&	0.31 \pm 0.04 ',\$

*, #, <,>, &, ', \$ Gruplar arası belirgin farklılıkları göstermektedir ($p \leq 0.05$).

Tablo 31. Gama sterilizasyonu yapılmış 25 mg/ml anti-TNF α yüklü PCL ve PEG-PCL-PEG mikrokürelerin, sağlıklı ve RA'li hastalardan alınan sinoviyal sıvı ortamında yapılan salım çalışmasının 7. gün sonunda ortama salınan toplam biyolojik olarak aktif anti-TNF α miktarları ile PBS ortamında yapılan salım çalışmasının ve %5 serum içeren hücre kültür vasatı ortamında yapılan salım çalışmasının 7. günündeki ortama salınan toplam biyolojik olarak aktif anti-TNF α miktarlarının karşılaştırılması

	μg anti-TNF/mg mikroküre	
	25 mg/ml anti-TNF α yüklü PCL mikroküreler	25 mg/ml anti-TNF α yüklü PEG-PCL-PEG mikroküreler
PBS salım çalışması 7. gün	2.27 \pm 0.18	4.16 \pm 0.24
% 5 serum içeren hücre kültür vasatı salım çalışması 7. gün salım örneği	0.55 \pm 0.05	0.85 \pm 0.30
Sağlıklı sinoviyal sıvı salım çalışması 7. gün salım örneği	0.19 \pm 0.02	0.23 \pm 0.02
RA'li hastalardan alınan sinoviyal sıvı salım çalışması 7. gün salım örneği	0.22 \pm 0.02	0.25 \pm 0.03

Tüm gruplar birbirinden $p \leq 0.05$ seviyesinde istatistiksel olarak farklı bulunmuştur.

Aşama 4: Anti-TNF α Yüklü PCL veya PEG-PCL-PEG Mikrokürelerin Romatoid Artritli (RA) Hastalardan Alınmış Sinovisit Hücreleri Üzerindeki Etkilerinin İncelenmesi

Projenin son aşamasında, 25 mg/ml anti-TNF α yüklü PCL veya PEG-PCL-PEG mikrokürelerden 1 ay süreyle salınan anti-TNF α 'in RA'li hasta kaynaklı sinoviyal fibroblast hücreler üzerindeki etkisi ve mikrokürelerden in vitro salım profilleri incelenmiştir. Bu çalışmada kullanılan sinoviyal fibroblast hücreler RA'e bağlı total eklem protez ameliyatı geçiren hastalardan alınan sinoviyal membranlardan izole edilmiş ve çoğaltılmıştır. Hasta seçimi Ortopedi Uzmanı Prof. Dr. Bülent Atilla ve Pediatri Nefroloji ve Romatoloji Uzmanı Prof. Dr. Seza Özen tarafından gerçekleştirilmiştir. Bu çalışmada, 5 kadın romatoid artrit hastasından alınan sinoviyal membranlar sinoviyal fibroblast hücrelerin izolasyonu için kullanılmıştır ve bu hastalara ait bilgiler Tablo 32'de verilmiştir.

Tablo 32. Çalışmada kullanılan sinoviyal fibroblast hücrelerin izolasyonunun yapıldığı sinoviyal membranların alındığı hastaların genel bilgileri

Hasta No	CRP (mg/L)	Sedimentasyon (mm/sa)	Romatoid Faktör
1	<0.33	29	ölçülmemiş
2	2.6	56	36.20
3	3.72	37	9.69
4	<0.33	28	379
5	1.92	45	ölçülmemiş

Aşama 4.1. Romatoid Artiritli (RA) Hastaların Total Eklem Replasmanı Operasyonu Sırasında ıkarılan Sinoviyal Membranlardan Sinovisit Hücrelerinin İzolasyonu

Hazırlanan 25 mg/ml anti-TNF α yüklü PCL veya PEG-PCL-PEG mikroküre salım sistemlerinin RA'li hasta kaynaklı sinoviyal fibroblast hücreler üzerindeki etkileri ve mikrokürelerden in vitro salım profilleri projenin son aşamasında incelenmiştir. Bu nedenle, sinoviyal fibroblast hücrelerin RA'e bağlı total eklem protez ameliyatı geçiren hastalardan alınan sinoviyal membranlardan izole edilmiş ve çoğaltılmıştır. 10x ve 20x büyütmelerde fotoğrafları çekilen sinoviyal fibroblast hücrelerin karakteristik ağsı bir morfolojiye sahip olduğu gözlemlenmiştir (şekil 63). Sinoviyal membrandan izole edilen sinoviyal fibroblast hücrelerin morfolojik özellikleri literatüre bakıldığında da önceki çalışmalarda RA'li hastaların diz ekleminde izole edilen sinoviyal fibroblast hücrelerin morfolojisiyle benzerlik göstermektedir (ZHANG, 1997,KUSUNOKI, 2005).

RA'li hastaların sinoviyal membranlarından izole edilmiş fibroblast hücreler serum içeren hücre kültür ortamında çoğaltılarak pasajlanmıştır. Ida ve ark.'nın yaptığı bir çalışmada (IDA, 2009) gözlemlendiği gibi, izole edildikten sonra en az 4. pasaja kadar getirilen sinoviyal hücrelerde makrofaj-benzeri hücrelerin yüzdesi azalırken fibroblast benzeri hücrelerin yüzdesi artmıştır. Literatürdeki, RA'li hastaların sinoviyal membranlarından izole edilmiş fibroblast hücre kullanılmış çalışmalara da bakıldığında genellikle yüksek pasajlarda sinoviyal hücreler kullanılmıştır (INOUE, 2001,HOSAKA, 2005,XU, 2010).



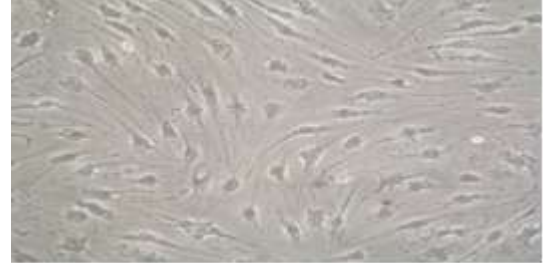
1. HASTA (10x)



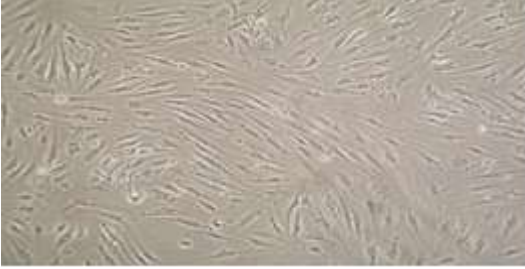
1. HASTA (20x)



2. HASTA (10x)



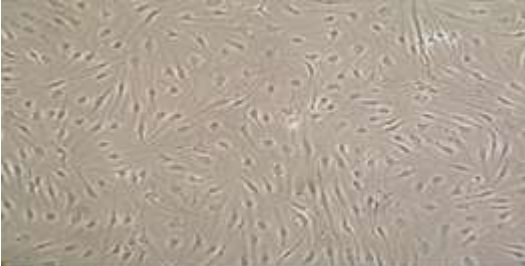
2. HASTA (20x)



3. HASTA (10x)



3. HASTA (20x)



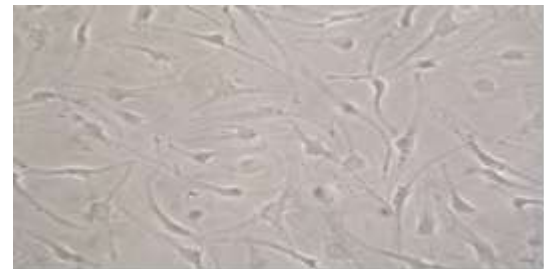
4. HASTA (10x)



4. HASTA (20x)



5. HASTA (10x)



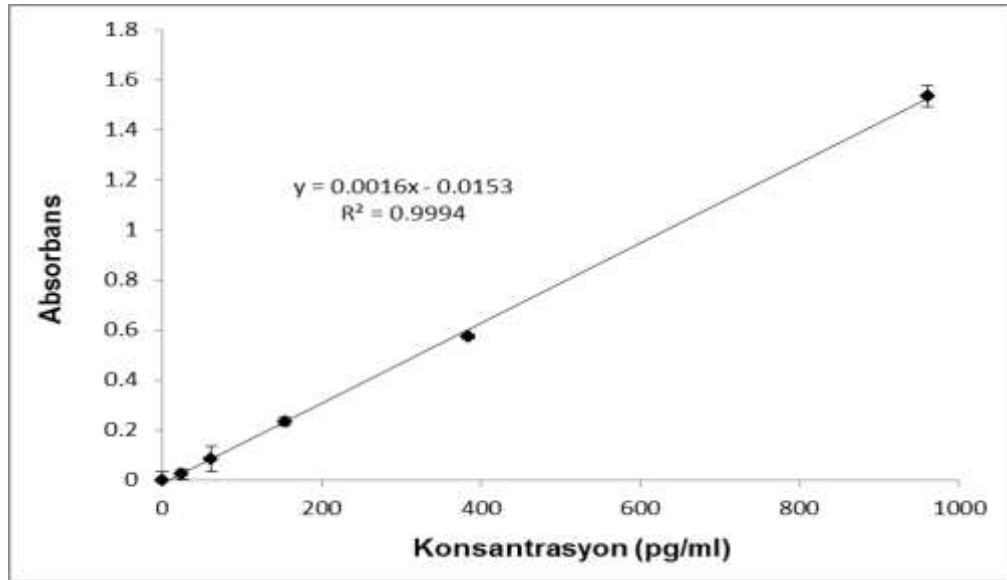
5. HASTA (20x)

Şekil 63. RA'li hastaların sinoviyal membranlarından izole edilen sinoviyal fibroblast hücrelerin faz kontrast mikrografileri

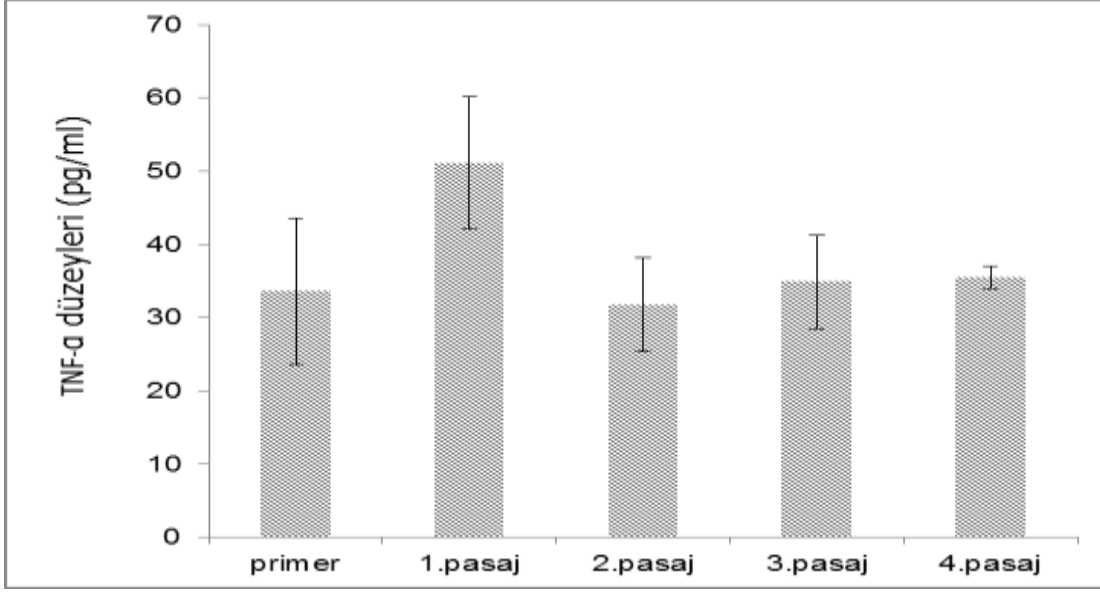
Aşama 4.2. Anti-TNF α Yüklü PCL veya PEG-PCL-PEG Mikrokürelerin Romatoid Artritli (RA) Hastalardan Alınmış Sinovisit Hücreler ile Etkileştirilmesi

RA'li hastalardan izole edilen sinoviyal fibroblast hücreler, tedavi amaçlı olarak hazırlanan anti-TNF α yüklü PCL ve PEG-PCL-PEG mikrokürelerle 1 ay boyunca kültive edildiği deneylerde kullanılacak parametrelerin belirlenmesi için projede belirtilmemesine karşın bazı ön denemeler yapılmıştır.

TNF- α 'nın RA hastalığının gelişimindeki etkin rolünden dolayı, RA'li hastaların sinoviyal fibroblast hücrelerin farklı pasajlardaki TNF- α miktarları ölçülmüş ve ileri pasajlarda TNF- α miktarları ile karşılaştırılması yapılmıştır. Hücre kültür vasatı ortamındaki TNF- α miktarlarını belirlemek için TNF- α standart çözeltileri kullanılarak ELİZA yöntemi ile kalibrasyon eğrisi oluşturulmuştur (Şekil 64). Yapılan projede planlanan hücre kültür çalışmaları için yapılan bu ön denemelerde farklı pasajlarında TNF- α konsantrasyonları 31-35 pg/ml TNF- α aralığında bulunmuştur (Şekil 65). 1. pasajdaki hücrelerin hücre kültür vasatı ortamında ölçülen TNF- α değerleri diğer pasajlarda okunan miktarlara oranla daha yüksek çıkmıştır ama farklı pasajlar arasında TNF- α değerleri belirgin bir değişim gözlemlenmemiştir.



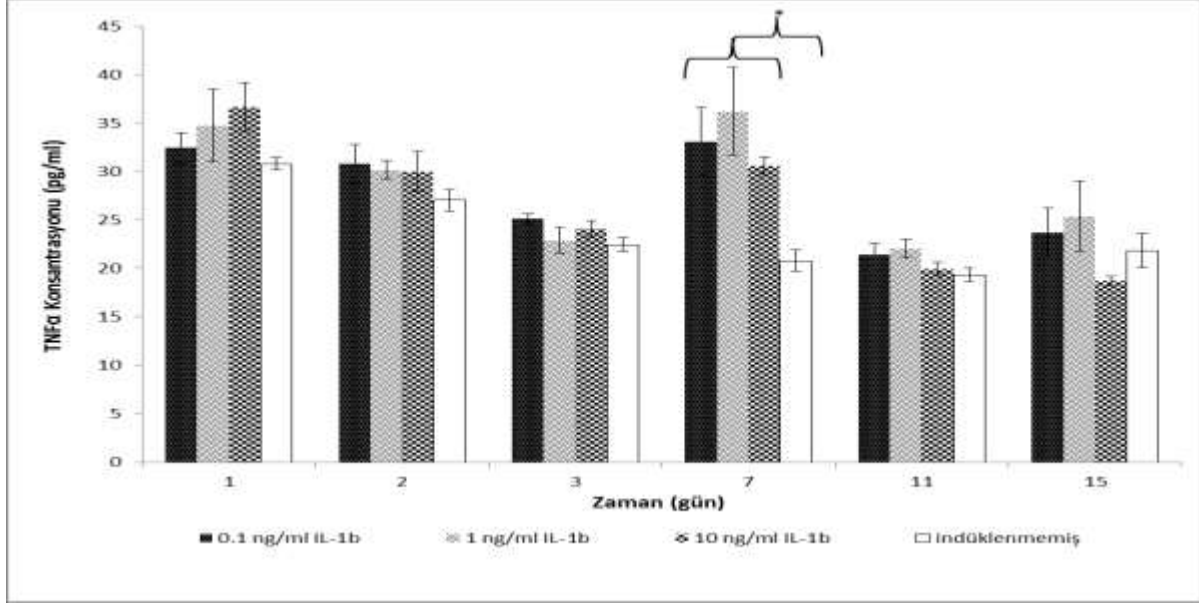
Şekil 64. Çeşitli pasajlardaki sinoviyal hücrelerde TNF- α miktarlarını belirleyebilmek için ELİZA analizinde kullanılan TNF- α kalibrasyon eğrisi



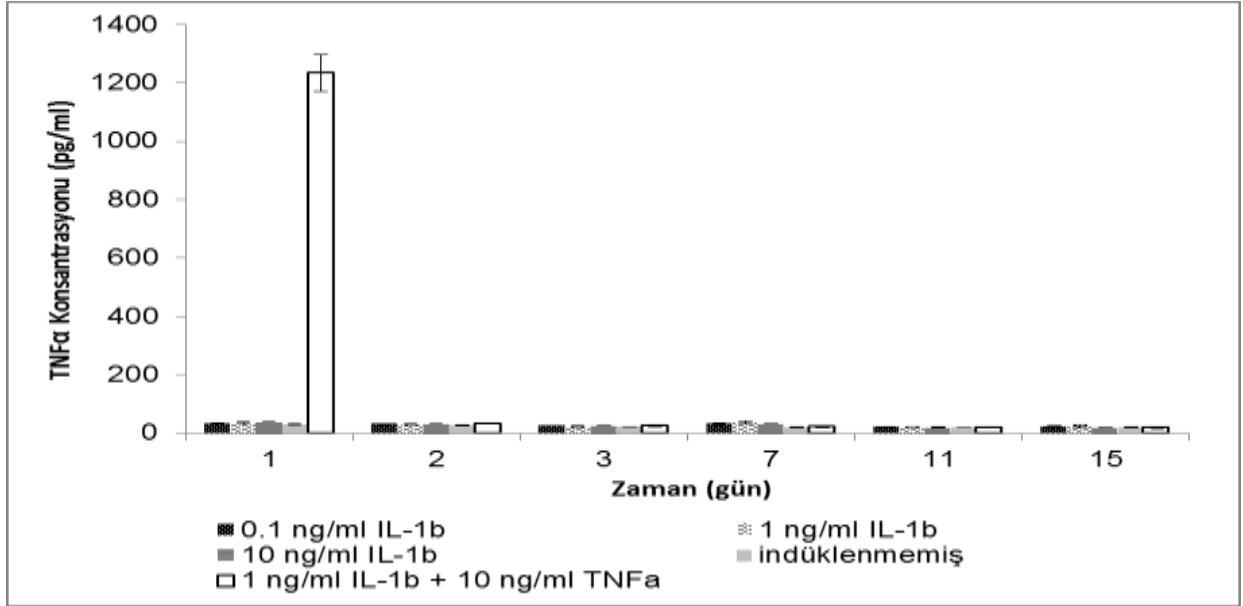
Şekil 65. Çeşitli pasajlardaki sinoviyal hücrelerde TNF α düzeyleri (n=2)

İkinci ön denemede ise, yüksek pasajlardaki sinoviyal hücre kültür ortamına farklı konsantrasyonlarda sadece interlekün-1 β (IL-1 β) ve IL-1 β ve TNF- α birlikte eklenerek ekleme öncesi ve sonrasındaki TNF- α değerlerindeki değişimler incelenmiştir (Şekiller 66-68). Farklı konsantrasyonlarda IL-1 β eklenmiş sinoviyal hücrelerdeki TNF- α düzeyleri IL-1 β eklenmemiş sinoviyal hücrelerdeki TNF- α düzeyleri ile karşılaştırıldığında, sadece 7. günde TNF α düzeyleri arasında belirgin bir fark gözlemlenmiştir (Şekil 66). Fakat, 0.1, 1 ve 10 ng/ml IL-1 β eklenmemiş sinoviyal hücrelerdeki TNF- α düzeyleri arasında belirgin bir farklılık gözlemlenmemiştir ($p > 0.05$). Ayrıca, 7. gün dışındaki günlerde IL-1 β eklenmiş veya eklenmemiş sinoviyal hücrelerin TNF- α düzeyleri arasında da belirgin bir fark gözlemlenmemiştir. İlk gün, IL-1 β ve TNF- α 'nın birlikte eklendiği sinoviyal hücrelerin TNF- α düzeyleri diğer deney gruplarının TNF- α düzeylerine oranla oldukça yüksek değerde okunmuştur (Şekil 67). İlk günde okunan TNF- α düzeyleri IL-1 β ve TNF- α eklendikten 24 saat sonra hücre kültürü vasatı değiştirilmeden okunmuştur. Bu nedenle, bu grupta okunan yüksek TNF- α değeri dışardan eklenen TNF- α 'dan kaynaklandığı için bu grup için okunan birinci gün TNF- α değeri çıkarılarak Şekil 67 Şekil 68'de yeniden düzenlenmiştir. 2. günde, IL-1 β ve TNF- α eklenmemiş sinoviyal hücrelerin TNF- α düzeyleri sadece IL-1 β ve IL-1 β ve TNF- α birlikte eklenmiş hücrelerin TNF- α düzeyinden düşük bulunmuştur. IL-1 β ve TNF- α eklenmemiş sinoviyal hücrelerin TNF- α düzeyleri IL-1 β ve TNF- α birlikte eklenmiş hücrelerin TNF- α düzeyinden belirgin olarak düşüktür ($p \leq 0.05$). 7. günde, farklı konsantrasyonlarda IL-1 β eklenmiş sinoviyal hücrelerdeki TNF- α düzeyleri IL-1 β ve TNF- α

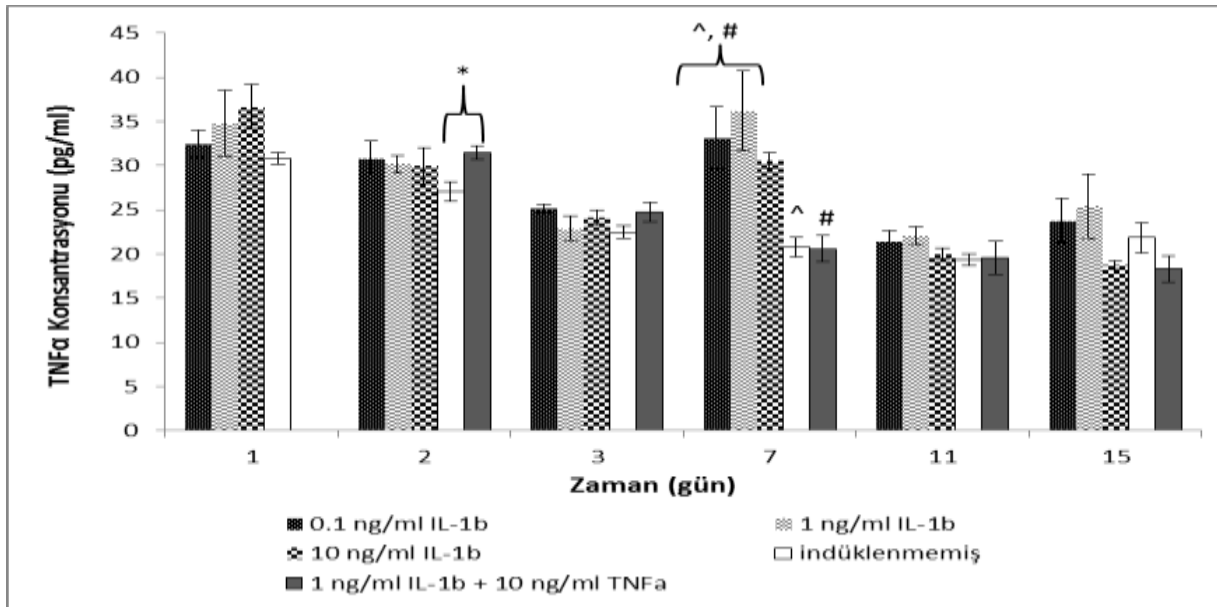
birlikte eklenmiş ve IL-1 β ve TNF- α eklenmemiş sinoviyal hücrelerin TNF- α düzeylerine oranla belirgin olarak yüksek okunmuştur ($p \leq 0.05$). 7. günden sonra deney gruplarının TNF- α düzeyleri arasında belirgin bir fark gözlemlenmemiştir.



Şekil 66. Farklı konsantrasyonlarda interlekün-1 β eklenmiş ve eklenmemiş sinoviyal fibroblast hücrelerden ortama salınan TNF- α miktarları

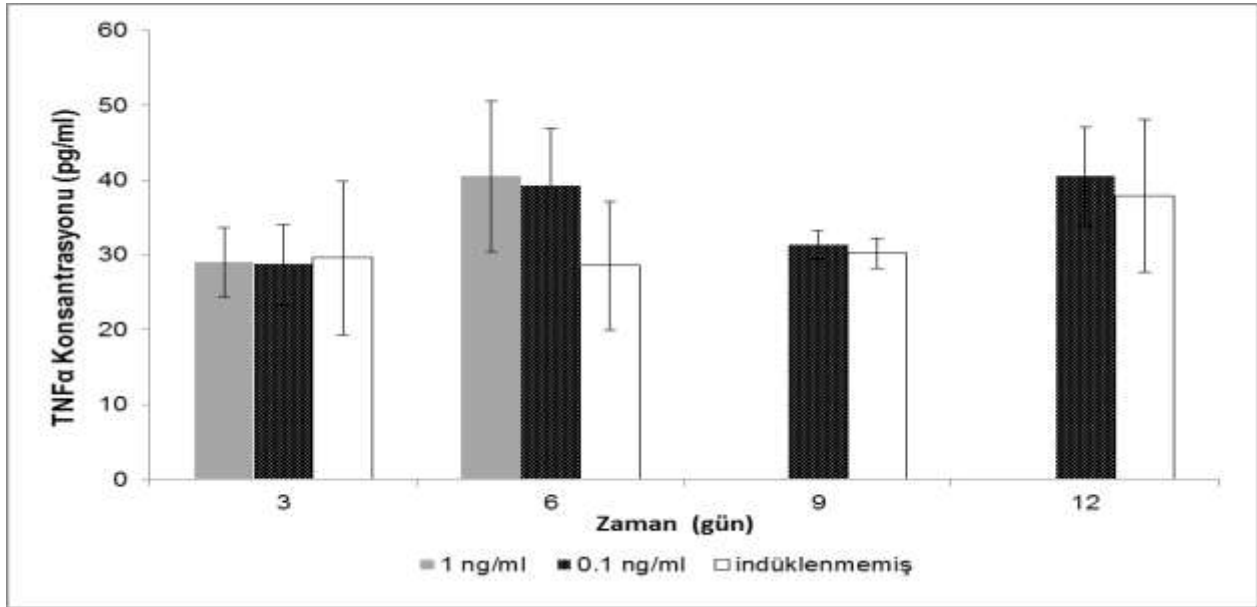


Şekil 67. Farklı konsantrasyonlarda interlekün-1β ve IL-1β ve TNF-α birlikte eklenmiş ve eklenmemiş sinoviyal fibroblast hücrelerden ortama salınan TNF-α miktarları



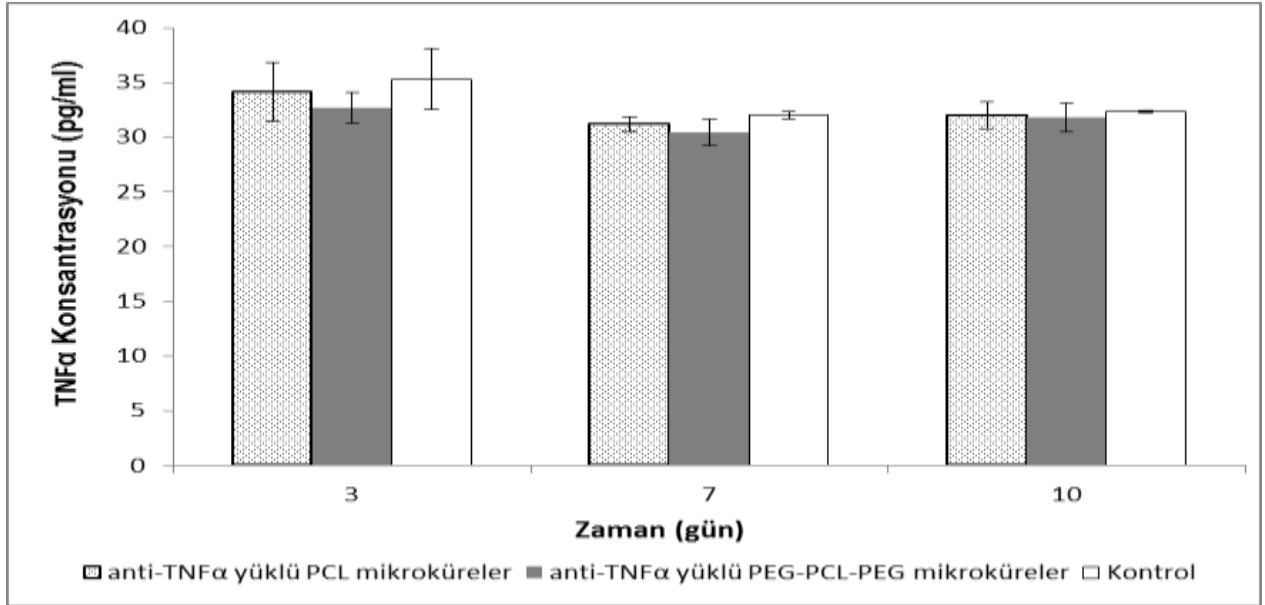
Şekil 68. Yeniden düzenlenen farklı konsantrasyonlarda interlekün-1β ve IL-1β ve TNF-α birlikte eklenmiş ve eklenmemiş sinoviyal fibroblast hücrelerden ortama salınan TNF-α miktarları

Yapılan üçüncü ön denemede, RA'li hastaların sinoviyal membranlarından izole edilmiş ve 4. pasaja getirilmiş sinoviyal fibroblast hücrelerin iki farklı konsantrasyondaki IL-1 β (0.1 ve 1 ng/ml) ile sürekli etkileştirilmesi sonucu oluşabilecek TNF- α değerlerindeki değişimler 12 gün boyunca incelenmiştir (Şekil 69). 12 gün boyunca sürekli IL-1 β eklenmiş sinoviyal fibroblast hücrelerin TNF- α düzeyleri ve IL-1 β eklenmemiş hücrelerin TNF- α düzeyleri arasında belirgin bir fark gözlemlenmemiştir (p > 0.05). 6. günün sonunda, 1 ng/ml IL-1 β eklenmiş sinoviyal hücreler yüzeyden kalktığı için sonraki zamanlarda bu gruba ait okumalar yapılamamıştır. Bu üç ön denemenin sonuçlarına bakıldığında, IL-1 β ve TNF- α eklenmesinin RA sinoviyal fibroblast hücreler tarafından ortama salgılanan TNF- α miktarlarında belirgin bir değişime neden olmadığı gözlemlenmiştir. Bu nedenle, projenin son aşamasında IL-1 β veya TNF- α eklenmemiş RA sinoviyal fibroblast hücrelerin 25 mg/ml anti-TNF α yüklü PCL ve PEG-PCL-PEG mikrokürelerle 4 hafta boyunca etkileştirilmesine karar verilmiştir.



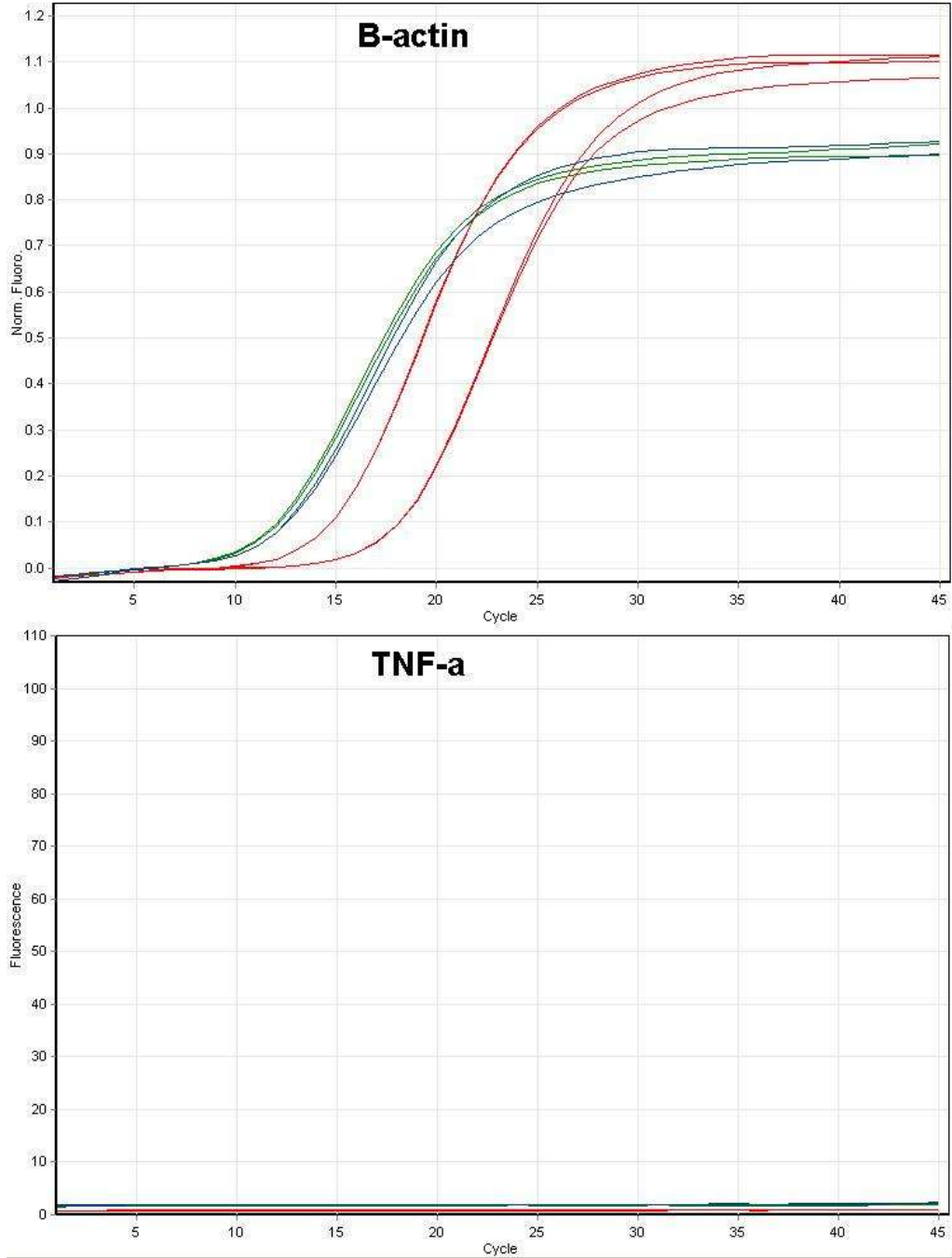
Şekil 69. Sürekli 0.1 ve 1 ng/ml interlekün-1 β eklenmiş ve eklenmemiş sinoviyal fibroblast hücrelerden ortama salınan TNF- α miktarları

Yapılan dördüncü ön denemede ise, anti-TNF α yüklü PCL ve PEG-PCL-PEG mikroküreler ile etkileştirilen RA sinoviyal fibroblast hücrelerden ortama salınan TNF- α miktarları ve mikrokürelerle etkileştirilmemiş RA sinoviyal fibroblast hücrelerden ortama salınan TNF- α miktarları 10 gün boyunca incelenmiştir (Şekil 70). Mikrokürelerle etkileştirilen ve etkileştirilmeyen sinoviyal fibroblast hücrelerden ortama salınan TNF- α miktarları arasında belirgin bir fark gözlemlenmemiştir. Etanercept (Enbrel) TNF- α yapısını nötralize eden bir biyolojik olduğu için TNF- α molekülü ortamdaki uzaklaşmamaktadır (GRATTENDICK, 2008). Ortamdan uzaklaşmayan etanercept bağlı TNF- α molekülleri ELİZA testinde kullanılan antikörlere bağlanarak yüksek TNF- α değerleri okunmasına neden olmaktadır. Bu nedenle, projenin son aşamasında ortama salgılanan etkin fizyolojik olarak aktif TNF- α miktarlarını ölçebilmek için TNF- α molekülüne duyarlı Wehi-164 var13 hücre hattının kullanıldığı TNF- α biyoaktivite testinin kullanılmasına karar verilerek bu test projeye dahil edilmiştir.



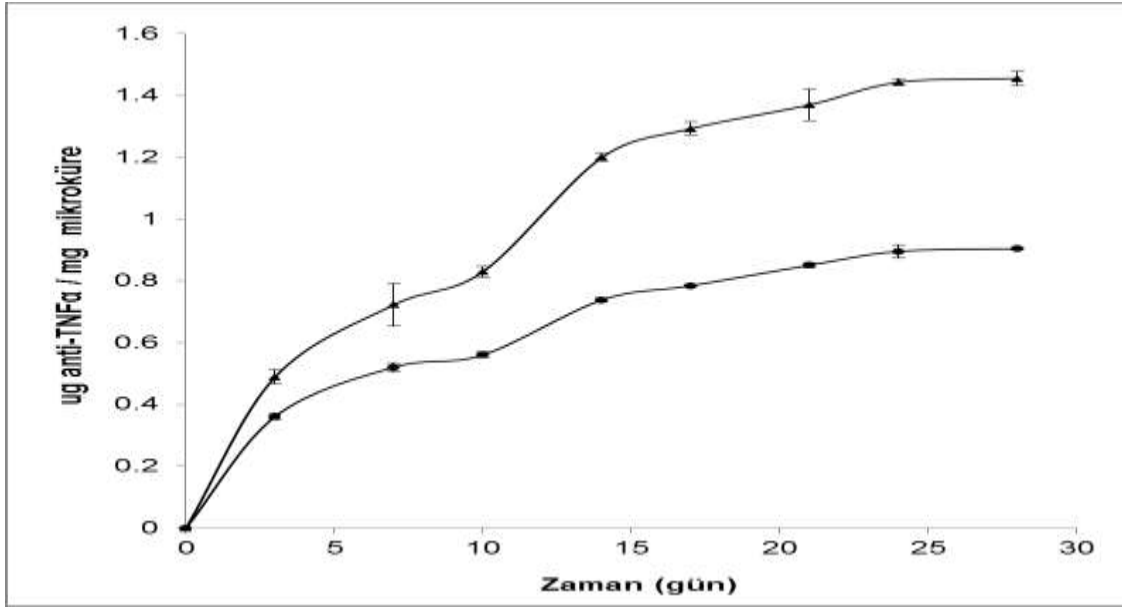
Şekil 70. Anti-TNF α yüklü PCL ve PEG-PCL-PEG mikroküreler ile etkileştirilen ve mikrokürelerle etkileştirilmemiş RA sinoviyal fibroblast hücrelerden 10 gün boyunca ortama salınan TNF- α miktarları

Son olarak, ilk RA'li hastadan eklem replasmanı sırasında alınan sinoviyal membranlardan enzimatik yöntemle izole edilen sinoviyal fibroblast hücrelerin 4. pasajındaki TNF- α gen ifadesi PCR yöntemi ile incelenmiştir. Gen ifade çalışmalarında göreceli gen ifadesinin doğru şekilde ortaya konabilmesi için ilgilenilen gene ait ifade değerlerinin bu dokuda çeşitli patolojik şartlarla ifade miktarının değişmediği öngörülen (bilinen) bir referans genin ifadesine normalize edilmesi gereklidir. Bu amaçla bu çalışmada beta aktin gen ifadesi kullanılmıştır. Çalışmada TNF- α 'ya özgü gen ifadesi verileri, beta aktin gen ifadesi verilerine normalize edilmiştir. Ayrıca, romatoid artritli dokudan elde edilen gen ifadesi verilerinin normal doku gen ifadesine de normalizasyonu amaçlanmış, bu şekilde verilerin "kat artışı" şeklinde göreceli gen ifadesine dönüştürülmesi sağlanmıştır. Şekil 71'de 5-10. döngülerde amplifiye olan normal ve RA'li hücrelerden elde edilen cDNA örnekleri ile beta aktin gen ifadesi karşılaştırılmıştır. Amplifikasyonlar ikişer adet bağımsız cDNA örneğinden yapılan üçlü tekrarların ortalamalarıdır. β -Actin mRNA'sı çok yüksek kalitede amplifiye olurken, TNF- α ifadesi saptanamamıştır. Bu hastanın, klinik bulguları incelendiğinde C-reaktif protein (CRP) değerinin düşük olduğu gözlemlenmiştir. CRP, iltihabi reaksiyonlar sırasında kanda miktarı artan ve karaciğer ile yağ hücreleri tarafından üretilen akut faz reaktanları adı verilen proteinlerden biridir. Klinik olarak aktif RA'li hastalarda yüksek CRP değerleri görülmektedir (STEPHENSEN, 2000). Pretzel ve ark. yaptığı bir çalışmada (PRETZEL, 2009), in vitro model oluşturulurken CRP değeri yüksek (47.6 mg/L) hastalarda çalışmıştır. Bu nedenle, bu projenin ilerleyen basamaklarında hücre izolasyonu ve çoğaltılabilmesi için yüksek CRP değerine sahip hastalardan alınan sinoviyal örneklerin kullanılmasına karar verilmiştir. Yüksek CRP seviyelerinin vücutta akut iltihabi bir reaksiyon veya bir enfeksiyon olduğunu, CRP seviyelerinin azalmasının da iltihabi reaksiyonun veya enfeksiyonun azalmaya başladığını göstermektedir.



Şekil 71. 5-10. döngülerde amplifiye olan normal ve RA'li hücrelerden elde edilen cDNA örnekleri ile beta aktin gen ifadesi

Yukarıda bahsedilen ön denemeler sonunda, RA'li hastalardan izole edilen sinoviyal fibroblast hücreler ile hazırlanan 25 mg/ml anti-TNF α yüklü PCL ve PEG-PCL-PEG mikrokürelerin 1 ay boyunca kültive edileceği deney koşulları belirlenmiştir. Bu çalışmada, sinoviyal fibroblast hücreler mikrokürelere ayrı bir ortamda kültive edilmiş ve belli zaman aralıklarında mikrokürelere ortamına salınan anti-TNF α 'yı içeren hücre kültür vasatı hücrelerin üzerine eklenmiştir. PCL ve PEG-PCL-PEG mikrokürelere ortamına çıkan anti-TNF α miktarları belirlenmiştir (Şekil 72). PCL ve PEG-PCL-PEG mikrokürelere ortamına çıkan anti-TNF α 'nın salım profili Bölüm 3.2.4.2 Şekil 59'da verilen 60 günlük salım profilleri ile benzerlik göstermektedir. 25 mg/ml anti-TNF α yüklü PCL ve PEG-PCL-PEG mikrokürelere ortamına çıkan protein miktarları kendi aralarında karşılaştırıldığında aralarında belirgin bir fark gözlemlenmiştir ($p \leq 0.05$). Bölüm 3.2.4.2'de bahsedildiği gibi, PEG-PCL-PEG mikrokürelere ortamına çıkan yüksek verimliliği ve yapıda hidrofilik PEG segmentinin bulunması bu mikrokürelere ortamına daha fazla anti-TNF α 'nın çıkmasına neden olmaktadır.



Şekil 72. Anti-TNF α yüklü PCL ve PEG-PCL-PEG mikrokürelere ortamına çıkan anti-TNF α miktarlarının zamanla değişimi. ● 25 mg/ml anti-TNF α yüklü PCL ve ▲ 25 mg/ml anti-TNF α yüklü PEG-PCL-PEG mikrokürelere ortamına çıkan anti-TNF α miktarları.

4.2.1. Anti-TNF α Yüklü PCL veya PEG-PCL-PEG Mikrokürelerin Romatoid Artiritli (RA) Hastalardan Alınmış Sinovisit Hücreler Üzerindeki Etkilerinin İncelenmesi

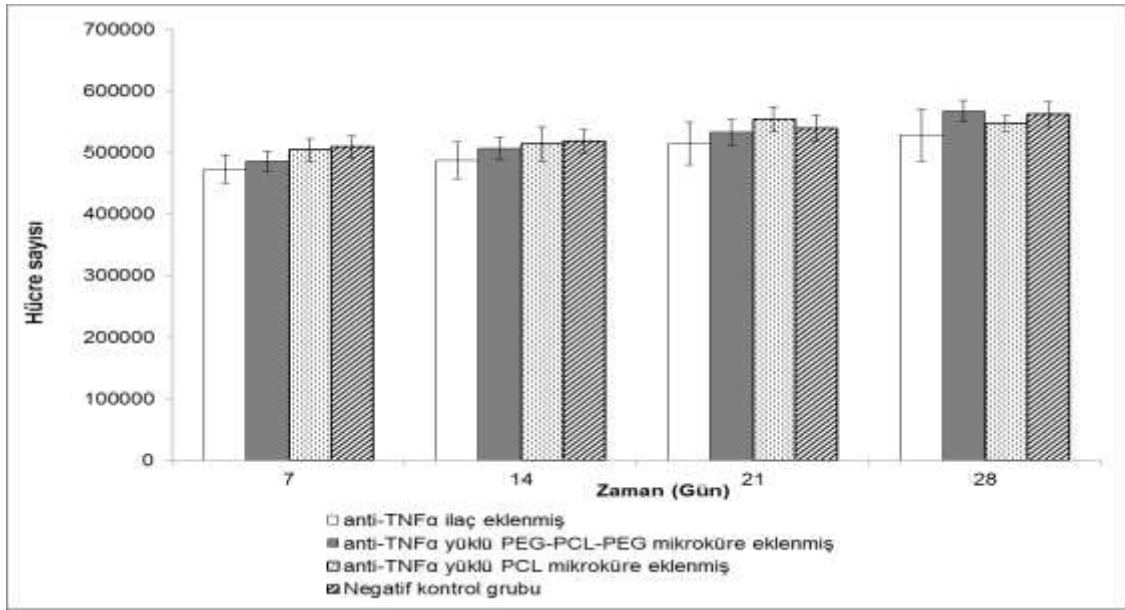
4.2.1.1. Anti-TNF α Yüklü PCL veya PEG-PCL-PEG Mikroküreler ile Etkileştirilen Sinovisit Hücrelerin Hücre Sayısı ve Canlılığı Özelliklerindeki Değişimlerin İncelenmesi

Geliştirilen anti-TNF α yüklü PCL ve PEG-PCL-PEG mikrokürelerin RA tedavi potansiyelinin incelenmesi için oluşturulan deney gruplarında, 1, 2, 3 ve 4 haftalık inkubasyonlar sonunda sinoviyal fibroblast hücrelerin sayısı ve hücre canlılığındaki değişimler incelenmiştir.

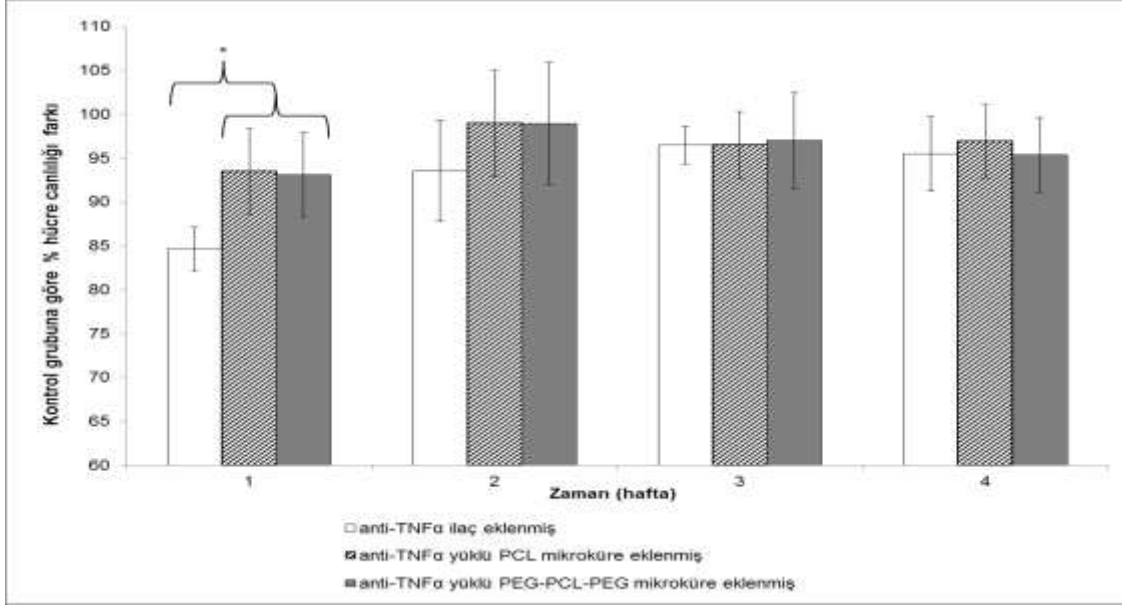
Serbest anti-TNF α ilaç ve 25 mg/ml anti-TNF α yüklü PCL ve PEG-PCL-PEG mikroküreler eklenmiş sinovisit hücrelerin hücre sayıları ilaç veya mikroküre eklenmemiş sinovisit hücrelerin (negatif kontrol grubu) sayısı ile Şekil 73'de karşılaştırılmıştır. Bütün zamanlarda, grupların hücre sayıları arasında belirgin bir fark gözlemlenmemiştir ($p > 0.05$). Sinoviyal fibroblast hücrelerle etkileştirilen serbest anti-TNF α ve anti-TNF α yüklü PCL ve PEG-PCL-PEG mikroküreler hücre sayılarında belirgin bir değişime neden olmamıştır.

25 mg/ml anti-TNF α yüklü PCL ve PEG-PCL-PEG mikroküreler ve serbest anti-TNF α ile etkileştirilen sinoviyal fibroblast hücrelerin canlılığının mikroküre ve serbest ilaç ile etkileştirilmeyen hücrelere oranla değişimleri 28 gün boyunca alamar mavisi testi ile incelenmiştir (Şekil 68). 1. Hafta sonuçlarına bakıldığında, serbest anti-TNF α ile etkileştirilmiş sinoviyal fibroblast hücrelerin canlılığı PCL ve PEG-PCL-PEG mikrokürelerle etkileştirilen hücrelerin canlılığından belirgin olarak düşük bulunmuştur ($p \leq 0.05$). Diğer zamanlarda ise, grupların canlılık değerleri arasında belirgin bir fark gözlemlenmemiştir ($p > 0.05$). Sinovisit hücreler ve anti-TNF α çözeltisinin etkileştirildiği grupta 5 mg mikrokürede bulunan yaklaşık anti-TNF α miktarını (10 μ g/ml) içeren hücre kültür ortamı tek seferde sinoviyal fibroblast hücreler ile etkileştirilmiştir. Şekil 73'de hücre sayılarında gruplar arasında istatistiksel bir farklılık gözlenmezken ilk iki günde serbest ilaç grubunda hücre canlılığı düşmüştür (Şekil 74). Yüksek dozda ilacın eklenmesi ilk haftada sinoviyal fibroblast hücrelerin canlılığında bir düşüşe neden olsa da ilerleyen zamanda hücre kültür vasatının değiştirilmesi sonucu ortamdaki serbest ilacın miktarının azalması ile hücrelerin canlılığında bir artış görülmüştür. Anti-TNF α ilacın

mikrokürelere ortamına yavaş salınmasından dolayı, mikrokürelere ile etkileştirilen sinoviyal fibroblast hücrelerin canlılığında herhangi bir düşme görülmemiştir. Elde edilen sonuçlar klinikte yüksek ilaç dozuna bağlı gelişen toksisite, hastanın hayat kalitesinin düşmesi, uygulanan bölgede yaşanan ağrı,acı, fonksiyon kaybı, vb sorunlar (O'DELL, 1997,CHATZIGIANNIS, 2004) ve literatürde farklı ilaçlar için yapılan in vitro sitotoksite çalışmalarında gösterilen doza bağlı sitotoksite sonuçları ile uyumludur (NUZZI, 2012). Ayrıca elde edilen sonuçlar kontrollü salım sistemlerinin klinikte uygulama potansiyellerinin yüksek olduğunu göstermektedir.



Şekil 73. Serbest anti-TNF α ilaç ve 25 mg/ml anti-TNF α yüklü PEG-PCL-PEG ve PCL mikrokürelere eklenmiş veya eklenmemiş sinoviyal hücrelerin hücre sayıları



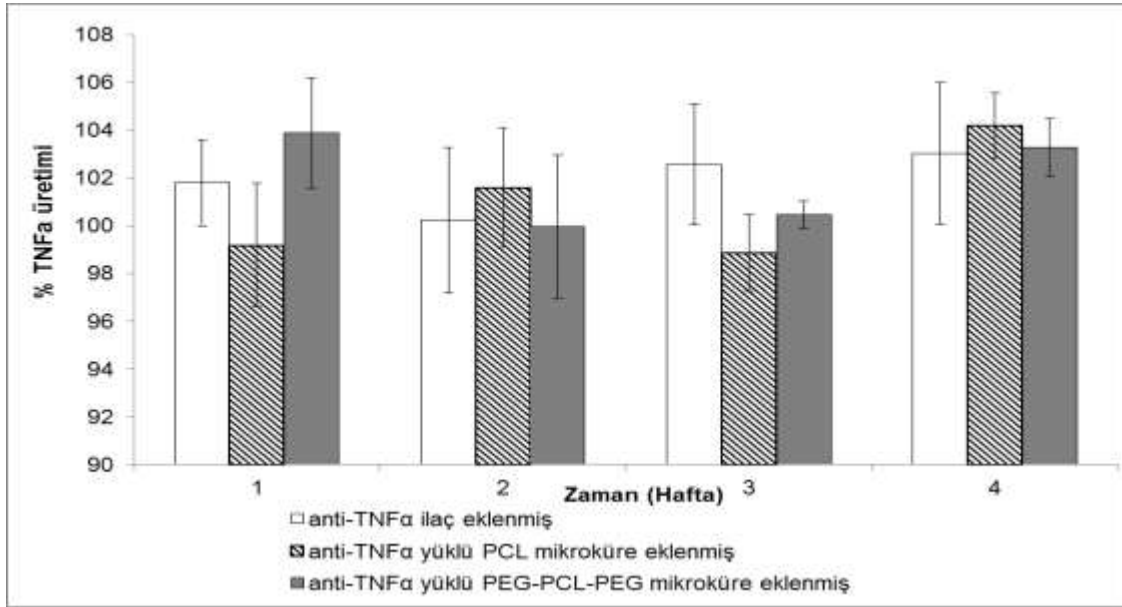
Şekil 74. Serbest anti-TNF α ilaç ve 25 mg/ml anti-TNF α yüklü PEG-PCL-PEG ve PCL mikroküreler ile etkileştirilen sinovisit hücrelerin mikroküre veya serbest ilaç ile etkileştirilmeyen sinovisit hücrelerin canlılığına oranları

4.2.1.2. Anti-TNF α Yüklü PCL veya PEG-PCL-PEG Mikroküreler ile Etkileştirilen Sinovisit Hücrelerin Proinflamatuvar Sitokin ve Metalloproteaz Düzeylerindeki Değişimlerin İncelenmesi

Inflamatuvar başlatan ve durduran sitokinler arasındaki denge romatoid artrit hastalığının karakteristik patolojik özelliklerini önemli ölçüde etkilemektedir. Interlökin-1 β (IL-1 β) ve tumor nekrosis faktör alfa (TNF- α) hastalık sırasındaki iltihabın devam etmesi ve doku hasarının oluşmasına neden olan proinflamatuvar sitokinlerin en önemlileridir. Bu nedenle, biyolojikleri hedef alan tedavi yöntemlerinde bu iki sitokini hedef alan ilaçların geliştirilmesine ağırlık verilmektedir. TNF- α ve IL-1 β benzer biyolojik etkiye sahip olmasına rağmen, TNF α sistemik ve lokal inflamasyona sebep olurken IL-1 β kıkırdak ve kemik hasarında rol almaktadır. Ayrıca TNF α 'nın bloke edilmesi hastalık sırasında üretilen IL-1, IL-6, IL-8 ve GM-CSF gibi diğer proinflamatuvar sitokinlerin de üretimini belirgin olarak düşürmektedir (CHOY, 2001). Bu nedenle, 25 mg/ml anti-TNF α yüklü PCL ve PEG-PCL-PEG mikrokürelerin RA tedavi potansiyelinin incelenmesi için oluşturulan deney gruplarında 1, 2, 3 ve 4 haftalık inkubasyonlar sonunda RA'li sinovisit hücreleri tarafından enflamasyon sırasında ortama salgılanan TNF- α düzeylerindeki

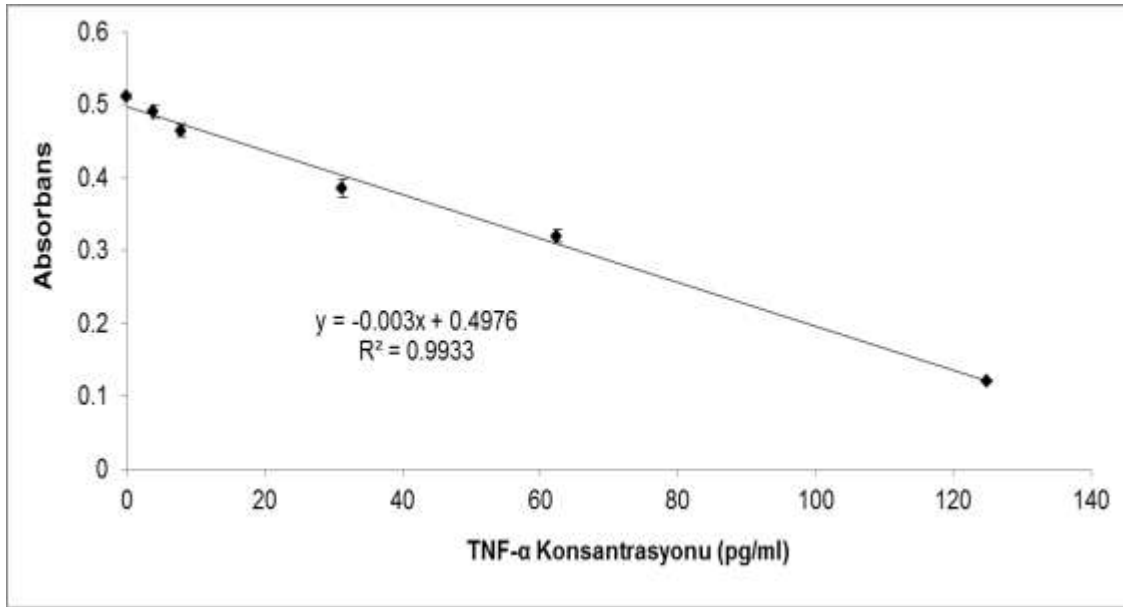
değişimler incelenmiş ve tedavi görmemiş sinovisit hücreler (negatif kontrol grubu) ile karşılaştırılmıştır. Ayrıca, bu çalışmada RA patolojisinde etkin rol oynayan başlıca sitokinlerden, IL-6 (AREND, 2001,LIPSKY, 2006,BRENNAN, 2008), IL-17 (AREND, 2001,MIOSSEC, 2003,BRENNAN, 2008) ve IFN- γ (FELDMANN, 1996,AREND, 2001) ve matriks metalloproteazdan MMP-3 (SO, 1999,CLOSE, 2001) ve MMP-13 (MOORE, 2000,CLOSE, 2001) düzeyleri de 1, 2, 3 ve 4 haftalık inkubasyonlar sonunda tedavi görmemiş sinovisit hücrelerdeki düzeylerle ile karşılaştırılmıştır.

25 mg/ml anti-TNF α yüklü PCL ve PEG-PCL-PEG mikroküreler ve serbest anti-TNF α ile etkileştirilmiş sinoviyal fibroblast hücrelerden ortama salgılanan TNF- α miktarları ELİZA testi ile incelenerek negatif kontrol grubundaki hücrelerden ortama salgılanan TNF- α miktarları karşılaştırılmış ve Şekil 75'de zamana bağlı %TNF- α üretimi verilmiştir. Tüm zamanlarda, grupların %TNF- α üretim miktarı arasında belirgin bir fark gözlemlenmemiştir (p > 0.05).



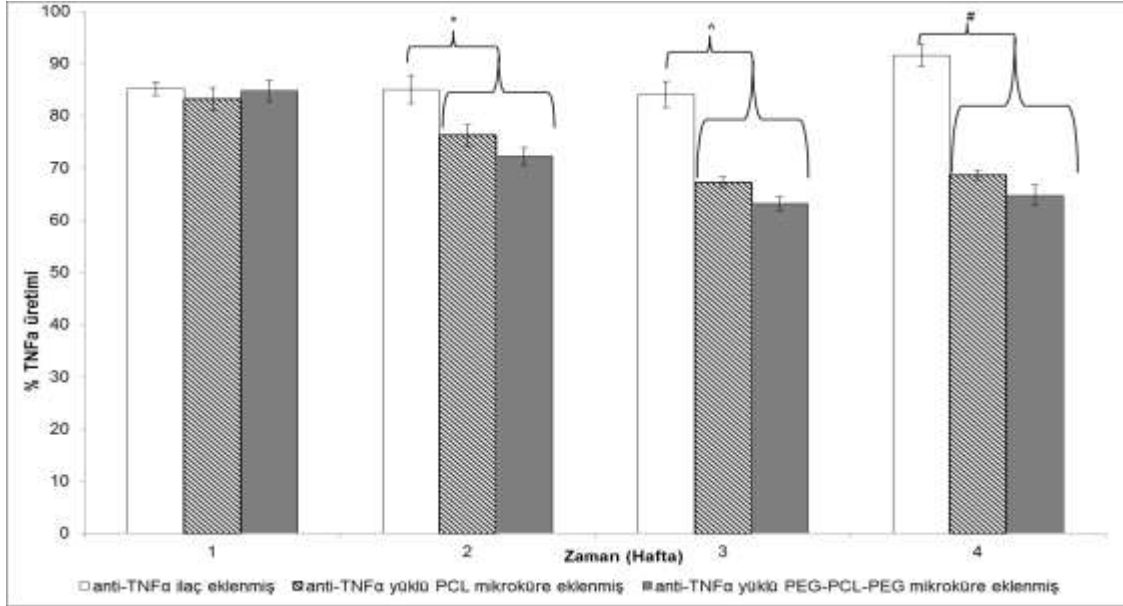
Şekil 75. 25 mg/ml anti-TNF α yüklü PCL ve PEG-PCL-PEG mikroküreler ve serbest anti-TNF α ile etkileştirilmiş sinoviyal fibroblast hücrelerin negatif kontrol grubuna göre % TNF- α üretimi

Kullanılan anti-TNF α ilacın (Enbrel®) etken maddesi etanercept ortamda bulunan TNF- α moleküllerine bağlanarak nötralize ederek bu sitokinin aktivitesini engellemektedir (GRATTENDICK, 2008). Etanersept bağlı TNF- α molekülleri ortamdaki uzaklaşmadığı için TNF- α ELİZA testinde kullanılan antikorlara etanercept bağlı TNF- α molekülleri bağlanarak ortamda bulunan TNF- α miktarları arasında bir farkın olup olmadığının belirlenebilmesini engellemektedir. Bu nedenle, ortama salgılanan fizyolojik olarak aktif TNF- α miktarlarını ölçebilmek için TNF- α molekülüne duyarlı Wehi-164 var13 hücre hattının kullanıldığı TNF- α biyoaktivite testi kullanılmıştır. Fizyolojik olarak aktif TNF- α miktarlarının belirlenebilmesi için, belirli konsantrasyonlarda insan TNF- α içeren standart çözeltiler hazırlanarak Wehi-164 hücrelerine eklenmiş ve yapılan MTT canlılık analizinde okunan abzorbanza karşı ortama eklenmiş TNF- α miktarları belirlenerek bir kalibrasyon eğrisi hazırlanmıştır (Şekil 76).



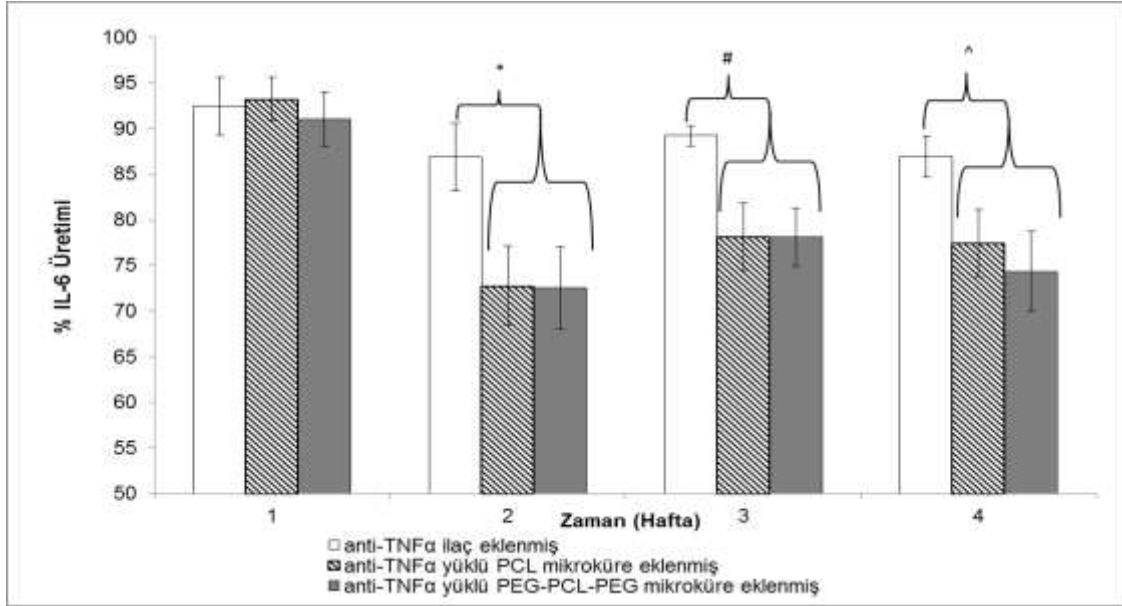
Şekil 76. Fizyolojik olarak aktif TNF- α miktarlarının belirlenebilmesi için belirli konsantrasyonlarda insan TNF- α standart çözeltilerinin Wehi-164 hücre hattına eklenmesi sonucu MTT canlılık analizinde abzorbanza değişimleri ile oluşturulan kalibrasyon eğrisi

Anti-TNF α yüklü PCL ve PEG-PCL-PEG mikroküreler ve serbest anti-TNF α ile etkileştirilmiş sinoviyal fibroblast hücrelerden ortama salgılanan fizyolojik olarak aktif TNF- α miktarları negatif kontrol grubundaki hücrelerden ortama salgılanan fizyolojik olarak aktif TNF- α miktarları ile karşılaştırılarak zamana bağlı %TNF- α üretimi belirlenmiştir (Şekil 77). 2. Haftadan itibaren, anti-TNF α yüklü PCL ve PEG-PCL-PEG mikrokürlerle etkileştirilen RA sinoviyal fibroblast hücrelerden ortama çıkan TNF- α miktarları serbest anti-TNF α ile etkileştirilen hücrelerden ortama çıkan TNF- α miktarlarına göre belirgin olarak düşük bulunmuştur ($p \leq 0.05$). 2. haftadan sonra, PCL ve PEG-PCL-PEG mikrokürelerle etkileştirilen sinoviyal fibroblast hücrelerden ortama çıkan fizyolojik olarak aktif TNF- α miktarlarında %35 civarında düşüş gözlemlenirken serbest anti-TNF α ile etkileştirilmiş sinoviyal fibroblast hücrelerden ortama salgılanan fizyolojik olarak aktif TNF- α miktarlarında % 10-15 aralığında bir düşüş gözlemlenmiştir. TNF- α monosit ve makrofajlar yanında B ve T hücreleri ve de fibroblastlar tarafından üretilen ve fibroblast hücreleri indükleyip hücre içi yapışma molekülü I (intercellular adhesion molecule I) gibi yapışma (adhesion) moleküllerinin açığa çıkmasını sağlayarak enflamasyonun başlamasına neden olan bir sitokindir (CHOY, 2001). Literatüre bakıldığında, TNF- α düzeyleri ve RA 'li hastalarının hastalık aktivitesi arasında bir bağlantı olduğu gösterilmiştir (SAXNE, 1988, BECKHAM, 1992). PCL ve PEG-PCL-PEG mikrokürelerden anti-TNF α ilacın ortama sürekli çıkmasından dolayı çalışmanın 2. haftasından sonra TNF- α miktarlarından azalma görülmüştür. Fakat, serbest anti-TNF α ile etkileştirilmiş sinoviyal fibroblast hücrelerin olduğu grupta hücre kültür vasatının değiştirilmesiyle zamanla ortamdaki anti-TNF α miktarları etkin düzeyde kalamadığı için ortamdaki aktif TNF- α miktarlarında belirgin bir düşüş olmamıştır. İlk zamanlarda fizyolojik olarak aktif TNF- α miktarlarındaki düşüş % 15 civarındayken 4. haftada düşüş miktarı azalmış ve %10 civarında olmuştur.



şekil 77. 25 mg/ml anti-TNF α yüklü PCL ve PEG-PCL-PEG mikroküreler ve serbest anti-TNF α ile etkileştirilmiş sinoviyal fibroblast hücrelerin negatif kontrol grubuna göre fizyolojik olarak aktif %TNF- α üretimi

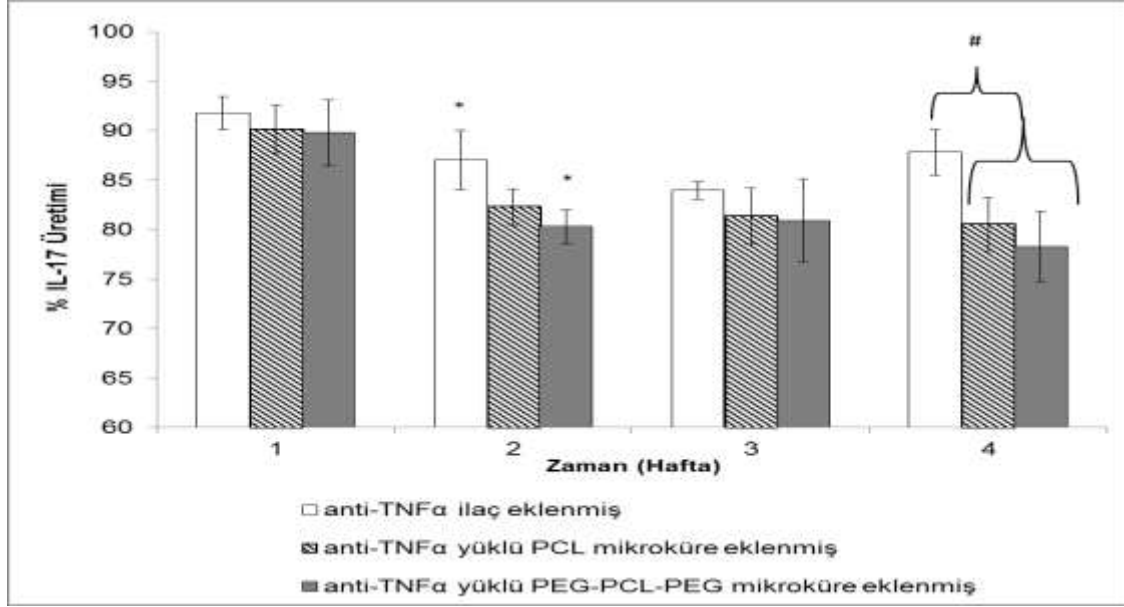
25 mg/ml anti-TNF α yüklü PCL ve PEG-PCL-PEG mikroküreler ve serbest anti-TNF α ile etkileştirilmiş sinoviyal fibroblast hücrelerden ortama salgılanan IL-6 miktarları ile negatif kontrol grubundaki hücrelerden ortama salgılanan IL-6 miktarları karşılaştırılarak şekil 78’de zamana bağlı %IL-6 üretim değerleri verilmiştir. 2. haftadan itibaren, anti-TNF α yüklü PCL ve PEG-PCL-PEG mikrokürlerle etkileştirilen RA sinoviyal fibroblast hücrelerden ortama çıkan IL-6 miktarları %25-30 civarında düşerken serbest anti-TNF α ile etkileştirilen hücrelerden ortama çıkan IL-6 miktarları %10-15 civarında düşmüştür. Fakat, PCL ve PEG-PCL-PEG mikrokürelerle etkileştirilen hücrelerden ortama salgılanan IL-6 miktarları arasında tüm zamanlarda belirgin bir fark gözlemlenmemiştir ($p > 0.05$). IL-6, aralarında fibroblast, monosit ve endotelial hücrelerin de bulunduğu birçok hücrenin uyarılması sonucu sentezlenerek ortama salınmaktadır (EMERY, 1993). TNF- α , hastalık sırasında üretilen proinflamatuvar sitokin IL-6’nın da üretimini etkilemektedir (CHOY, 2001). Bu nedenle, anti-TNF α yüklü PCL ve PEG-PCL-PEG mikroküreler ile etkileştirilen sinoviyal fibroblast hclerdeki IL-6 miktarlarındaki düşüş şekil 71’de verilen TNF- α miktarlarındaki düşüşle orantılı olmuştur.



şekil 78. 25 mg/ml anti-TNFα yüklü PCL ve PEG-PCL-PEG mikroküreler ve serbest anti-TNFα ile etkileştirilmiş sinoviyal fibroblast hücrelerin negatif kontrol grubuna göre %IL-6 retimi

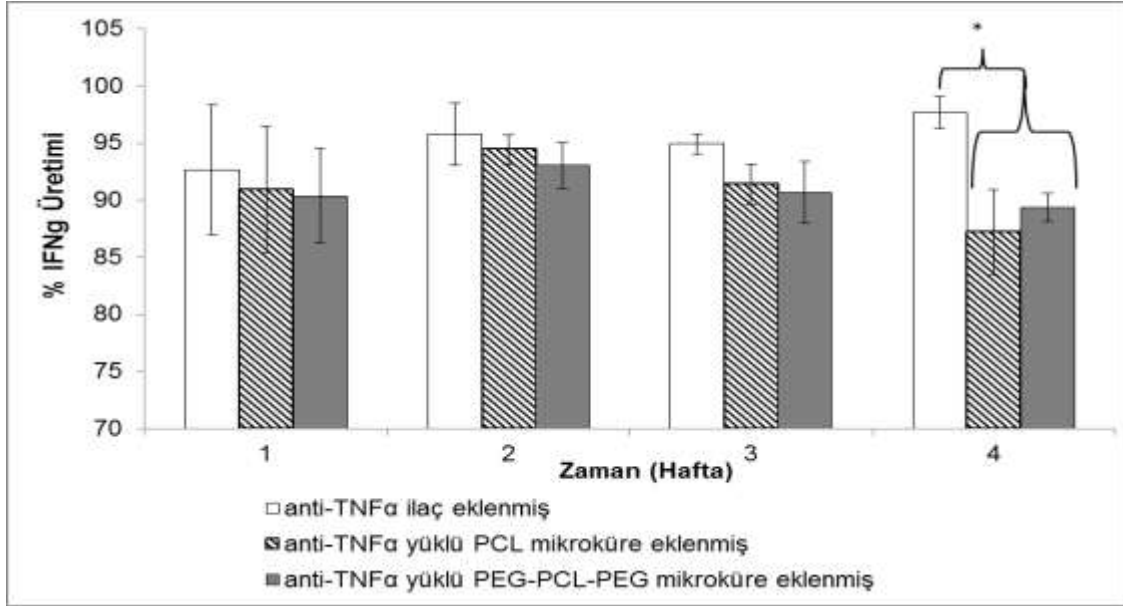
Serbest anti-TNFα ilaç ve 25 mg/ml anti-TNFα yüklü PCL ve PEG-PCL-PEG mikroküreler ile etkileştirilen sinoviyal fibroblast hücrelerden ortama salgılanan IL-17 miktarları negatif kontrol grubundaki hücrelerden ortama salgılanan IL-17 miktarlarına oranlanarak zamana bağlı % IL-17 retim değerleri bulunmuştur (şekil 79). 2. Haftada, anti-TNFα yüklü PEG-PCL-PEG mikrokürlerle etkileştirilen RA sinoviyal fibroblast hücrelerden ortama çıkan IL-17 miktarları serbest anti-TNFα ile etkileştirilen hücrelerden ortama çıkan IL-17 miktarlarına göre belirgin olarak düşük bulunmuştur ($p \leq 0.05$). 4. haftada ise, anti-TNFα yüklü PCL ve PEG-PCL-PEG mikrokürlerle etkileştirilen RA sinoviyal fibroblast hücrelerden ortama çıkan IL-17 miktarları serbest anti-TNFα ile etkileştirilen hücrelerden ortama çıkan IL-17 miktarlarına göre belirgin olarak düşük bulunmuştur ($p \leq 0.05$). IL-17, sinoviumdaki CD4⁺ T hücreleri arasında bağlantıyı sağlayarak sinoviyal fibroblastlar tarafından IL-17, IL-6, IL-8 ve GM-CSF gibi proinflamatuvar sitokinlerin üretimine neden olmaktadır (AREND, 2001). Ayrıca, IL-17 IL-1β ve TNF-α üretimini de etkilemektedir (AREND, 2001). şekil 71’de verilen TNF-α ve şekil 72’de verilen IL-6 miktarlarında 2. haftada başlayan düşmeler kadar belirgin olmasa da anti-TNFα yüklü PCL ve PEG-PCL-PEG mikrokürlerle etkileştirilen RA sinoviyal fibroblast hücrelerden ortama çıkan IL-17 miktarlarında da 2. haftadan itibaren düşme grlmştş. IL-17 miktarlarındaki düşüşün IL-6 ve TNF-α üretimine etki etmesi sonucu, anti-TNFα yüklü PCL ve PEG-PCL-PEG mikrokürlerle

etkileştirilen RA sinoviyal fibroblast hücrelerden ortama çıkan IL-6 ve TNF- α miktarlarındaki düşün ikinci haftadan itibaren biraz daha belirgin olduğu düşünölmektedir.



Şekil 79. 25 mg/ml anti-TNF α yüklü PCL ve PEG-PCL-PEG mikroküreler ve serbest anti-TNF α ile etkileştirilmiş sinoviyal fibroblast hücrelerin negatif kontrol grubuna göre %IL-17 üretimi

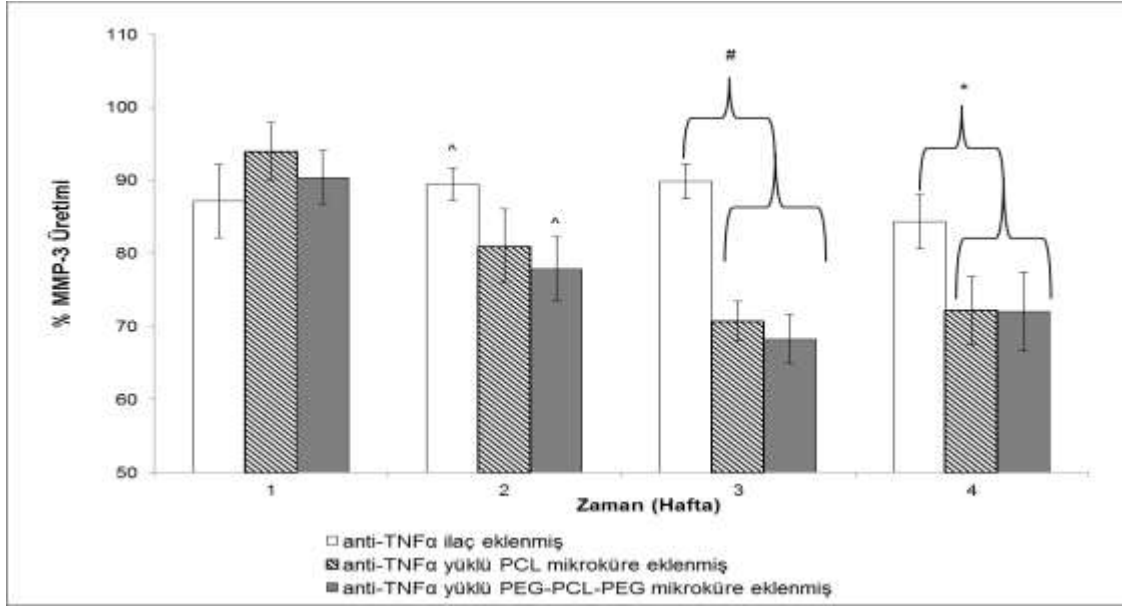
25 mg/ml anti-TNF α yüklü PCL ve PEG-PCL-PEG mikroküreler ve serbest anti-TNF α ile etkileştirilmiş sinoviyal fibroblast hücrelerden ortama salgılanan IFN- γ miktarları ile negatif kontrol grubundaki hücrelerden ortama salgılanan IFN- γ miktarları karşılaştırılarak Şekil 80'de zamana bağlı %IFN- γ üretim değerleri verilmiştir. Sadece, 4. haftada anti-TNF α yüklü PCL ve PEG-PCL-PEG mikrokürlerle etkileştirilen RA sinoviyal fibroblast hücrelerden ortama çıkan IFN- γ miktarları ile serbest anti-TNF α ile etkileştirilen hücrelerden ortama çıkan IFN- γ miktarları arasında belirgin bir fark gözlemlenmiştir ($p \leq 0.05$).



Şekil 80. 25 mg/ml anti-TNFα yüklü PCL ve PEG-PCL-PEG mikroküreler ve serbest anti-TNFα ile etkileştirilmiş sinoviyal fibroblast hücrelerin negatif kontrol grubuna göre % IFN-γ üretimi

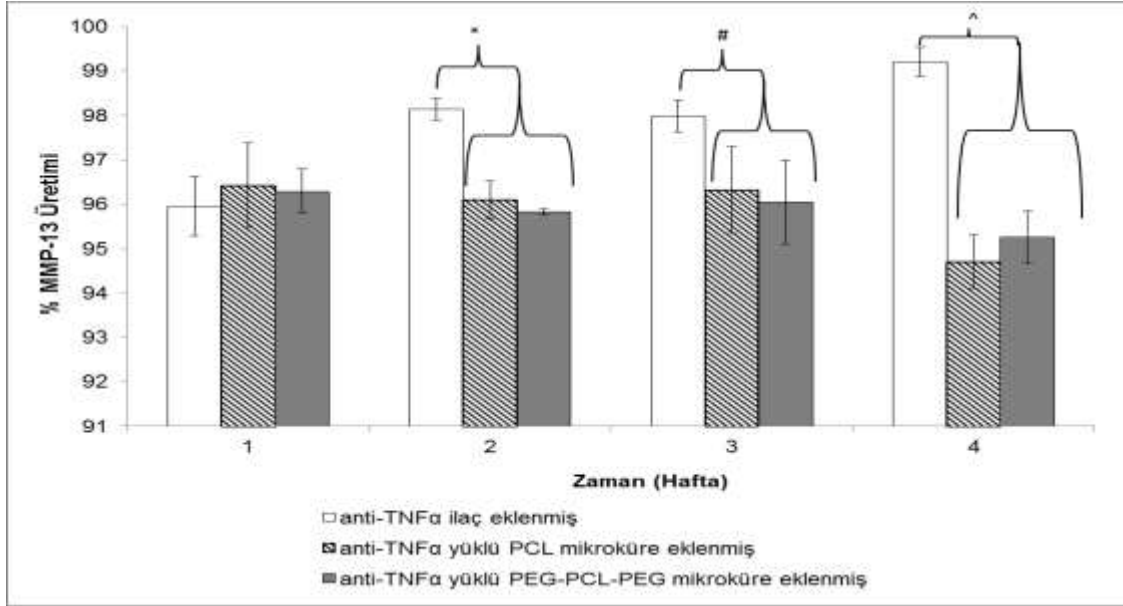
Serbest anti-TNFα ilaç ve 25 mg/ml anti-TNFα yüklü PCL ve PEG-PCL-PEG mikroküreler ile etkileştirilen sinoviyal fibroblast hücrelerden ortama salgılanan MMP-3 miktarları negatif kontrol grubundaki hücrelerden ortama salgılanan MMP-3 miktarlarına ornanarak zamana bağlı %MMP-3 üretim değerleri bulunmuştur (Şekil 74). 2. Haftada, anti-TNFα yüklü PEG-PCL-PEG mikrokürlerle etkileştirilen RA sinoviyal fibroblast hücrelerden ortama çıkan MMP-3 miktarları serbest anti-TNFα ile etkileştirilen hücrelerden ortama çıkan MMP-3 miktarlarına göre belirgin olarak düşük bulunmuştur ($p \leq 0.05$). 3. ve 4. haftalarda, serbest anti-TNFα ile etkileştirilen hücrelerden ortama çıkan MMP-3 miktarları anti-TNFα yüklü PCL ve PEG-PCL-PEG mikrokürlerle etkileştirilen RA sinoviyal fibroblast hücrelerden ortama çıkan MMP-3 miktarlarına göre belirgin olarak yüksek bulunmuştur ($p \leq 0.05$). 3. haftadan sonra, PCL ve PEG-PCL-PEG mikrokürelerle etkileştirilen sinoviyal fibroblast hücrelerden ortama salgılanan MMP-3 miktarlarında %30'a yakın bir düşme gözlemlenmiştir. Fakat, serbest anti-TNFα ile etkileştirilen hücrelerden ortama çıkan MMP-3 miktarlarında sadece %10 civarında bir düşme görülmüştür. MMP-3, sinoviyumdaki fibroblastlar tarafından üretilen bir enzimdir (KONTTINEN, 1999) ve hücre dışı matriks bileşenlerinin (extracellular matrix substrates) yıkımında rol oynamaktadır (OGATA, 1992, KNAUPER, 1996, JACKSON, 2001). MMP-3, proteoglikan ve fibronektin gibi kıkırdak matriks bileşenlerine karşı etkindir ve pro-MMPleri aktive etmektedir

(NAGASE, 1997). TNF- α , fibroblast ve kıkırdak hücreleri tarafından MMP üretimini etkilemektedir (CHOY, 2001).



Şekil 81. 25 mg/ml anti-TNF α yüklü PCL ve PEG-PCL-PEG mikroküreler ve serbest anti-TNF α ile etkileştirilmiş sinoviyal fibroblast hücrelerin negatif kontrol grubuna göre %MMP-3 üretimi

25 mg/ml anti-TNF α yüklü PCL ve PEG-PCL-PEG mikroküreler ve serbest anti-TNF α ile etkileştirilmiş sinoviyal fibroblast hücrelerden ortama salgılanan MMP-13 miktarları ile negatif kontrol grubundaki hücrelerden ortama salgılanan MMP-13 miktarları karşılaştırılarak Şekil 82'de zamana bağlı %MMP-13 üretim değerleri verilmiştir. 2. haftadan itibaren, anti-TNF α yüklü PCL ve PEG-PCL-PEG mikrokürlerle etkileştirilen RA sinoviyal fibroblast hücrelerden ortama çıkan MMP-13 miktarları serbest anti-TNF α ile etkileştirilen hücrelerden ortama çıkan MMP-3 miktarlarına göre belirgin olarak düşük bulunmuştur ($p \leq 0.05$). Fakat, 28 gün boyunca tüm gruplardan ortama salgılanan MMP-13 miktarlarında sadece %5 civarında bir düşüş gözlemlenmiştir.



Şekil 82. 25 mg/ml anti-TNF α yüklü PCL ve PEG-PCL-PEG mikroküreler ve serbest anti-TNF α ile etkileştirilmiş sinoviyal fibroblast hücrelerin negatif kontrol grubuna göre %MMP-13 üretimi

4.2.1.3. Anti-TNF α Yüklü PCL veya PEG-PCL-PEG Mikroküreler ile Etkileştirilen Sinovisit Hücrelerin Gen İfadelerindeki Değişimlerin PCR Yöntemi ile İncelenmesi

25 mg/ml anti-TNF α yüklü PCL ve PEG-PCL-PEG mikrokürelerin RA tedavi potansiyelinin incelenmesi için 1, 2, 3 ve 4 haftalık inkubasyonlar sonunda serbest ilaç ve mikroküre ilaç taşıma sistemleri ile etkileştirilen ve tedavi görmemiş (negatif kontrol) RA'li sinovisit hücrelerin TNF- α , IL-6, MMP-3 ve MMP-13 gen ifadelerindeki değişimler PCR yöntemi ile incelenmiştir. Gen ifadelerinin incelendiği bu analizler çift-kör (double-blinded) çalışmada gerçekleştirilmiştir ve bütün gen ifadelerinde 5 hasta çalışılmıştır. Hastalar için çalışmada kullanılan kodlar ve hastaların genel bilgileri Tablo 33'de verilmiştir. Yapılan tüm gen ifade çalışmalarına bakıldığında farklı hastalara ait sinoviyal fibroblast hücrelerin gen ifade değerleri arasında büyük bir varyasyon olduğu görülmüştür. Bu yüzden, her hastaya ait serbest ilaç ve mikroküre ile etkileştirilen sinoviyal fibroblast hücrelerinin gen ifade değerleri o haftadaki kendisine ait tedavi görmemiş sinoviyal fibroblast hücrelerinin gen ifade değerleri ile normalize edilmiştir. Ayrıca, hastaların klinik bulguları incelendiğinde hastaların iki gruba ayrıldığı görülmüştür. 1. ve 4. hastaların (H ve S) C-reaktif protein (CRP) değerinin düşük olduğu

gözlemlenmiştir ve inaktif hasta grubu olarak tanımlanmıştır. Diğer yüksek CRP değerlerine sahip hastalar ise (M, C ve Z kodlu hastalar) aktif hasta grubu olarak tanımlanmıştır. Aşama 4.2'de belirtildiği gibi CRP değerleri iltihap reaksiyonları sırasında artmaktadır. Bu nedenle, klinik olarak aktif RA'li hastalarda yüksek CRP değerleri görülmektedir. CRP seviyelerinin azalması da iltihabi reaksiyonun veya enfeksiyonun azalmaya başladığını göstermektedir. Fakat, bu hastaların diğer klinik bulguları yüksek olduğu ve hastalar Ek 3'de verilen hasta seçim kriterlerini sağladıkları için çalışmaya dahil edilmiştir. Ayrıca, hastaların gördükleri tedaviler sonucu dönemsel olarak CRP değerlerinde azalmalar veya artışlar olabilmektedir. Bu nedenle, yüksek CRP değerlerine sahip hasta bulmakta zorluk yaşandığı için de bu hastalar çalışmaya dahil edilmiştir.

Tablo 33. Çalışmada kullanılan sinoviyal fibroblast hücrelerin izolasyonunun yapıldığı sinoviyal membranların alındığı hastaların genel bilgileri ve hasta kodları

Hasta No	Hasta Kodu	CRP (mg/L)	Sedimentasyon (mm/sa)	Romatoid Faktör
1	H	<0.33	29	ölçülmemiş
2	M	2.6	56	36.20
3	C	3.72	37	9.69
4	S	<0.33	28	379
5	Z	1.92	45	ölçülmemiş

Gen ifade çalışmalarında göreceli gen ifadesinin doğru şekilde ortaya konabilmesi için ilgilenilen gene ait ifade değerlerinin bu dokuda çeşitli patolojik şartlarla ifade miktarının değişmediği öngörülen (bilinen) bir referans genin ifadesine normalize edilmesi gereklidir. Bu amaçla bu çalışmada beta aktin gen ifadesi kullanılmıştır. Çalışmada kullanılan TNF- α , IL-6, MMP-3 ve MMP-13'e özgü gen ifadesi verileri, beta aktin gen ifadesi verilerine normalize edilmiştir. Ayrıca, serbest ilaç ve mikroküre ile etkileştirilmiş hücrelerden elde edilen gen ifadesi verilerinin tedavi görmemiş hücre gen ifadesine de normalizasyonu amaçlanmıştır. Böylece, verilerin "kat artışı veya azalışı" şeklinde göreceli gen ifadesine dönüşümü sağlanmıştır.

İlk olarak, hastalık sırasındaki iltihabın devam etmesi ve doku hasarının oluşmasına neden olan proinflamatuvar sitokinlerin en önemlilerinden biri olan TNF- α gen ifadesi incelenmiştir. RA'li hücrelerden elde edilen cDNA örnekleri ile beta aktin gen ifadesi karşılaştırıldığında β -actin mRNA'sı çok yüksek kalitede amplifiye olurken, TNF- α ifadesine ait amplifikasyon değerleri düşük çıkmıştır. Ayrıca, çalışmada TNF- α ifadesine ait amplifikasyon değerleri düşük çıktığı için, yöntemin çalışma prosedürünün işlerliğini görmek için uyarılmış monosit hücreleri de pozitif kontrol olarak kullanılmıştır. Bu hücrelerin mRNA'sı yüksek derecede amplifiye olurken RA'li hücrelerden elde edilen mRNA'leri düşük derecede amplifiye olmuştur. Bu nedenle, her hasta için her zaman noktasında TNF- α gen ifadesi değerlerindeki değişimler ölçülebilir şiddetine göre göreceli olarak karşılaştırılmıştır (Tablo 34). Bu karşılaştırmada, kullanılan derecelendirme şu şekildedir:

0 ölçülemedi

+ artış

++ belirgin artış

Tablo 34. Her hasta için her zaman noktasında TNF- α gen ifadesi değerlerindeki değişimler

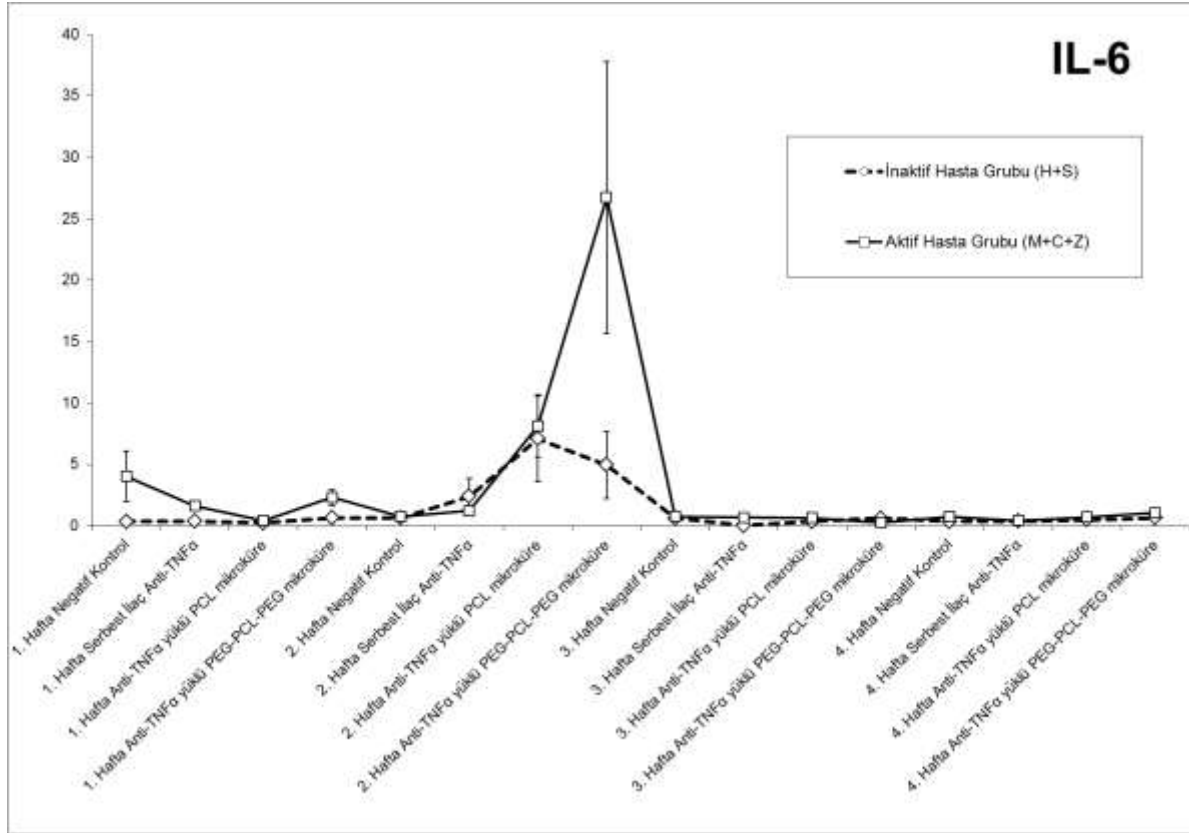
	TNF- α gen ifadesi				
	H	M	C	S	Z
Sıfıncı Gün	0	0	0	++	0
1. Hafta					
Negatif Kontrol	0	0	0	0	0
Serbest anti-TNF α ilaç+ RA'lı sinoviyal fibroblast hücre	0	++	+	0	0
Anti-TNF α yüklü PCL mikoküre + RA'lı sinoviyal fibroblast hücre	+	0	++	0	+
Anti-TNF α yüklü PEG-PCL-PEG mikoküre + RA'lı sinoviyal fibroblast hücre	0	++	+	+	++
2. Hafta					
Negatif Kontrol	++	++	+	0	++
Serbest anti-TNF α ilaç+ RA'lı sinoviyal fibroblast hücre	yok	+	++	+	0
Anti-TNF α yüklü PCL mikoküre + RA'lı sinoviyal fibroblast hücre	0	0	+	++	++
Anti-TNF α yüklü PEG-PCL-PEG mikoküre + RA'lı sinoviyal fibroblast hücre	+	+	++	++	++
3. Hafta					
Negatif Kontrol	0	+	++	+	+
Serbest anti-TNF α ilaç+ RA'lı sinoviyal fibroblast hücre	yok	0	0	0	++
Anti-TNF α yüklü PCL mikoküre + RA'lı sinoviyal fibroblast hücre	0	0	0	0	+
Anti-TNF α yüklü PEG-PCL-PEG mikoküre + RA'lı sinoviyal fibroblast hücre	0	+	0	0	0
4. Hafta					
Negatif Kontrol	0	0	0	+	+
Serbest anti-TNF α ilaç+ RA'lı sinoviyal fibroblast hücre	yok	0	0	+	+
Anti-TNF α yüklü PCL mikoküre + RA'lı sinoviyal fibroblast hücre	0	+	0	0	+
Anti-TNF α yüklü PEG-PCL-PEG mikoküre + RA'lı sinoviyal fibroblast hücre	0	0	0	++	0

Tablo 34'de verilen sonuçlara bakıldığında, TNF- α 'ya özgü gen ifadesinin değerlerinin dönemsel olarak yükselip azaldığı bazen de ölçülemediği görülmüştür. Fakat, Şekil 71'de verilen Wehi-164 hücre hattı ile ölçülen fizyolojik olarak aktif TNF- α düzeylerine bakıldığında mikrokürelerle etkileştirilen TNF- α düzeyleri 2. haftadan itibaren düşme eğilimi gösterirken serbest ilaç ile etkileştirilen sinoviyal fibroblast hücrelerden ortama çıkan TNF- α miktarları sabit kalmış hatta 3. haftada TNF- α miktarında bir artış gözlemlenmiştir. Ayrıca, TNF- α 'ya özgü ELİZA testi ile yapılan ve sonucu Şekil 70'de verilen toplam TNF- α miktarlarında 1 ay boyunca belirgin bir değişim gözlemlenmemiştir. Bu nedenle, TNF- α 'ya özgü gen ifadesinin zamana bağlı değişiklik gösterdiği düşünülmektedir. Literatüre bakıldığında, anti-TNF- α ilaçların farklı hücreler üzerindeki etkisini incelemek için yapılan in vitro çalışmalar genellikle 24-72 saat aralığında çalışılmış ve bu çalışmalarda ELİZA test sonuçları kullanılmıştır (HOSAKA, 2005, GRATTENDICK, 2008). Ayrıca, farklı ajanların RA'li sinoviyal fibroblast veya makrofajlara ait gen ifadelerinin üzerindeki etkilerinin incelendiği çalışmalarda yine 24-72 saat aralığında çalışılmış ve IL-6, MMP-3, MMP-1 gibi diğer proinflamatuvar sitokinlerin gen ifadeleri incelenmiştir (JEONG, 2004, BONDESON, 2006). Bu projede yapılan in vitro çalışma ise literatürdeki kısa süreçli in vitro çalışmaların aksine 1 aylık uzun süreçli bir çalışmadır. In vitro deney koşulları in vivo ortam koşullardan farklı olduğu için ve deney süresi uzun olduğu için hücrelerin davranışlarında değişimler olduğu ve bu yüzden salgılanan TNF- α 'ya ait gen ifadelerinin değerlerinin uzun süreli bu çalışmada düşük ölçüldüğü düşünülmektedir.

25 mg/ml anti-TNF α yüklü PCL ve PEG-PCL-PEG mikrokürelerin RA tedavi potansiyelinin incelenmesi için 1, 2, 3 ve 4 haftalık inkubasyonlar sonunda serbest ilaç ve mikroküre ilaç taşıma sistemleri ile etkileştirilen ve tedavi görmemiş (negatif kontrol) RA'li sinovisit hücrelerin IL-6, MMP-3 ve MMP-13 gen ifadelerindeki değişimler de PCR yöntemi ile incelenmiştir. Farklı zamanlardaki serbest ilaç ve mikrokürelerle etkileştirilmiş RA'li sinoviyal fibroblast hücrelere ve negatif kontrol grubuna ait IL-6, MMP-3 ve MMP-13 gen ifadelerinin her hasta için gözlenen düzeyleri bir araya getirilerek her grup için ortalama bir değer oluşturularak sırasıyla Şekiller 76-78'de bu değerler karşılaştırılmıştır.

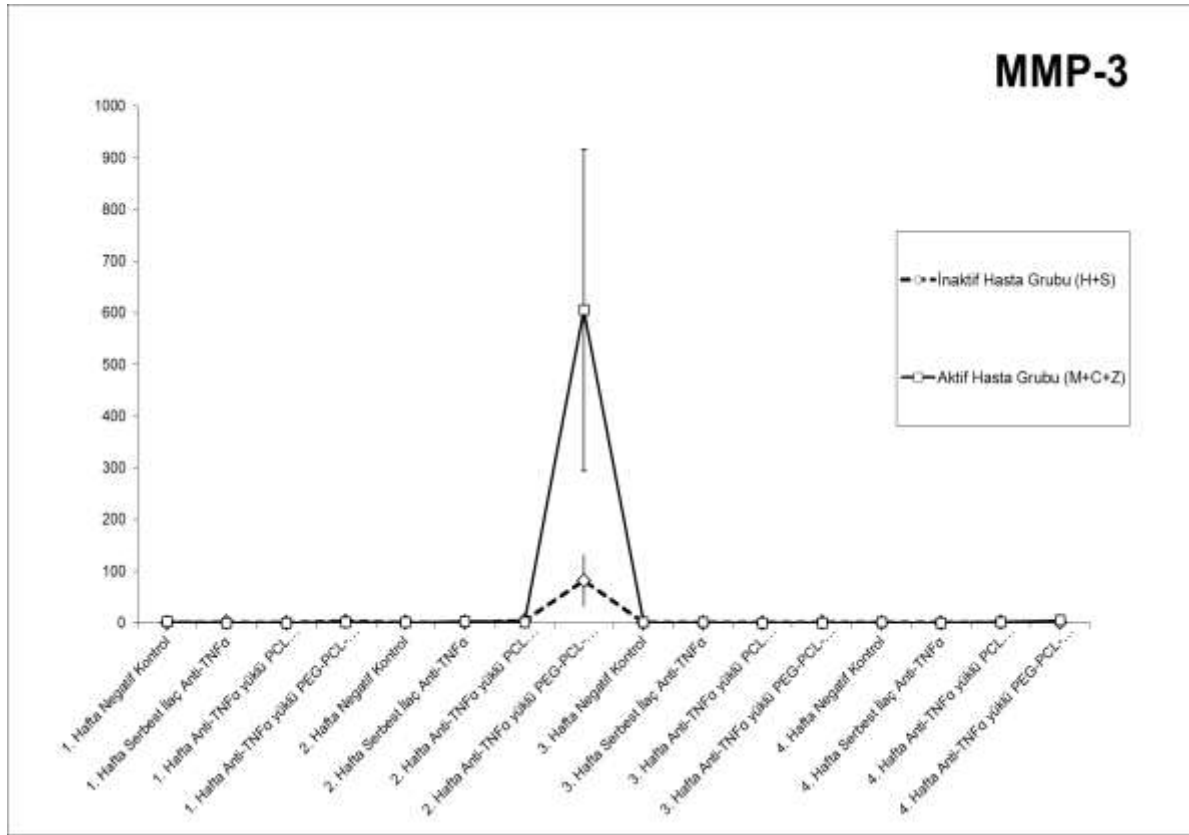
Şekil 83'e bakıldığında, birinci haftada aktif hasta grubunda serbest ilaç ve mikroküre ile etkileştirilen sinovisit hücre grubuna ait IL-6'ya özgü gen ifadesi düzeyleri negatif gruba oranla düşerken inaktif hasta grubunda gruplar arasında belirgin bir fark gözlemlenmemiştir. 2. haftaya ait sonuçlara bakıldığında ise, aktif ve inaktif hasta gruplarının ikisinde de anti-TNF- α yüklü PCL ve PEG-PCL-PEG mikroküre eklenmiş sinovisit hücre grubuna ait IL-6'ya özgü gen ifadesinde bir artış görülmüştür. Özellikle aktif hasta grubunda anti-TNF- α yüklü PEG-PCL-PEG

mikrokürelere etkileştirilen hücelere ait IL-6 gen ifadesi düzeyleri belirgin olarak artmıştır. Fakat, 3. ve 4. haftalarda tüm gruplarda IL-6 gen ifadesi düzeyleri düşmüş ve gruplar arası bir farklılık gözlemlenmemiştir. 2. haftada mikroküre grupları ile etkileştirilen sinoviyal fibroblast hücre gruplarına ait IL-6 gen ifadelerinde artış gözlemlenirken Bölüm 4.2.1.2 Şekil 72'de verilen medyum ortamına salınan IL-6 düzeylerine bakıldığında 2. haftada mikrokürelere etkileştirilen hücelere ait IL-6 düzeylerinde %25-30 civarında düşmeler gözlemlenmiştir.



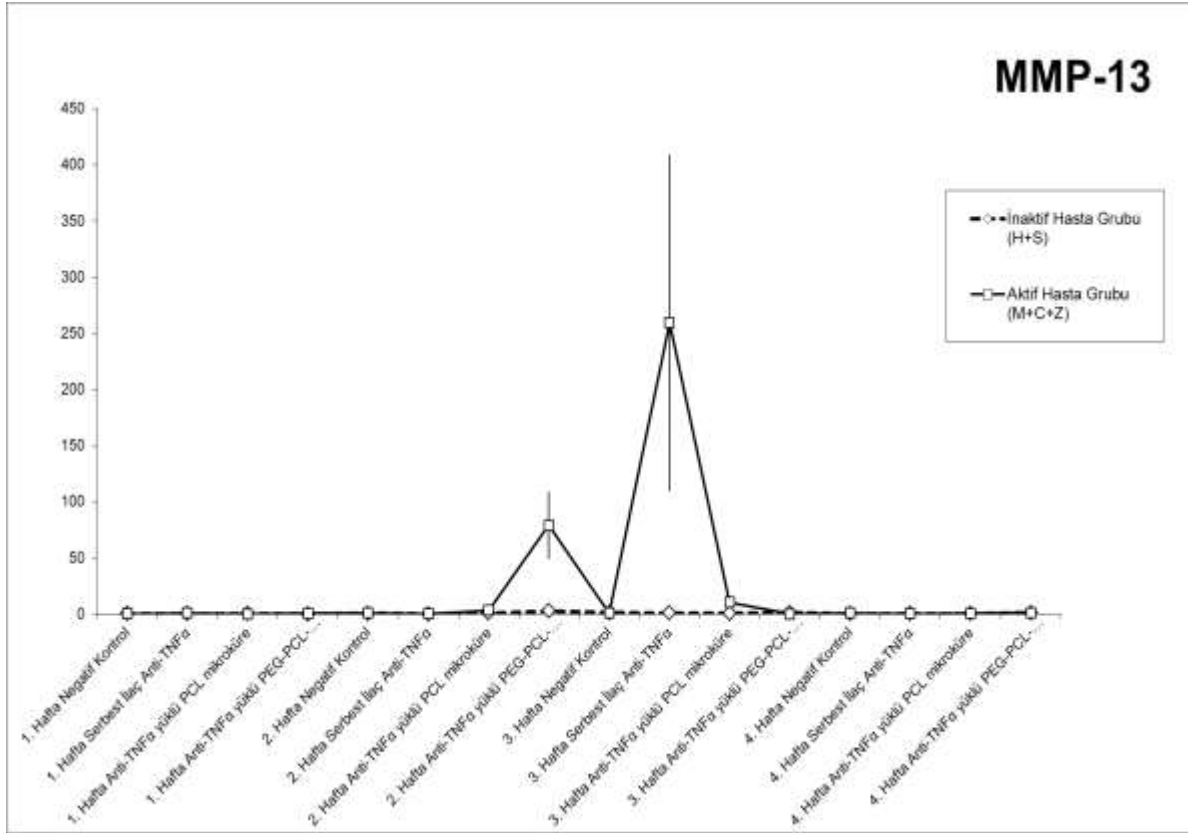
Şekil 83. Serbest ilaç ve PCL ve PEG-PCL-PEG mikrokürelere etkileştirilen RA'li sinoviyal fibroblast hücelere ve tedavi görmemiş RA'li sinoviyal fibroblast hücelere (negatif kontrol) zamana bağlı IL-6'ya özgü gen ifadelerindeki değişim

Farklı zamanlardaki serbest ilaç ve mikrokürelerle etkileştirilmiş RA'li sinoviyal fibroblast hücrelere ve negatif kontrol grubuna ait MMP-3 gen ifadelerinin düzeyleri incelendiğinde (Şekil 84), 2. haftada, diğer gruplara ait MMP-3 gen düzeylerinde bir değişim olmazken anti-TNF- α yüklü PEG-PCL-PEG mikrokürelerle etkileştirilen hücrelere ait MMP-3 gen ifadesi düzeylerinde belirgin bir artış görülmüştür. Fakat, daha sonraki haftalarda yine tüm gruplarda MMP-3 gen ifadesi düzeyleri arası bir farklılık gözlemlenmemiştir. PEG-PCL-PEG mikrokürelerle etkileştirilen hücrelere ait MMP-3 gen ifadesi düzeyleri belirgin olarak bir artışın mikrokürelerin yapısında olan PEG segmentinin zamanla çözeltiye geçmesi sonucu hücrelerin etkilenmesinden dolayı kaynaklanabileceği düşünülmektedir. Fakat, Bölüm 4.2.1.2'de verilen Şekil 74'de görüldüğü gibi PEG-PCL-PEG mikroküreler deney boyunca hücrelerde herhangi bir toksik etkiye neden olmadığı gözlemlenmiştir.



Şekil 84. Serbest ilaç ve PCL ve PEG-PCL-PEG mikrokürelerle etkileştirilen RA'li sinoviyal fibroblast hücreler ve tedavi görmemiş RA'li sinoviyal fibroblast hücrelerin (negatif kontrol) zamana bağlı MMP-3'e özgü gen ifadelerindeki değişim

Şekil 85'de verilen MMP-13 gen ifadesi düzeylerine ait sonuçlar incelendiğinde, anti-TNF- α yüklü PCL mikrokürelerle etkileştirilen sinovisit hücelere ait MMP-13 gen ifadesi düzeylerinde tüm zamanlarda bir değişiklik gözlemlenmemiştir. Fakat, anti-TNF α yüklü PCL mikrokürelerle etkileştirilen sinovisit hücelere ait MMP-13 gen ifadesi düzeylerinde 2. haftada belirgin bir artış görülmüştür. Ayrıca, serbest ilaç eklenen sinovisit hücelere ait MMP-13 gen ifadesi düzeylerinde de 3. haftada belirgin bir artış oluşmuştur.



Şekil 85. Serbest ilaç ve PCL ve PEG-PCL-PEG mikrokürelerle etkileştirilen RA'li sinoviyal fibroblast hücelere ve tedavi görmemiş RA'li sinoviyal fibroblast hücelere (negatif kontrol) zamana bağlı MMP-13'e özgü gen ifadelerindeki değişim

Sonuç ve Öneriler

Bu çalışmada, intraartiküler uygulanabilecek ve 3 aydan daha uzun anti-TNF α salımını sağlayacak polikaprolakton (PCL) ve pegile-polikaprolakton (PEG-PCL-PEG) mikroküreler hazırlanarak romatoid artirit tedavi potansiyeli araştırılmıştır. Romatoid artirit tedavisinde kullanılan anti-TNF α ilaçlar, TNF α ve diğer proinflamatuvar sitokinlerin üretimini belirgin olarak düşürdüğünden, iltihaba karşı tedavide kapsamlı etki göstermektedirler. Fakat, uzun süreli ilaç kullanımı ve toksik etkiler yüzünden anti-TNF α ilaç tedavisinde bazı kısıtlamalarla karşılaşmaktadır. Geliştirilen polimerik anti-TNF α salım sistemi ile RA tedavisinde olumlu sonuçlar verebilecek yeni bir tedavi yaklaşım getirilmesi hedeflenmiştir.

Projede, kullanılan PEG-PCL-PEG mikrokürelerin hazırlandığı PEG-PCL-PEG triblok kopolimeri PEG-PCL diblok kopolimerlerinden bağlayıcı ajan isoforone diisosiyanat kullanılarak sentezlenmiştir. Sentezlenen bu kopolimerin karakterizasyon testleri ile PEG-PCL-PEG triblok kopolimer oluşumu doğrulanmıştır. Anti-TNF α yüklü mikrokürelerin hazırlanma koşullarının belirlenmesi için model protein Immunoglobulin G (IgG) kullanılmıştır. Hazırlanan IgG yüklü PCL ve PEG-PCL-PEG mikrokürelerin protein yükleme verimliliği sırasıyla %54.00 \pm 1.32 ve %74.32 \pm 3.45 bulunmuştur. Literatürle karşılaştırıldığında hazırlanan mikrokürelerin protein yükleme verimlilikleri yüksektir. Ayrıca, hazırlanan mikrokürelerin boyutları 5-6 μ m aralığında bulunmuştur. Yapılan salım çalışmasında, üç ay sonunda salınan IgG miktarları incelendiğinde gama sterilizasyonu yapılmamış PCL ve PEG-PCL-PEG mikrokürelerde ortama çıkan proteinin %38 ve %54'ü biyoaktivitesini korurken gama sterilizasyonu yapılan PCL ve PEG-PCL-PEG mikrokürelerde ortama çıkan proteinin %36'sı ve %44'ü biyoaktivitesini korumaktadır. Ayrıca, PCL ve PEG-PCL-PEG mikrokürelere yüklenen IgG'nin üç boyutlu yapısının mikroküre hazırlama aşamalarından etkilenmediği FT-IR analizleri ile gösterilmiştir. Bozunma çalışmaları sonucunda, gama sterilizasyonu yapılmış PEG-PCL-PEG mikrokürelerin M_n ve M_w değerlerinde diğer gruplara oranla daha fazla bir düşüş olmuştur. Ayrıca, mikrokürelerin biyoyumluluğu 3T3 hücreleri ile test edilmiş ve uyumlu oldukları görülmüştür.

Model proteinle yapılan çalışmalar sonucunda anti-TNF α yüklü PCL ve PEG-PCL-PEG mikrokürelerin hazırlama koşulları belirlenmiştir. Hazırlanan anti-TNF α yüklü PCL ve PEG-PCL-PEG mikrokürelerin protein yükleme verimliliği parçacık boyut dağılımı ve ortalama parçacık büyüklüğü, yüzey morfolojisi ve farklı ortamlarda salım profilleri karşılaştırılmıştır. Anti-TNF α yüklü PCL ve PEG-PCL-PEG mikrokürelerin 5 μ m boyutunda ve yüksek protein yükleme verimliliğine (sırasıyla % 65.37 \pm 1.80 ve % 75.91 \pm 1.16) sahip olduğu gözlemlenmiştir. Ayrıca, her iki mikroküre grubunda da 3 ay boyunca biyolojik olarak aktif ilaç salımı olmuştur. PEG-PCL-

PEG mikrokürelerden farklı salım ortamlarında daha fazla anti-TNF α çıkmıştır.

Projenin son aşamasında, 25 mg/ml anti-TNF α yüklü PCL veya PEG-PCL-PEG mikrokürelerden 1 ay süreyle salınan anti-TNF α 'ın RA'li hasta kaynaklı sinoviyal fibroblast hücreler üzerindeki etkisi ve mikrokürelerden in vitro salım profilleri incelenmiştir. Hücre kültüründe RA'li hastalardan alınan sinoviyal membranlardan izole edilen sinoviyal fibroblast izolasyonu yapılmıştır. Mikrokürelerin RA tedavi potansiyelinin incelenmesi için oluşturulan deney gruplarında 1, 2, 3 ve 4 haftalık inkubasyonlar sonunda RA'li sinovisit hücreleri tarafından enflamasyon sırasında ortama salgılanan TNF- α , IL-6, IL-17, IFN- γ , MMP-3 ve MMP-13 düzeylerindeki değişimler incelenmiş ve tedavi görmemiş sinovisit hücreler (negatif kontrol grubu) ile karşılaştırılmıştır. PCL ve PEG-PCL-PEG mikrokürelerle etkileştirilen sinoviyal fibroblast hücrelerden ortama çıkan fizyolojik olarak aktif TNF- α miktarlarında %35 civarında düşüş gözlemlenirken serbest anti-TNF α ile etkileştirilmiş sinoviyal fibroblast hücrelerden ortama salgılanan fizyolojik olarak aktif TNF- α miktarlarında %10-15 aralığında bir düşüş gözlemlenmiştir. Benzer şekilde, başta MMP-3 ve IL-6 olmak üzere diğer sitokin değerlerinde de 2. haftadan itibaren PCL ve PEG-PCL-PEG mikrokürelerle etkileştirilen sinoviyal fibroblast hücrelerin sitokin değerlerinde düşüş gözlemlenmiştir. Wehi-164 hücre hattı ile ölçülen fizyolojik olarak aktif TNF- α düzeylerine bakıldığında mikrokürelerle etkileştirilen TNF- α düzeyleri 2. haftadan itibaren düşme eğilimi gösterirken serbest ilaç ile etkileştirilen sinoviyal fibroblast hücrelerden ortama çıkan TNF- α miktarları sabit kalmış hatta 3. haftada TNF- α miktarında bir artış gözlemlenmiştir. Ayrıca, TNF- α 'ya özgü ELİZA testi ile ölçülen toplam TNF- α miktarlarında 1 ay boyunca belirgin bir değişim gözlemlenmezken TNF- α 'ya özgü gen ifadesinin değerlerinin dönemsel olarak yükselip azaldığı bazen de ölçümediği görülmüştür. In vitro deney koşulları in vivo ortam koşullardan farklı olduğu için ve deney süresi uzun olduğu için hücrelerin davranışlarında değişimler olduğu ve bu yüzden salgılanan TNF- α 'ya ait gen ifadelerinin değerlerinin uzun süreli yapılan bu çalışmada düşük ölçüldüğü düşünülmektedir.

Mikrokürelerle etkileştirilen hücrelerin MMP-3 ve IL-6 gen ifadelerinde 2. haftada, serbest ilaçla etkileştirilen hücrelerin MMP-13 gen ifadesinde 3. haftada en belirgin artış gözlemlenmiştir. Diğer haftalarda belirgin bir değişiklik gözlemlenmemiştir. Hazırlanan PCL ve PEG-PCL-PEG mikroküre sistemlerinin ortamdaki sitokin miktarlarını düşürürken gen ifadelerinde artışın görülmesinin çalışmanın in vitro ortamda yapılmasından kaynaklandığı düşünülmektedir. In vitro deney koşulları in vivo ortam koşullardan farklı olduğu için ve deney süresi uzun olduğu için hücrelerin davranışlarında değişimler olduğu ve bu yüzden gen ifade değerlerinde artış görüldüğü düşünülmektedir. Bu nedenle, PCL ve PEG-PCL-PEG mikroküre sistemlerinin tedavi

etkinliğinin oluşturulacak in vivo bir modelde incelenmesi mikrokürelerin etkinliği hakkında daha kapsamlı bir bilgi sağlayacaktır. Bunun yanında, in vitro ve in vivo deneylerle anti-TNF α yüklü PCL ve PEG-PCL-PEG mikrokürelerin farklı miktarları kullanılarak hazırlanan mikroküre sistemelerinin tedavi etkinliğinin maksimum olduğu mikroküre miktarları belirlenerek daha etkin bir tedavi yaklaşımı oluşturulabilir.

Referanslar

- Enbrel® (etanercept) US Prescribing Information, manufactured by Immunex Corporation, marketed by Amgen and Wyeth Pharmaceuticals.
- ABRAMSON S.B., Yazici Y., Biologics in development for rheumatoid arthritis: relevance to osteoarthritis, *Adv Drug Deliv Rev*, 58, 212-225, (2006).
- AHMAD H., Tauer K., Preparation of monodisperse micron-sized PEG-coated polymer particles utilizing different methods, *Prog Colloid Polym Sci*, 24, 107-111, (2004).
- AHMED S.A., Gogal Jr R.M., Walsh J.E., A new rapid and simple non-radioactive assay to monitor and determine the proliferation of lymphocytes: an alternative to [3H]thymidine incorporation assay. , *J Immunol Methol*, 170, (1994).
- ALEXIS F., Pridgen E., Molnar L.K., Farokhzad O.C., Factors affecting the clearance and biodistribution of polymeric nanoparticles, *Mol Pharm*, 5, 505-515, (2008).
- ALY M.N., Intra-articular drug delivery: a fast growing approach, *Recent Pat Drug Deliv Formul*, 2, 231-237, (2008).
- AREND W.P., Physiology of cytokine pathways in rheumatoid arthritis, *Arthritis Rheum*, 45, 101-106, (2001).
- BAIMARK Y., Preparation of organic solvent/surfactant-free microspheres of methoxy poly (ethylene glycol)-b-Poly (ϵ -caprolactone) by a melt dispersion method, *Asian J Appl Sci*, 2, 341-347, (2009).
- BECKHAM J.C., Caldwell D.S., Peterson B.L., Pippen A.M., Currie M.S., Keefe F.J., Weinberg J.B., Disease severity in rheumatoid arthritis: relationships of plasma tumor necrosis factor-alpha, soluble interleukin 2-receptor, soluble CD4/CD8 ratio, neopterin, and fibrin D-dimer to traditional severity and functional measures, *J Clin Immunol*, 12, 353-361, (1992).
- BEHRAVESH E., Shung A.K., Jo S., Mikos A.G., Synthesis and characterization of triblock copolymers of methoxy poly(ethylene glycol) and poly(propylene fumarate), *Biomacromolecules*, 3, 153-158, (2002).
- BLIDDAL H., Terslev L., Qvistgaard E., Konig M., Holm C.C., Rogind H., Boesen M., Danneskiold-Samsøe B., Torp-Pedersen S., A randomized, controlled study of a single intra-articular injection of etanercept or glucocorticosteroids in patients with rheumatoid arthritis, *Scand J Rheumatol*, 35, 341-345, (2006a).
- BLIDDAL H., Terslev L., Qvistgaard E., Recke P., Holm C.C., Danneskiold-Samsøe B., Savnik A., Torp-Pedersen S., Safety of intra-articular injection of etanercept in small-joint arthritis: an uncontrolled, pilot-study with independent imaging assessment, *Joint Bone Spine*, 73, 714-717, (2006b).
- BOESEN M., Boesen L., Jensen K.E., Cimmino M.A., Torp-Pedersen S., Terslev L., Koenig M., Danneskiold-Samsøe B., Rogind H., Bliddal H., Clinical outcome and imaging changes after intraarticular (IA) application of etanercept or methylprednisolone in rheumatoid arthritis: magnetic

- resonance imaging and ultrasound-Doppler show no effect of IA injections in the wrist after 4 weeks, *J Rheumatol*, 35, 584-591, (2008).
- BOGDANOV B., Vidts A., Van Den Bulcke A., Verbeeck R., Schacht E., Synthesis and thermal properties of poly(ethylene glycol)-poly(ϵ -caprolactone) copolymers, *Polymer*, 39, 1631-1636, (1998).
- BONDESON J., Wainwright S.D., Lauder S., Amos N., Hughes C.E., The role of synovial macrophages and macrophage-produced cytokines in driving aggrecanases, matrix metalloproteinases, and other destructive and inflammatory responses in osteoarthritis, *Arthritis Res Ther*, 8, R187, (2006).
- BOOTS A.M., Wimmers-Bertens A.J., Rijnders A.W., Antigen-presenting capacity of rheumatoid synovial fibroblasts, *Immunology*, 82, 268-274, (1994).
- BRENNAN F., Beech J., Update on cytokines in rheumatoid arthritis, *Curr Opin Rheumatol*, 19, 296-301, (2007).
- BRENNAN F.M., McInnes I.B., Evidence that cytokines play a role in rheumatoid arthritis, *J Clin Invest*, 118, 3537-3545, (2008).
- BROWNSTEIN A., The Chemistry of Polyethylene Glycol, Proceedings of the ICOM Waterlogged Wood Working Group Conference, (1981) Ottawa.
- CALIS S., Bozdag S., Kas H.S., Tuncay M., Hincal A.A., Influence of irradiation sterilization on poly(lactide-co-glycolide) microspheres containing anti-inflammatory drugs, *Farmaco*, 57, 55-62, (2002).
- CAPAN Y., Jiang G., Giovagnoli S., Na K.H., Deluca P.P., Preparation and characterization of poly(D,L-lactide-co-glycolide) microspheres for controlled release of human growth hormone, *AAPS Pharm Sci Tech* 86, 676, (2003).
- CARPENEDO R.L., Seaman S.A., Mcdevitt T.C., Microsphere size effects on embryoid body incorporation and embryonic stem cell differentiation, *J Biomed Mater Res A*, 94, 466-475, (2010).
- CARRASCOSA C., Espejo L., Torrado S., Torrado J.J., Effect of gamma-sterilization process on PLGA microspheres loaded with insulin-like growth factor-I (IGF-I), *J Biomater Appl*, 18, 95-108, (2003).
- CASTELLANOS I.J., Flores G., Griebenow K., Effect of the molecular weight of poly(ethylene glycol) used as emulsifier on alpha-chymotrypsin stability upon encapsulation in PLGA microspheres, *J Pharm Pharmacol*, 57, 1261-1269, (2005).
- CHATZIGIANNIS I., Kakavouli G., Sakellariou G., Vezyridis C., Voudouris K., Intra-articular injection of infliximab in resistant inflamed joints of rheumatoid arthritis and spondyloarthropathies, *Annals of the Rheumatic Diseases*, 63, 418-419, (2004).
- CHEN F.M., Wu Z.F., Sun H.H., Wu H., Xin S.N., Wang Q.T., Dong G.Y., Ma Z.W., Huang S., Zhang Y.J., Jin Y., Release of bioactive BMP from dextran-derived microspheres: a novel delivery concept, *Int J Pharm*, 307, 23-32, (2006).
- CHEN X., Qian Z., Gou M., Chao G., Zhang Y., Gu Y., Huang M., Wang J., Pan Y., Wei Y., Chen J., Tu M., Acute oral toxicity evaluation of biodegradable and pH-sensitive hydrogel based on polycaprolactone, poly(ethylene glycol) and methylacrylic acid (MAA), *J Biomed Mater Res A*, 84, 589-597, (2008).

- CHIKANZA I.C., Kingsley G.,Panayi G.S., Peripheral blood and synovial fluid monocyte expression of interleukin 1 alpha and 1 beta during active rheumatoid arthritis, *J Rheumatol*, 22, 600-606, (1995).
- CHO K.Y., Lee K.S.,Park J.-K., Effect of graft copolymer composition on the compatibility of biodegradable PCL/PCL-g-PEG blend, *Polymer (Korea)*, 33, 248-253, (2009).
- CHOY E.H.,Panayi G.S., Cytokine pathways and joint inflammation in rheumatoid arthritis, *N Engl J Med*, 344, 907-916, (2001).
- CIARDELLI G., Chiono V., Vozzi G., Pracella M., Ahluwalia A., Barbani N., Cristallini C.,Giusti P., Blends of poly-(epsilon-caprolactone) and polysaccharides in tissue engineering applications, *Biomacromolecules*, 6, 1961-1976, (2005).
- CLOSE D.R., Matrix metalloproteinase inhibitors in rheumatic diseases, *Ann Rheum Dis*, 60 Suppl 3, iii62-67, (2001).
- COCCOLI V., Luciani A., Orsi S., Guarino V., Causa F.,Netti P.A., Engineering of poly(epsilon-caprolactone) microcarriers to modulate protein encapsulation capability and release kinetic, *J Mater Sci Mater Med*, 19, 1703-1711, (2008).
- COTTAM E., Hukins D.W., Lee K., Hewitt C.,Jenkins M.J., Effect of sterilisation by gamma irradiation on the ability of polycaprolactone (PCL) to act as a scaffold material, *Med Eng Phys*, 31, 221-226, (2009).
- CROTTS G., Sah H.,Park T.G., Adsorption determines in-vitro protein release rate from biodegradable microspheres: Quantitative analysis of surface area during degradation, *Journal of Controlled Release*, 47, 101-111, (1997).
- DAS G.S., Rao G.H., Wilson R.F.,Chandy T., Colchicine encapsulation within poly(ethylene glycol)-coated poly(lactic acid)/poly(epsilon-caprolactone) microspheres-controlled release studies, *Drug Deliv*, 7, 129-138, (2000).
- DECKER C., Radiation-Induced Oxidation of Solid Poly(Ethylene Oxide) .2. Mechanism, *Journal of Polymer Science Part a-Polymer Chemistry*, 15, 799-813, (1977).
- DESCHAMPS A.A., Grijpma D.W.,Feijen J., Poly(ethylene oxide)/poly(butylene terephthalate) segmented block copolymers: the effect of copolymer composition on physical properties and degradation behavior, *Polymer* 42, 9335-9345, (2001).
- DETERMAN A.S., Wilson J.H.,Kipper M.J., Protein stability in the presence of polymer degradation products: consequences for controlled release formulations, *Biomaterials*, 27, 3312-3320, (2006).
- DEVINENI D., Ezekwudo D.,Palaniappan R., Formulation of maltodextrin entrapped in polycaprolactone microparticles for protein and vaccine delivery: effect of size determining formulation process variables of microparticles on the hydrodynamic diameter of BSA, *J Microencapsul*, 24, 358-370, (2007).

- DIAB R., Hamoudeh M., Boyron O., Elaissari A., Fessi H., Microencapsulation of cytarabine using poly(ethylene glycol)-poly(epsilon-caprolactone) diblock copolymers as surfactant agents, *Drug Dev Ind Pharm*, 36, 456-469, (2010).
- DIAO Y.Y., Li H.Y., Fu Y.H., Han M., Hu Y.L., Jiang H.L., Tsutsumi Y., Wei Q.C., Chen D.W., Gao J.Q., Doxorubicin-loaded PEG-PCL copolymer micelles enhance cytotoxicity and intracellular accumulation of doxorubicin in adriamycin-resistant tumor cells, *Int J Nanomedicine*, 6, 1955-1962, (2011).
- DOAN T., Massarotti E., Rheumatoid arthritis: an overview of new and emerging therapies, *J Clin Pharmacol*, 45, 751-762, (2005).
- DOMB A.J., Kost J., Wiseman D., Polycaprolactone, Handbook of Biodegradable Polymers, Perrin D. E. and J. P. English, CRC Press Boca Raton, Florida, (1997). 63-78.
- DONG Y., Feng S.S., Methoxy poly(ethylene glycol)-poly(lactide) (MPEG-PLA) nanoparticles for controlled delivery of anticancer drugs, *Biomaterials*, 25, 2843-2849, (2004).
- DORATI R., Colonna C., Serra M., Genta I., Modena T., Pavanetto F., Perugini P., Conti B., gamma-Irradiation of PEGd, IPLA and PEG-PLGA multiblock copolymers. I. Effect of irradiation doses, *AAPS PharmSciTech*, 9, 718-725, (2008a).
- DORATI R., Colonna C., Tomasi C., Genta I., Modena T., Faucitano A., Buttafava A., Conti B., gamma-irradiation of PEGd, IPLA and PEG-PLGA multiblock copolymers: II. effect of oxygen and EPR investigation, *AAPS PharmSciTech*, 9, 1110-1118, (2008b).
- DÜZGÜN N., Romatizmal Hastalıkların Tanımı ve Sınıflandırılması, *T Klin J Immunol Rheumatol* 2, 3-5, (2002).
- ELZEİN T., Nasser-Eddine M., Delaite C., Bistac S., Dumas P., FTIR study of polycaprolactone chain organization at interfaces, *J Colloid Interface Sci*, 273, 381-387, (2004).
- EMAMI J., Hamishehkar H., Najafabadi A.R., Gilani K., Minaiyan M., Mahdavi H., Nokhodchi A., A novel approach to prepare insulin-loaded poly(lactic-co-glycolic acid) microcapsules and the protein stability study, *J Pharm Sci* 98, 1721-1731, (2009).
- EMERY P., Luqmani R., The Validity of Surrogate Markers in Rheumatic Disease, *British Journal of Rheumatology*, 32, 3-8, (1993).
- ERDEMLI O., Captug O., Bilgili H., Orhan D., Tezcaner A., Keskin D., In vitro and in vivo evaluation of the effects of demineralized bone matrix or calcium sulfate addition to polycaprolactone-bioglass composites, *J Mater Sci Mater Med*, 21, 295-308, (2010).
- FAN P.T., Leong K.H., The use of biological agents in the treatment of rheumatoid arthritis, *Ann Acad Med Singapore*, 36, 128-134, (2007).
- FELDMANN M., Brennan F.M., Maini R.N., Role of cytokines in rheumatoid arthritis, *Annu Rev Immunol*, 14, 397-440, (1996).

- FERNANDEZ-CARBALLIDO A., Herrero-Vanrell R., Molina-Martinez I.T., Pastoriza P., Sterilized ibuprofen-loaded poly(D,L-lactide-co-glycolide) microspheres for intra-articular administration: effect of gamma-irradiation and storage, *Journal of Microencapsulation*, 21, 653-665, (2004).
- FICKERT S., Fiedler J., Brenner R.E., Identification, quantification and isolation of mesenchymal progenitor cells from osteoarthritic synovium by fluorescence automated cell sorting, *OsteoArthritis and Cartilage*, 11, 790-800, (2003).
- FIELDS R.D., Lancaster M.V., Dual-attribute continuous monitoring of cell proliferation/cytotoxicity, *Am Biotechnol Lab* 11, 48-50, (1993).
- FINNE-WISTRAND A., Albertsson A.C., The Use Of Polymer Design In Resorbable Colloids, *Annu Rev Mater Res* 36, 369-395, (2006).
- FU S., Guo G., Gong C., Zeng S., Liang H., Luo F., Zhang X., Zhao X., Wei Y., Qian Z., Injectable biodegradable thermosensitive hydrogel composite for orthopedic tissue engineering. 1. Preparation and characterization of nanohydroxyapatite/poly(ethylene glycol)-poly(epsilon-caprolactone)-poly(ethylene glycol) hydrogel nanocomposites, *J Phys Chem B*, 113, 16518-16525, (2009).
- GHASSEMI A.H., Van Steenberg M.J., Talsma H., Van Nostrum C.F., Jiskoot W., Crommelin D.J.A., Hennink W.E., Preparation and characterization of protein loaded microspheres based on a hydroxylated aliphatic polyester, poly(lactic-co-hydroxymethyl glycolic acid), *J Cont Rel*, 138, 57-63, (2009).
- GIBAUD S., Jabir Al Awwadi N., Ducki C., Astier A., Poly(epsilon-caprolactone) and Eudragit microparticles containing fludrocortisone acetate, *Int J Pharm*, 269, 491-508, (2004).
- GITEAU A., Venier-Julienne M.C., Aubert-Pouessel A., Benoit J.P., How to achieve sustained and complete protein release from PLGA-based microparticles?, *International Journal of Pharmaceutics*, 350, 14-26, (2008).
- GONG C., Shi S., Dong P., Kan B., Gou M., Wang X., Li X., Luo F., Zhao X., Wei Y., Qian Z., Synthesis, Characterization, Degradation, and In Vitro Drug Release Behavior of Thermosensitive Hydrogel Based on PEG-PCL-PEG Block Copolymers, *Int J Pharm*, 365, 89-99, (2009).
- GONG C.Y., Qian Z.Y., Liu C.B., Huang M.J., Gu Y.C., Wen Y.J., Kan B., Wang K., Dai M., Li X.Y., Gou M.L., Tu M.J., Wei Y.Q., A thermosensitive hydrogel based on biodegradable amphiphilic poly(ethyleneglycol)-polycaprolactone-poly(ethyleneglycol) block copolymers, *Smart Mater Struct* 16, 927-933, (2007).
- GOU M., Dai M., Li X., Yang L., Huang M., Wang Y., Kan B., Lu Y., Wei Y., Qian Z., Preparation of mannan modified anionic PCL-PEG-PCL nanoparticles at one-step for bFGF antigen delivery to improve humoral immunity, *Colloids and Surfaces B-Biointerfaces*, 64, 135-139, (2008).
- GRATTENDICK K.J., Nakashima J.M., Feng L., Giri S.N., Margolin S.B., Effects of three anti-TNF-alpha drugs: etanercept, infliximab and pifenedone on release of TNF-alpha in medium and TNF-alpha associated with the cell in vitro, *Int Immunopharmacol*, 8, 679-687, (2008).

- GRAF R., Domb A., Quellec P., Blunk T., Muller R.H., Verbavatz J.M., Langer R., The Controlled Intravenous Delivery of Drugs Using Peg-Coated Sterically Stabilized Nanospheres, *Advanced Drug Delivery Reviews*, 16, 215-233, (1995).
- GRAF R., Minamitake Y., Peracchia M.T., Trubetskoy V., Torchilin V., Langer R., Biodegradable long-circulating polymeric nanospheres, *Science*, 263, 1600-1603, (1994).
- HA J.C., Kim S.Y., Lee Y.M., Poly(ethylene oxide)-poly(propylene oxide)-poly(ethylene oxide) (Pluronic)/poly(epsilon-caprolactone) (PCL) amphiphilic block copolymeric nanospheres. I. Preparation and characterization, *J Control Release*, 62, 381-392, (1999).
- HAO J., Yuan M., Deng X., Biodegradable and biocompatible nanocomposites of poly(epsilon-caprolactone) with hydroxyapatite nanocrystals: thermal and mechanical properties, *J Appl Polym Sci* 86, 676, (2002).
- HART D.A., Kydd A.S., Frank C.B., Hildebrand K.A., Tissue repair in rheumatoid arthritis: challenges and opportunities in the face of a systemic inflammatory disease, *Best Pract Res Clin Rheumatol*, 18, 187-202, (2004).
- HE G., Ma L.L., Pan J., Venkatraman S., ABA and BAB type triblock copolymers of PEG and PLA: a comparative study of drug release properties and "stealth" particle characteristics, *Int J Pharm*, 334, 48-55, (2007).
- HOFFMAN A.S., The origins and evolution of "controlled" drug delivery systems, *J Control Release*, 132, 153-163, (2008).
- HORA M.S., Rana R.K., Nunberg J.H., Tice T.R., Gilley R.M., Hudson M.E., Release of Human Serum-Albumin from Poly(Lactide-Co-Glycolide) Microspheres, *Pharmaceutical Research*, 7, 1190-1194, (1990).
- HOSAKA K., Ryu J., Saitoh S., Ishii T., Kuroda K., Shimizu K., The combined effects of anti-TNF α antibody and IL-1 receptor antagonist in human rheumatoid arthritis synovial membrane, *Cytokine*, 32, 263-269, (2005).
- HUANG C.L., Jiao L., Zhang J.J., Zeng J.B., Yang K.K., Wang Y.Z., Poly(butylene succinate)-poly(ethylene glycol) multiblock copolymer: synthesis, structure, properties and shape memory performance, *Polym Chem*, 3, 800-808, (2012).
- HUANG Y.Y., Chung T.W., Microencapsulation of gentamicin in biodegradable PLA and/or PLA/PEG copolymer, *J Microencapsul*, 18, 457-465, (2001).
- HUBBELL J.A., Synthetic biodegradable polymers for tissue engineering and drug delivery, *Curr Opin Solid St M*, 3, 246-251, (1998).
- HUTMACHER D.W., Scaffolds in tissue engineering bone and cartilage, *Biomaterials*, 21, 2529-2543, (2000).
- HWANG M.J., Joo M.K., Choi B.G., Park M.H., Hamley I.W., Jeong B., Multiple Sol-Gel Transitions of PEG-PCL-PEG Triblock Copolymer Aqueous Solution, *Macromol Rapid Commun*, 31, 2064-2069, (2010).

- IDA H., Aramaki T., Nakamura H., Fujikawa K., Arima K., Tamai M., Kamachi M., Satoh K., Origuchi T., Kawakami A., Furuichi I., Kawabe Y., Eguchi K., Different expression levels of TNF receptors on the rheumatoid synovial macrophages derived from surgery and a synovectomy as detected by a new flow cytometric analysis, *Cytotechnology*, 60, 161-164, (2009).
- INOUE H., Takamori M., Nagata N., Nishikawa T., Oda H., Yamamoto S., Koshihara Y., An investigation of cell proliferation and soluble mediators induced by interleukin 1b in human synovial fibroblasts: comparative response in osteoarthritis and rheumatoid arthritis., *Inflamm Res* 50, 65-72, (2001).
- IZQUIERDO R., Garcia-Giralt N., Rodriguez M.T., Caceres E., Garcia S.J., Gomez Ribelles J.L., Monleon M., Monllau J.C., Suay J., Biodegradable PCL scaffolds with an interconnected spherical pore network for tissue engineering, *J Biomed Mater Res A*, 85, 25-35, (2008).
- JACKSON C., Nguyen M., Arkell J., Sambrook P., Selective matrix metalloproteinase (MMP) inhibition in rheumatoid arthritis - Targetting gelatinase A activation, *Inflammation Research*, 50, 183-186, (2001).
- JARVIS B., Faulds D., Etanercept: a review of its use in rheumatoid arthritis, *Drugs*, 57, 945-966, (1999).
- JEONG J.G., Kim J.M., Cho H., Hahn W., Yu S.S., Kim S., Effects of IL-1beta on gene expression in human rheumatoid synovial fibroblasts, *Biochem Biophys Res Commun*, 324, 3-7, (2004).
- JEONG J.H., Lim D.W., Han D.K., Park T.G., Synthesis, characterization and protein adsorption behaviors of PLGA/PEG di-block co-polymer blend films, *Colloids Surf B Biointerfaces*, 18, 371-379, (2000).
- JIA W.J., Liu J.G., De Zhang Y., Wang J.W., Wang J., Sun C.Y., Pan Y.F., Yu C., Li G.Z., Zhang H., Gou M.L., Tu M.J., Qian Z.Y., Preparation, characterization, and optimization of pancreas-targeted 5-Fu loaded magnetic bovine serum albumin microspheres, *J Drug Target*, 15, 140-145, (2007).
- JORGENSEN C., Noel D., Apparailly F., Sany J., Stem cells for repair of cartilage and bone: the next challenge in osteoarthritis and rheumatoid arthritis, *Ann Rheum Dis*, 60, 305-309, (2001).
- JOVANONIC N., Bouchard A., Wofland G., Witkamp G.-J., Crommelin D.J.A., Jiskoot W., Stabilization of IgG by supercritical fluid drying: optimization of formulation and process parameters, *Eur J Pharm Biopharm* 68, 183-190, (2008).
- KARATAS A., Sonakin O., Kilicarslan M., Baykara T., Poly (epsilon-caprolactone) microparticles containing Levobunolol HCl prepared by a multiple emulsion (W/O/W) solvent evaporation technique: effects of some formulation parameters on microparticle characteristics, *J Microencapsul*, 26, 63-74, (2009).
- KAY J., Calabrese L., The role of interleukin-1 in the pathogenesis of rheumatoid arthritis, *Rheumatology (Oxford)*, 43 Suppl 3, iii2-iii9, (2004).
- KEYSTONE E.C., Schiff M.H., Kremer J.M., Kafka S., Lovy M., Devries T., Burge D.J., Once-weekly administration of 50 mg etanercept in patients with active rheumatoid arthritis: results of a multicenter, randomized, double-blind, placebo-controlled trial, *Arthritis Rheum*, 50, 353-363, (2004).

- KIERSNOWSKI A., Dabrowski P., Budde H., Kressler J., Piglowski J., Synthesis and structure of poly(epsilon-caprolactone)/synthetic montmorillonite nano-intercalates, *European Polymer Journal*, 40, 2591-2598, (2004).
- KIM B.K., Hwang S.J., Park J.B., Park H.J., Characteristics of felodipine-located poly(epsilon-caprolactone) microspheres, *J Microencapsul*, 22, 193-203, (2005).
- KIM J.H., Bae Y.H., Albumin loaded microsphere of amphiphilic poly(ethylene glycol)/ poly(alpha-ester) multiblock copolymer, *Eur J Pharm Sci*, 23, 245-251, (2004).
- KIM J.H., Talujay A., Knutson K., Bae Y.H., Stability of bovine serum albumin complexed with PEG-poly(L-histidine) diblock copolymer in PLGA microspheres, *J Cont Rel*, 109, 86-100, (2005).
- KIM K.K., Pack D.W., Microspheres for drug delivery, *BioMEMS and Biomedical Nanotechnology* 19-50, (2006).
- KIM M.S., Seo K.S., Hyun H., Khang G., Cho S.H., Controlled release of bovine serum albumin using MPEG-PCL diblock copolymers as implantable protein carriers, *J Appl Polym Sci*, 102, 1561-1567, (2006).
- KIM S.Y., Lee Y.M., Shin I.G., Kang J.S., Indomethacin-loaded methoxy poly(ethylene glycol)/poly(epsilon-caprolactone) diblock copolymeric nanosphere: pharmacokinetic characteristics of indomethacin in the normal Sprague-Dawley rats, *Biomaterials*, 22, 2049-2056, (2001).
- KIM S.Y., Shin I.G., Lee Y.M., Cho C.S., Sung Y.K., Methoxy poly(ethylene glycol) and epsilon-caprolactone amphiphilic block copolymeric micelle containing indomethacin. II. Micelle formation and drug release behaviours, *J Cont Rel*, 51, 13-22, (1998).
- KNAUPER V., Lopezotin C., Smith B., Knight G., Murphy G., Biochemical characterization of human collagenase-3, *Journal of Biological Chemistry*, 271, 1544-1550, (1996).
- KONTOYIANNI C., Sideratou Z., Theodossiou T., Tziveleka L.A., Tsiourvas D., Paleos C.M., A novel micellar PEGylated hyperbranched polyester as a prospective drug delivery system for paclitaxel, *Macromol Biosci*, 8, 871-881, (2008).
- KONTTINEN Y.T., Ainola M., Valleala H., Ma J., Ida H., Mandelin J., Kinne R.W., Santavirta S., Sorsa T., Lopez-Otin C., Takagi M., Analysis of 16 different matrix metalloproteinases (MMP-1 to MMP-20) in the synovial membrane: different profiles in trauma and rheumatoid arthritis, *Annals of the Rheumatic Diseases*, 58, 691-697, (1999).
- KORTH-BRADLEY J.M., Rubin A.S., Hanna R.K., Simcoe D.K., Lebsack M.E., The pharmacokinetics of etanercept in healthy volunteers, *Ann Pharmacother*, 34, 161-164, (2000).
- KREUTER J., Nanoparticles, Colloidal Drug Delivery Systems, Kreuter J., Marcel Dekker, New York, (1994). 219-342.
- KUSUNOKI N., Ito T., Sakurai N., Suguro T., Handa H., Kawai S., A novel celecoxib derivative potently induces apoptosis of human synovial fibroblasts, *JPET*, 314, 796-803, (2005).

- KWON H.Y., Lee J.Y., Choi S.W., Jang Y., Kim J.H., Preparation of PLGA nanoparticles containing estrogen by emulsification–diffusion method, *Colloids Surf A: Physicochem Eng Aspects* 182, 123-130, (2001).
- LACASSE F.X., Filion M.C., Phillips N.C., Escher E., McMullen J.N., Hildgen P., Influence of surface properties at biodegradable microsphere surfaces: effects on plasma protein adsorption and phagocytosis, *Pharm Res*, 15, 312-317, (1998).
- LAM C.X.F., Savalani M.M., Teoh S.H., Hutmacher D.W., Dynamics of in vitro polymer degradation of polycaprolactone-based scaffolds: accelerated versus simulated physiological conditions, *Biomed Mater* 2008, 3, 0341
- Decker C. Radiation-induced oxidation of solid poly(ethylene oxide) II: Mechanism, *J Polym Sci* 15, 799-813, (1977).
- LEBSACK M.E., Hanna R.K., Lange M.A., Absolute bioavailability of TNF receptor fusion protein following subcutaneous injection in healthy volunteers, *Pharmacotherapy*, 17, 1181-1189, (1997).
- LEE D.M., Weinblatt M.E., Rheumatoid arthritis, *Lancet*, 358, 903-911, (2001).
- LEE J.W., Hua F., Lee D.S., Thermoreversible gelation of biodegradable poly(epsilon-caprolactone) and poly(ethylene glycol) multiblock copolymers in aqueous solutions, *J Control Release*, 73, 315-327, (2001).
- LI S.M., Garreau H., Vert M., Petrova T., Manolova N., Rashkov I., Hydrolytic degradation of poly(oxyethylene)-poly-(epsilon-caprolactone) multiblock copolymers, *Journal of Applied Polymer Science*, 68, 989-998, (1998).
- LIN M., Meng S., Zhong W., Li Z., Du Q., Tomasik P., Novel biodegradable blend matrices for controlled drug release, *J Pharm Sci*, 97, 4240-4248, (2008).
- LIN W.J., Chang K.L., Degradation of PCL-MPEG diblock copolymer in rat plasma, *J Biomed Mater Res*, 85A, 692-698, (2008).
- LIN W.J., Huang L.I., Fabrication of porous poly(epsilon-caprolactone) microparticles for protein release, *J Microencapsul*, 18, 577-584, (2001).
- LIN W.J., Wang C.L., Chen Y.C., Comparison of two pegylated copolymeric micelles and their potential as drug carriers, *Drug Deliv*, 12, 223-227, (2005).
- LIPOWITZ A.J., Synovial Fluid, Textbook of Small Animal Orthopaedics, Newton C. D. and D. M. Nunamaker, International Veterinary Information Service, ABD, (1985).
- LIPSKY P.E., Interleukin-6 and rheumatic diseases, *Arthritis Res Ther*, 8 Suppl 2, S4, (2006).
- LIU Q., De Wijn J.R., Van Blitterswijk C.A., Nano-apatite/polymer composites: mechanical and physicochemical characteristics, *Biomaterials*, 18, 1263-1270, (1997).
- LOVELL D.J., Reiff A., Jones O.Y., Schneider R., Nocton J., Stein L.D., Gedalia A., Ilowite N.T., Wallace C.A., Whitmore J.B., White B., Giannini E.H., Long-term safety and efficacy of etanercept in children with polyarticular-course juvenile rheumatoid arthritis, *Arthritis Rheum*, 54, 1987-1994, (2006).

- LUCIANI A., Coccoli V., Orsi S., Ambrosio L.,Netti P.A., PCL microspheres based functional scaffolds by bottom-up approach with predefined microstructural properties and release profiles, *Biomaterials*, 29, 4800-4807, (2008).
- LUCK M., Pistel K.F., Li Y.X., Blunk T., Muller R.H.,Kissel T., Plasma protein adsorption on biodegradable microspheres consisting of poly(D,L-lactide-co-glycolide), poly(L-lactide) or ABA triblock copolymers containing poly(oxyethylene). Influence of production method and polymer composition, *J Control Release*, 55, 107-120, (1998).
- LUCKE A., Tessmar J., Schnell E., Schmeer G.,Gopferich A., Biodegradable poly(D,L-lactic acid)-poly(ethylene glycol)-monomethyl ether diblock copolymers: structures and surface properties relevant to their use as biomaterials, *Biomaterials*, 21, 2361-2370, (2000).
- LUO X., Qiu D., He B., Wang L.,Luo J., Biodegradable heparin-loaded microspheres: carrier molecular composition and microsphere structure, *Macromol Biosci*, 6, 373-381, (2006).
- MA L., Liu M., Liu H., Chen J.,Cui D., In vitro cytotoxicity and drug release properties of pH and temperature sensitive core shell hydrogel microspheres, *Int J Pharm* 385, 86-91, (2010).
- MAINI R.N.,Taylor P.C., Anti-cytokine therapy for rheumatoid arthritis, *Annu Rev Med*, 51, 207-229, (2000).
- MAKINO K., Umetsu M., Goto Y., Nakayama A., Suhara T., Tsujii J., Kikuchi A., Ohshima H., Sakurai Y.,Okano T., Interaction between charged soft microcapsules and red blood cells: effects of PEGylation of microcapsule membranes upon their surface properties, *Colloids Surf B* 13, 287-297, (1999).
- MANO J.F., Sousa R.A., Boesel L.F., Neves N.M.,Reis R.L., Bioinert, biodegradable and injectable polymeric matrix composites for hard tissue replacement: state of the art and recent developments, *Compos Sci Technol*, 64, 789-817, (2004).
- MASSON V., Maurin F., Fessi H.,Devissaguet J.P., Influence of sterilization processes on poly(epsilon-caprolactone) nanospheres, *Biomaterials*, 18, 327-335, (1997).
- MICHLOVSKÀ L., Mravcovà L., Hermanovà S., Kučerík J.,J. J., Functionalization conditions of PLGA-PEG-PLGA copolymer with itaconic anhydride, *Macromol Symp*, 295, 119-124, (2010).
- MIOSSEC P., Interleukin-17 in rheumatoid arthritis: if T cells were to contribute to inflammation and destruction through synergy, *Arthritis Rheum*, 48, 594-601, (2003).
- MOGHIMI S.M., Hunter A.C.,Murray J.C., Long-circulating and target-specific nanoparticles: theory to practice, *Pharmacol Rev*, 53, 283-318, (2001).
- MONTANARI L., Conti B., Benelli P., Signoretti E.C.,Valvo L., Gamma irradiation effects on poly(D,L-lactide-co-glycolide) microspheres, *Eur J Pharm Sci* 4, 135, (1996).
- MOORE B.A., Aznavoorian S., Engler J.A.,Windsor L.J., Induction of collagenase-3 (MMP-13) in rheumatoid arthritis synovial fibroblasts, *Biochim Biophys Acta*, 1502, 307-318, (2000).

- MORELAND L.W., Weinblatt M.E., Keystone E.C., Kremer J.M., Martin R.W., Schiff M.H., Whitmore J.B., White B.W., Etanercept treatment in adults with established rheumatoid arthritis: 7 years of clinical experience, *J Rheumatol*, 33, 854-861, (2006).
- MORITA T., Sakamura Y., Horikiri Y., Suzuki T., Yoshino H., Protein encapsulation into biodegradable microspheres by a novel S/O/W emulsion method using poly(ethylene glycol) as a protein micronization adjuvant, *Journal of Controlled Release*, 69, 435-444, (2000).
- MUKERJEE A., Pruthi V., Sinha V.R., Preparation and characterization of poly- ϵ -caprolactone carrier particles for controlled insulin delivery. Intl Conf., (2006).
- MUKERJEE A., Sinha V.R., Pruthi V., Preparation and Characterization of Poly- ϵ -caprolactone Particles for Controlled Insulin Delivery, *J Biomed Pharm Eng*, 1, 40-44, (2007).
- MURATA K., Ogawa S., Watanabe E., Hayashi Y., Yamashita S., FT-IR measurements of some greenhouse gases in thin film of poly(methyl methacrylate), *Vibrational Spectroscopy* 13, 235-240, (1997).
- NAGASE H., Activation mechanisms of matrix metalloproteinases. *Biological Chemistry*, 378, 151-160, (1997).
- NAGATA M., Kiyotsukuri T., Takeuchi S., Tsutsumi N., Sakai W., Degradation of Aliphatic Polyesters Copolymerized with Poly(ethylene glycol)s, *Polym Int*, 42, 33-38, (1997).
- NGUYEN T.H.A., Nguyen V.C., Formation of nanoparticles in aqueous solution from poly(ϵ -caprolactone)–poly(ethylene glycol)–poly(ϵ -caprolactone), *Adv Nat Sci Nanosci Nanotechnol* 1, 025012, (2010).
- NIKLES S.M., Nikles J.A., Hudson J.S., Nikles D.E., Diblock copolymers for magnetically triggered drug delivery systems, *JOSHUA*, 7, 35-38, (2010).
- NUZZI R., Gunetti M., Rustichelli D., Roagna B., Fronticelli Bardelli F., Fagioli F., Ferrero I., Effect of In Vitro Exposure of Corticosteroid Drugs, Conventionally Used in AMD Treatment, on Mesenchymal Stem Cells, *Stem Cells Int*, 2012, 946090, (2012).
- O'DELL J.R., Methotrexate use in rheumatoid arthritis, *Rheum Dis Clin North Am*, 23, 779-796, (1997).
- O'DONNELL P.B., McGinity J.W., Preparation of microspheres by the solvent evaporation technique, *Adv Drug Deliv Rev*, 28, 25-42, (1997).
- O'HAGAN D.T., Jeffery H., Davis S.S., The preparation and characterization of PLGA microspheres: III. Microparticle/ polymer degradation rates and the in vitro release of a model protein, *Int J Pharm*, 103, 37-45, (1994).
- OGATA Y., Enghild J.J., Nagase H., Matrix Metalloproteinase-3 (Stromelysin) Activates the Precursor for the Human Matrix Metalloproteinase-9, *Journal of Biological Chemistry*, 267, 3581-3584, (1992).
- OH S.H., Park I.K., Kim J.M., Lee J.H., In vitro and in vivo characteristics of PCL scaffolds with pore size gradient fabricated by a centrifugation method, *Biomaterials*, 28, 1664-1671, (2007).
- PAKOZDI A., Amin M.A., Haas C.S., Martinez R.J., Haines G.K., 3rd, Santos L.L., Morand E.F., David J.R., Koch A.E., Macrophage migration inhibitory factor: a mediator of matrix metalloproteinase-2 production in rheumatoid arthritis, *Arthritis Res Ther*, 8, R132, (2006).

- PARK J.H., Ye M., Park K., Biodegradable polymers for microencapsulation of drugs, *Molecules*, 10, 146-161, (2005).
- PEAN J.M., Boury F., Venier-Julienne M.C., Menei P., Proust J.E., Benoit J.P., Why does PEG 400 co-encapsulation improve NGF stability and release from PLGA biodegradable microspheres?, *Pharm Res*, 16, 1294-1299, (1999).
- PERRET R., Skoulios A., Synthese et caracterisation de copolymers sequences polyoxyethylene/poly-ε-caprolactone, *Makromol Chem* 156, 143-156, (1972).
- PETROVA S., Miloshev S., Mateva R., Iliev I., Synthesis of amphiphilic PEG-PCL-PEG triblock copolymers, *J Univ Tech Metal*, 43, 199-204, (2008).
- PIAO M.G., Kim J.H., Kim J.O., Lyoo W.S., Lee M.H., Yong C.S., Choi H.G., Enhanced oral bioavailability of piroxicam in rats by hyaluronate microspheres, *Drug Dev Ind Pharm*, 33, 485-491, (2007).
- PISTEL K.F., Kissel T., Effects of salt addition on the microencapsulation of proteins using W/O/W double emulsion technique, *Journal of Microencapsulation*, 17, 467-483, (2000).
- PITT C., Poly(ε-caprolactone) and its copolymers, Biodegradable polymers as drug delivery systems, Chasin M. and R. Langer, Marcel-dekker, New York, (1990). 71-120.
- PRABHAKAR R.L., Brocchini S., Knowles J.C., Effect of glass composition on the degradation properties and ion release characteristics of phosphate glass--polycaprolactone composites, *Biomaterials*, 26, 2209-2218, (2005).
- PRABU P., Chaudhari A.A., Aryal S., Dharmaraj N., Park S.Y., Kim W.D., Kim H.Y., In vitro evaluation of poly(caprolactone) grafted dextran (PGD) nanoparticles with cancer cell, *J Mater Sci Mater Med*, 19, 2157-2163, (2008).
- PRETZEL D., Pohlers D., Weinert S., Kinne R.W., In vitro model for the analysis of synovial fibroblast-mediated degradation of intact cartilage, *Arthritis Res Ther*, 11, R25, (2009).
- QUELLEC P., Gref R., Perrin L., Dellacherie E., Sommer F., Verbavatz J.M., Alonso M.J., Protein encapsulation within polyethylene glycol-coated nanospheres. I. Physicochemical characterization, *J Biomed Mater Res*, 42, 45-54, (1998).
- RAI B., Teoh S.H., Ho K.H., Hutmacher D.W., Cao T., Chen F., Yacob K., The effect of rhBMP-2 on canine osteoblasts seeded onto 3D bioactive polycaprolactone scaffolds, *Biomaterials*, 25, 5499-5506, (2004).
- RAJAPAKSA T.E., Lo D.D., Microencapsulation of vaccine antigens and adjuvants for mucosal targeting, *Curr Immunol Rev* 6, 29-37, (2010).
- RAMESH D.V., Medlicott N., Razzak M., Tucker I.G., Microencapsulation of FITC-BSA into poly(ε-caprolactone) by a water-in-oil-in-oil solvent evaporation technique, *Trends Biomater Artif Organs*, 15, 31-36, (2002).
- RATNER B.D., Hoffman A.S., Schoen F.J., Lemons J.E., Classes of materials used in medicine, *Biomaterials science: an introduction to materials in medicine*, Academic Press, (2004). 68.

- RAVI S., Peh K.K., Darwis Y., Murthy B.K., Singh T.R., Mallikarjun C., Development and characterisation of polymeric microspheres for controlled release protein loaded drug delivery system, *Indian J Pharm Sci* 70, 303-309, (2008).
- RINAUDO M., Rozand Y., Mathieu P., Conrozier T., Role of different pre-treatments on composition and rheology of synovial fluids, *Polymers*, 1, 16-34, (2009).
- ROSA D.S., Guedes C.G.F., Casarin F., Mechanical Behavior and Biodegradation of Poly(ε-caprolactone)/Starch Blends with and without Expansor, *Polymer Bulletin*, 54, 321-333, (2005).
- ROUX C.H., Brocq O., Valerio L., Amoretti N., Breuil V., Albert-Sabonnadiere C., Grisot C., Allam Y., Chevalier P., Pradier C., Euller-Ziegler L., Etanercept versus glucocorticosteroids intra-articular (IA) injections in rheumatoid arthritis (RA): a randomized double blind study, *Ann Rheum Dis*, 67, 329, (2008).
- RUAN G., Feng S.S., Preparation and characterization of poly(lactic acid)-poly(ethylene glycol)-poly(lactic acid) (PLA-PEG-PLA) microspheres for controlled release of paclitaxel, *Biomaterials*, 24, 5037-5044, (2003).
- RYU J., Jeong Y.I., Kim I.S., Lee J.H., Nah J.W., Kim S.H., Clonazepam release from core-shell type nanoparticles of poly(ε-caprolactone)/poly(ethylene glycol)/poly(ε-caprolactone) triblock copolymers, *Int J Pharm*, 200, 231-242, (2000).
- SAEZ V., Ramon J., Aldana R., Pérez D., Hardy E., Microencapsulation of recombinant interferon α-2b into poly(D,L-lactide-co-glycolide) microspheres, *Biotechnologia Aplicada*, 25, 31-41, (2008).
- SAH H.K., Toddywala R., Chien Y.W., The Influence of Biodegradable Microcapsule Formulations on the Controlled-Release of a Protein, *Journal of Controlled Release*, 30, 201-211, (1994).
- SAVARINO L., Baldini N., Greco M., Capitani O., Pinna S., Valentini S., Lombardo B., Esposito M.T., Pastore L., Ambrosio L., Battista S., Causa F., Zeppetelli S., Guarino V., Netti P.A., The performance of poly-ε-caprolactone scaffolds in a rabbit femur model with and without autologous stromal cells and BMP4, *Biomaterials*, 28, 3101-3109, (2007).
- SAXNE T., Palladino M.A., Jr., Heinegard D., Talal N., Wollheim F.A., Detection of tumor necrosis factor alpha but not tumor necrosis factor beta in rheumatoid arthritis synovial fluid and serum, *Arthritis Rheum*, 31, 1041-1045, (1988).
- SAYIN B., Çalış S., Atilla B., Marangoz S., Hıncal A., Implantation of vancomycin microspheres in blend with human/rabbit bone grafts to infected bone defects, *J Microencapsul*, 23, 553-566, (2006).
- SHAO X.X., Hutmacher D.W., Ho S.T., Goh J.C., Lee E.H., Evaluation of a hybrid scaffold/cell construct in repair of high-load-bearing osteochondral defects in rabbits, *Biomaterials*, 27, 1071-1080, (2006).
- SHARIF S., O'hagan D.T., A comparison of alternative methods for the determination of the levels of proteins entrapped in poly(lactide-co-glycolide) microparticles, *Int J Pharm*, 115, 1995, (1995).
- SHEIKH F.A., Barakat N.A., Kanjwal M.A., Aryal S., Khil M.S., Kim H.Y., Novel self-assembled amphiphilic poly(ε-caprolactone)-grafted-poly(vinyl alcohol) nanoparticles: hydrophobic and hydrophilic drugs carrier nanoparticles, *J Mater Sci Mater Med*, 20, 821-831, (2009).

- SHI B., Fang C., You M.X., Zhang Y., Fu S., Pei Y.Y., Stealth MePEG-PCL micelles: effects of the polymer composition on micelle physicochemical characteristics, in vitro drug release, in vivo pharmacokinetics in rats and biodistribution in S180 tumor bearing mice, *Colloid Polym Sci*, 283, 954-967, (2005).
- SHINGU M., Nagai Y., Isayama T., Naono T., Nobunaga M., The effects of cytokines on metalloproteinase inhibitors (TIMP) and collagenase production by human chondrocytes and TIMP production by synovial cells and endothelial cells, *Clin Exp Immunol*, 94, 145-149, (1993).
- SIGURDARDOTTIR S.L., Freysdottir J., Vikingsdottir T., Valdimarsson H., Vikingsson A., Do non-steroidal anti-inflammatory drugs influence chronic inflammation? The effects of piroxicam on chronic antigen-induced arthritis in rats, *Scand J Rheumatol*, 37, 469-476, (2008).
- SINHA V.R., Bansal K., Kaushik R., Kumria R., Trehan A., Poly-epsilon-caprolactone microspheres and nanospheres: an overview, *Int J Pharm*, 278, 1-23, (2004).
- SMITH M.D., Slavotinek J., Au V., Weedon H., Parker A., Coleman M., Roberts-Thomson P.J., Ahern M.J., Successful treatment of rheumatoid arthritis is associated with a reduction in synovial membrane cytokines and cell adhesion molecule expression, *Rheumatology (Oxford)*, 40, 965-977, (2001).
- SO A., Chamot A.M., Peclat V., Gerster J.C., Serum MMP-3 in rheumatoid arthritis: correlation with systemic inflammation but not with erosive status, *Rheumatology (Oxford)*, 38, 407-410, (1999).
- SOMMER O.J., Kladosek A., Weiler V., Czembirek H., Boeck M., Stiskal M., Rheumatoid arthritis: a practical guide to state-of-the-art imaging, image interpretation, and clinical implications, *Radiographics*, 25, 381-398, (2005).
- STEPHENSON C.B., Gildengorin G., Serum retinol, the acute phase response, and the apparent misclassification of vitamin A status in the third National Health and Nutrition Examination Survey, *Am J Clin Nutr*, 72, 1170-1178, (2000).
- STOLNIK S., Dunn S.E., Garnett M.C., Davies M.C., Coombes A.G., Taylor D.C., Irving M.P., Purkiss S.C., Tadros T.F., Davis S.S., Et Al., Surface modification of poly(lactide-co-glycolide) nanospheres by biodegradable poly(lactide)-poly(ethylene glycol) copolymers, *Pharm Res*, 11, 1800-1808, (1994).
- SUZUKI M., Tetsuka T., Yoshida S., Watanabe N., Kobayashi M., Matsui N., Okamoto T., The role of p38 mitogen-activated protein kinase in IL-6 and IL-8 production from the TNF-alpha- or IL-1beta-stimulated rheumatoid synovial fibroblasts, *FEBS Lett*, 465, 23-27, (2000).
- TADDEI P., Tinti A., Reggiani M., Fagnano C., In vitro mineralization of bioresorbable poly(3-caprolactone)/apatite composites for bone tissue engineering: a vibrational and thermal investigation, *J Mol Struct*, 744-747, 135-143, (2005).
- TAY B.Y., Zhang S.X., Myint M.H., Ng F.L., Chandrasekaran M., Tan L.K.A., Processing of polycaprolactone porous structure for scaffold development, *J Mater Process Tech* 182, 117-121, (2007).

- Veronese F.M., Pasut G., PEGylation, successful approach to drug delivery, *Drug Discovery Today*, 10, 1451-1458, (2005).
- WANG J., Chua K.M., Wang C.H., Stabilization and encapsulation of human immunoglobulin G into biodegradable microspheres, *J Colloid Interface Sci*, 271, 92-101, (2004).
- WANG Y., Liu C.B., Fan L.Y., Sheng Y., Mao J., Synthesis of biodegradable poly(butylene terephthalate)/poly(ethylene glycol) (PBT/PEG) multiblock copolymers and preparation of indirubin loaded microspheres, *Polymer Bulletin* 53, 147-154, (2005).
- WEAVER A.L., The impact of new biologicals in the treatment of rheumatoid arthritis, *Rheumatology (Oxford)*, 43 Suppl 3, iii17-iii23, (2004).
- WILLIAMS J.M., Adewunmi A., Schek R.M., Flanagan C.L., Krebsbach P.H., Feinberg S.E., Hollister S.J., Das S., Bone tissue engineering using polycaprolactone scaffolds fabricated via selective laser sintering, *Biomaterials*, 26, 4817-4827, (2005).
- WONG H.M., Wang J.J., Wang C.H., In vitro sustained release of human immunoglobulin G from biodegradable microspheres, *Industrial & Engineering Chemistry Research*, 40, 933-948, (2001).
- WOODRUFF M.A., Dietmar W., The return of a forgotten polymer: Polycaprolactone in the 21st century, *Prog Polym Sci*, 35, 1217-1256, (2010).
- WU Y., Kennedy S.J., Clark R.L., Polymeric particle formation through electrospraying at low atmospheric pressure, *J Biomed Mater Res B Appl Biomater*, 90, 381-387, (2009).
- XIAO R.Z., Zeng Z.W., Zhou G.L., Wang J.J., Li F.Z., Wang A.M., Recent advances in PEG-PLA block copolymer nanoparticles, *Int J Nanomedicine*, 5, 1057-1065, (2010).
- XU S., Lu H., Lin J., Chen Z., Jiang D., Regulation of TNF α and IL1 β in rheumatoid arthritis synovial fibroblasts by leukotriene B $_4$, *Rheumatol Int* 30, 1183-1189, (2010).
- YANG J., Jia L., Yin L., Yu J., Shi Z., Fang Q., Cao A., A novel approach to biodegradable block copolymers of epsilon-caprolactone and delta-valerolactone catalyzed by new aluminum metal complexes, *Macromol Biosci*, 4, 1092-1104, (2004).
- YANG Y.Y., Chung T.S., Ng N.P., Morphology, drug distribution, and in vitro release profiles of biodegradable polymeric microspheres containing protein fabricated by double-emulsion solvent extraction/evaporation method, *Biomaterials*, 22, 231-241, (2001).
- YEO Y., Park K., Control of encapsulation efficiency and initial burst in polymeric microparticle systems, *Arch Pharm Res* 27, 1-12, (2004).
- YIM D.S., Zhou H., Buckwalter M., Nestorov I., Peck C.C., Lee H., Population pharmacokinetic analysis and simulation of the time-concentration profile of etanercept in pediatric patients with juvenile rheumatoid arthritis, *J Clin Pharmacol*, 45, 246-256, (2005).
- YOUAN B.B.C., Benoit M.A., Baras B., Gillard J., Protein-loaded poly(epsilon-caprolactone) microparticles. I. Optimization of the preparation by (water-in-oil)-in water emulsion solvent evaporation, *Journal of Microencapsulation*, 16, 587-599, (1999).

- ZHANG H.G., Blackburn W.D., Jr.,Minghetti P.P., Characterization of a SV40-transformed rheumatoid synovial fibroblast cell line which retains genotypic expression patterns: a model for evaluation of anti-arthritic agents, *In Vitro Cell Dev Biol Anim*, 33, 37-41, (1997).
- ZHANG J.X.,Zhu K.J., An improvement of double emulsion technique for preparing bovine serum albumin-loaded PLGA microspheres, *J Microencapsul*, 21, 775-785, (2004).
- ZHANG Y., Guo S.,Huang W., Tyrosine kinase inhibitor loaded PCL microspheres prepared by S/O/W technique using ethanol as pretreatment agent, *Int J Pharm*, 369, 19-23, (2009).
- ZHOU S., Deng X.,Yang H., Biodegradable poly(epsilon-caprolactone)-poly(ethylene glycol) block copolymers: characterization and their use as drug carriers for a controlled delivery system, *Biomaterials*, 24, 3563-3570, (2003).

Ekler

EK 1

RADAI Anketi

Bu anket hastalığınızın şimdiki ve geçmişteki etkinliğini tayin etmek için tasarlanmıştır. Her soruyu cevaplayınız. Eğer bir soruyu nasıl cevaplayacağınız konusunda emin değilseniz lütfen verebildiğiniz en iyi cevabı işaretleyiniz.

1. Genel olarak son altı ayda romatizmal durumunuzun etkinliği nasıldı?

ETKİNLİĞİN DERECESİNİ BELİRTMEK İÇİN KUTUYU X İLE İŞARETLEYİNİZ

Hiç aktif değil Fazlasıyla etkin

0 1 2 3 4 5 6 7 8 9 10

2. Eklem hassasiyetiniz (örneğin hafif bir dokunmayla ilişkili eklem acısı) ve eklem şişkinliğiniz (örneğin iltihaba bağlı eklem büyümesi) açısından romatizmal durumunuzun bugün ki etkinliği sizce nasıl ?

ETKİNLİĞİN DERECESİNİ BELİRTMEK İÇİN KUTUYU X İLE İŞARETLEYİNİZ

Hiç aktif değil Fazlasıyla etkin

0 1 2 3 4 5 6 7 8 9 10

3. Bugün romatizmal durumunuzla bağlantılı ne kadar ağrı hissediyorsunuz?

ETKİNLİĞİN DERECESİNİ BELİRTMEK İÇİN KUTUYU X İLE İŞARETLEYİNİZ

Hiç aktif değil Fazlasıyla etkin

0 1 2 3 4 5 6 7 8 9 10

4. Bugün uyandıığınızda eklemlerinizi sert miydi?

Lütfen aşağıdakilerden birini X ile işaretleyin:

1 Evet 2 Hayır – 6. Soruya geçiniz

5. Evetse, lütfen eklem sertliğinizin süresini aşağıdakilerden birini X ile işaretleyerek belirtiniz:

30 dakikadan daha az 1
30 dakikadan daha fazla fakat 1 saatten daha az 2
1 saatten daha fazla fakat 2 saatten daha az 3
2 saatten daha fazla fakat 4 saatten daha az 4
4 saatten daha fazla 5
Bütün gün 6

6. Lütfen aşağıda listelenen her eklem bölgeniz için bugün duyduğunuz ağrı seviyesini belirten uygun kutuya X işareti koyunuz.

		Sol Yandaki			
		hiç	hafif	orta	ağır
a	Omuz	1 <input type="checkbox"/>	2 <input type="checkbox"/>	3 <input type="checkbox"/>	4 <input type="checkbox"/>
b	Dirsek	1 <input type="checkbox"/>	2 <input type="checkbox"/>	3 <input type="checkbox"/>	4 <input type="checkbox"/>
c	El bileği	1 <input type="checkbox"/>	2 <input type="checkbox"/>	3 <input type="checkbox"/>	4 <input type="checkbox"/>
d	Parmaklar (el)	1 <input type="checkbox"/>	2 <input type="checkbox"/>	3 <input type="checkbox"/>	4 <input type="checkbox"/>
e	Kalça	1 <input type="checkbox"/>	2 <input type="checkbox"/>	3 <input type="checkbox"/>	4 <input type="checkbox"/>
f	Diz	1 <input type="checkbox"/>	2 <input type="checkbox"/>	3 <input type="checkbox"/>	4 <input type="checkbox"/>
g	Ayak bileği	1 <input type="checkbox"/>	2 <input type="checkbox"/>	3 <input type="checkbox"/>	4 <input type="checkbox"/>
h	Ayak parmakları	1 <input type="checkbox"/>	2 <input type="checkbox"/>	3 <input type="checkbox"/>	4 <input type="checkbox"/>

Sağ Yandaki

		hiç	hafif	orta	ağır
a	Omuz	1 <input type="checkbox"/>	2 <input type="checkbox"/>	3 <input type="checkbox"/>	4 <input type="checkbox"/>
b	Dirsek	1 <input type="checkbox"/>	2 <input type="checkbox"/>	3 <input type="checkbox"/>	4 <input type="checkbox"/>
c	El bileği	1 <input type="checkbox"/>	2 <input type="checkbox"/>	3 <input type="checkbox"/>	4 <input type="checkbox"/>
d	Parmaklar (el)	1 <input type="checkbox"/>	2 <input type="checkbox"/>	3 <input type="checkbox"/>	4 <input type="checkbox"/>
e	Kalça	1 <input type="checkbox"/>	2 <input type="checkbox"/>	3 <input type="checkbox"/>	4 <input type="checkbox"/>
f	Diz	1 <input type="checkbox"/>	2 <input type="checkbox"/>	3 <input type="checkbox"/>	4 <input type="checkbox"/>
g	Ayak bileği	1 <input type="checkbox"/>	2 <input type="checkbox"/>	3 <input type="checkbox"/>	4 <input type="checkbox"/>
h	Ayak parmakları	1 <input type="checkbox"/>	2 <input type="checkbox"/>	3 <input type="checkbox"/>	4 <input type="checkbox"/>

EK 2

Kabul Kriterleri

10 ya da üstün yaşta olmak

Romatolog tarafından en az 6 ay önce Romatoid Artrit (eklem iltihabı) ya da Çocuk Artridi teşhisi konulmuş olmak

3 aylık sabit ilaç kürü

RADAI ölçütüne göre şiddetli ağrı ve yetersizlik (1)

Artirite bağlı olarak indeks eklem 4. seviyede radyolojik bozulması (2)

Ret Kriterleri

Kontrol edilemez başka bir psikiyatrik hastalık

Kontrol edilemez başka bir tıbbi hastalık (aktif kanser gibi)

Cerrahi müdahalede komplikasyon

(1) RADAI'nin amacı doktorun teşhislerine tamamlayıcı olarak hizmet edecek ve özellikle laboratuvar ölçümleri ile klinik teşhislerin mümkün olmayabileceği veya çok çaba gerektireceği gözleme dayalı çalışmalar ve hasta yönetimi gibi doktorun teşhislerinin ihmal edilebileceğini belirli durumlarda kullanımı kolay bir RA hastalık aktivitesi değerlendirmesi sağlamaktır. RADAI toplam puanının hastalık aktivitesini ölçebildiği ispatlanmıştır: hastalık aktivitesinin eşik ayar ölçümleriyle iyi şekilde uygunluk göstermiştir.

(2) Kellgren-Lawrance Artrit Ölçeği

Seviye1: eklem boşluklarında şüpheli daralma ve olası osteofitik dokulaşma

Seviye 2: kesin osteofit, eklem boşluklarında tamamen kesin daralma

Seviye 3: orta seviyede çoklu osteofit, eklem boşluklarında kesin daralma, bazı

bölgelerde doku sertleşmesi ve kemik çevresinde olası deformasyon

Seviye 4: geniş osteofit, eklem boşluğunda belirgin daralma, şiddetli doku sertleşmesi ve kemik çevresinde kesin deformasyon

(3) Hastaların hastaneye yatmalarını gerektirmeyen durumlarına Hoffer ve çalışma arkadaşlarının sınıflandırmasına göre karar verilecektir:

(1) toplu ayakta ambulatuvar (birçok aktivite için iç ve dış mekanlarda yürüme ve yürüme yardımına ihtiyacı duyabilme)

(2) hanede ambulatuvar, (sadece iç mekanlarda yürüme),

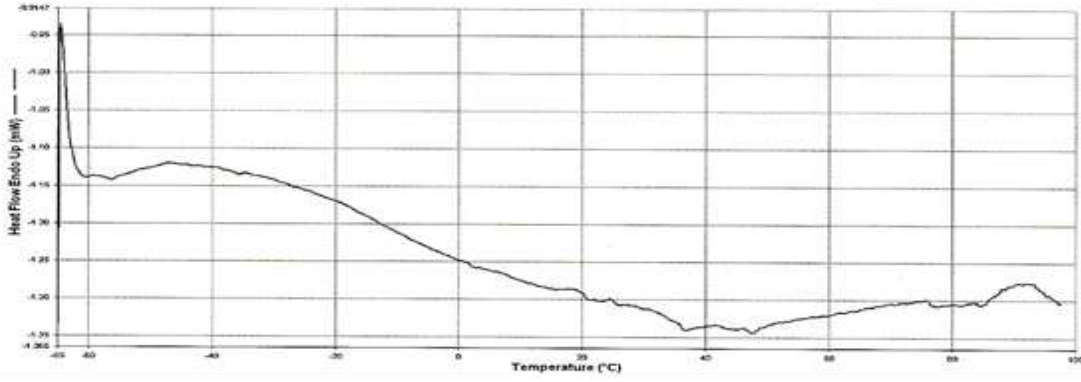
(3) işlevsel olmayan ambulatuvar. (sadece terapi seanslarında yürüme),

(4) ambulatuvar olmayanlar; tamamiyle tekerli sandalye bağımlı hastalar

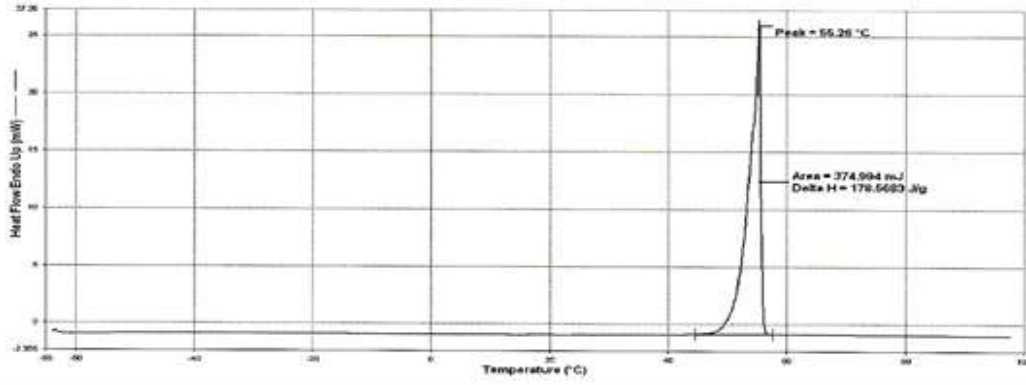
(*) Hoffer MM, Feiwell E, Perry R, Perry J, Bonnett C (1973) Functional ambulation in patients with myelomeningocele. J Bone Joint Surg Am 55:137–148

EK-3

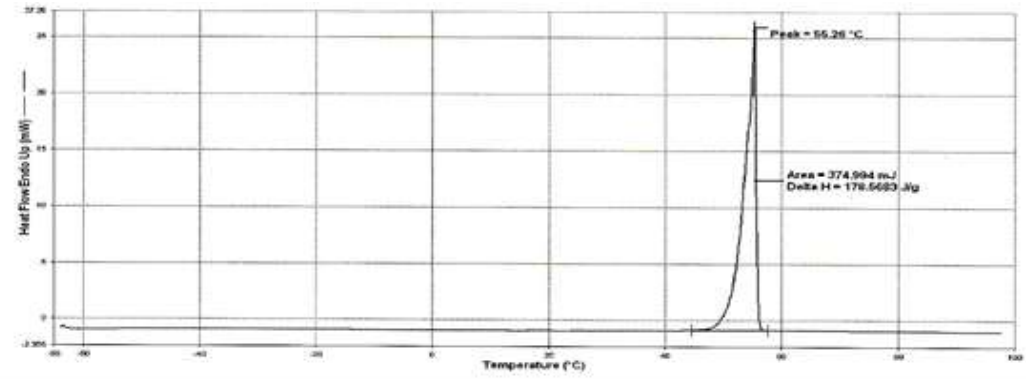
DSC Termogramları



(A)

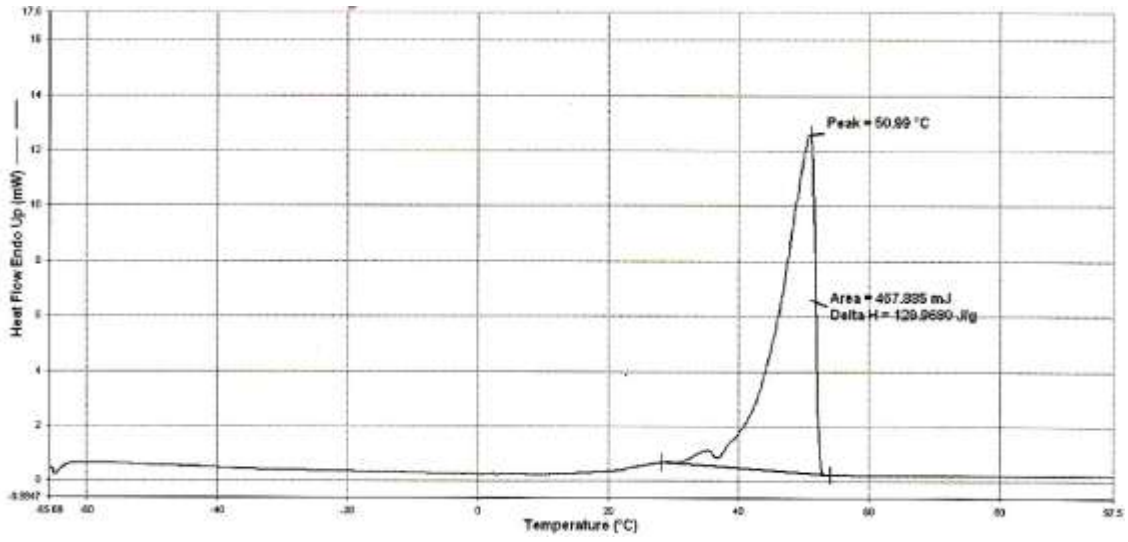


(B)

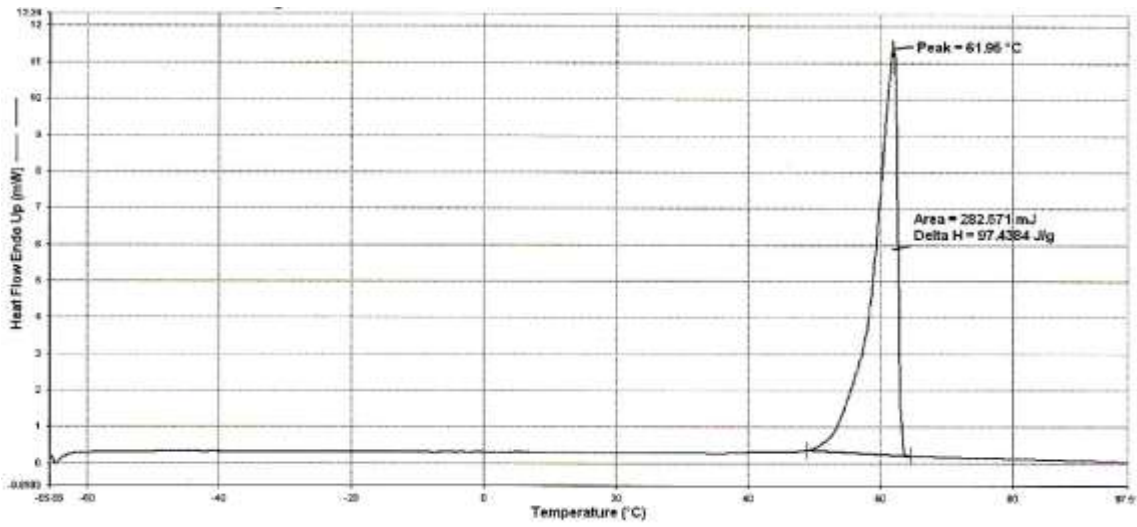


(C)

Şekil 1. DSC termogramları: (A) PEG oligomeri, (B) MPEG oligomeri, (C) ε-kaprolakton monomeri

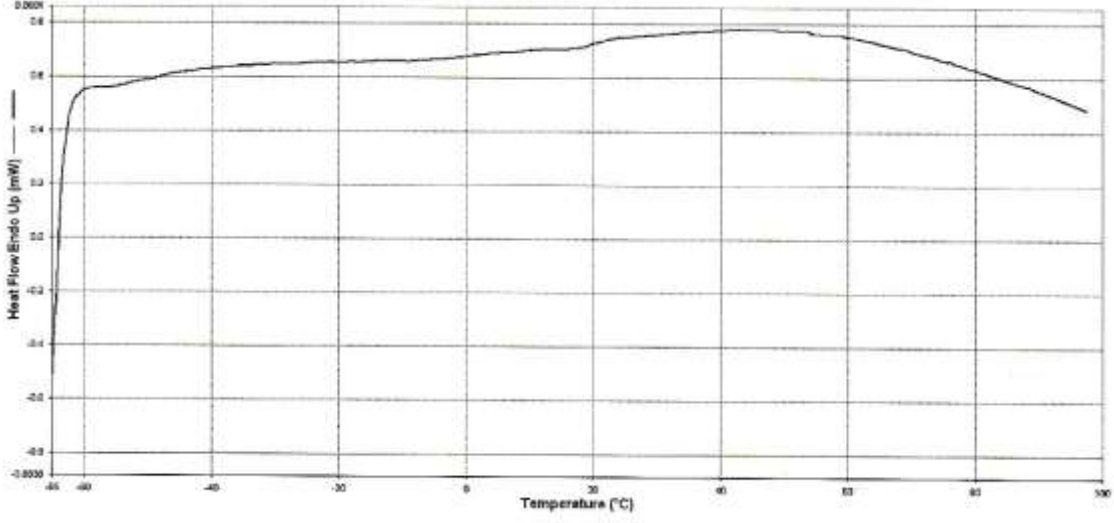


(A)

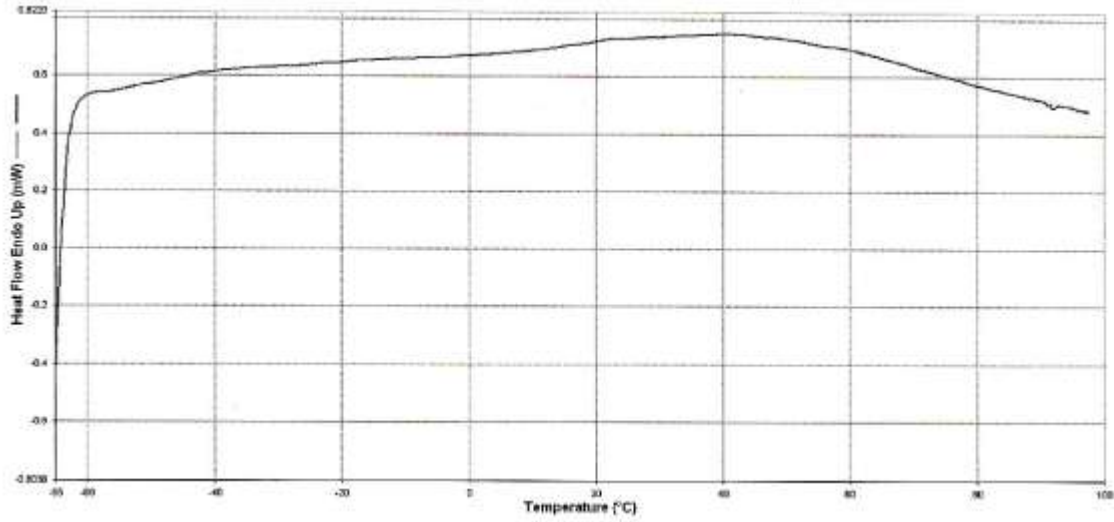


(B)

Şekil 2. PEG ve PCL homopolimerlerinin DSC termogramları: (A) PEG, (B) PCL

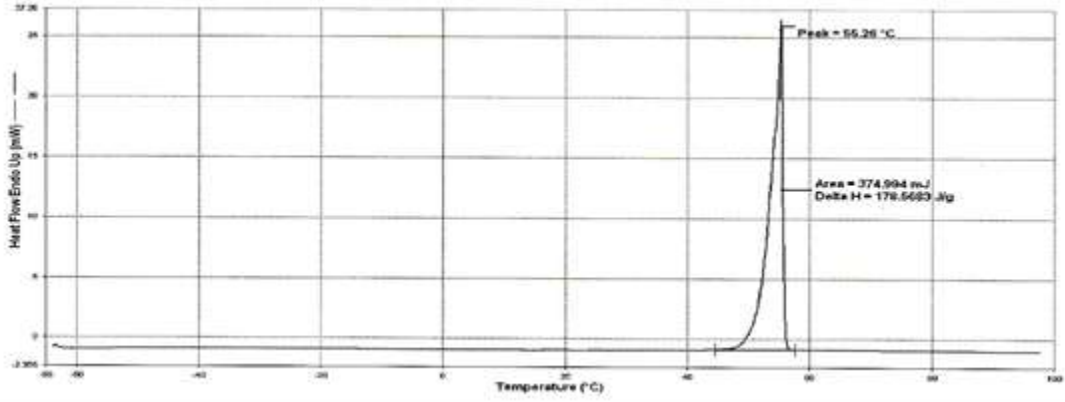


(A)

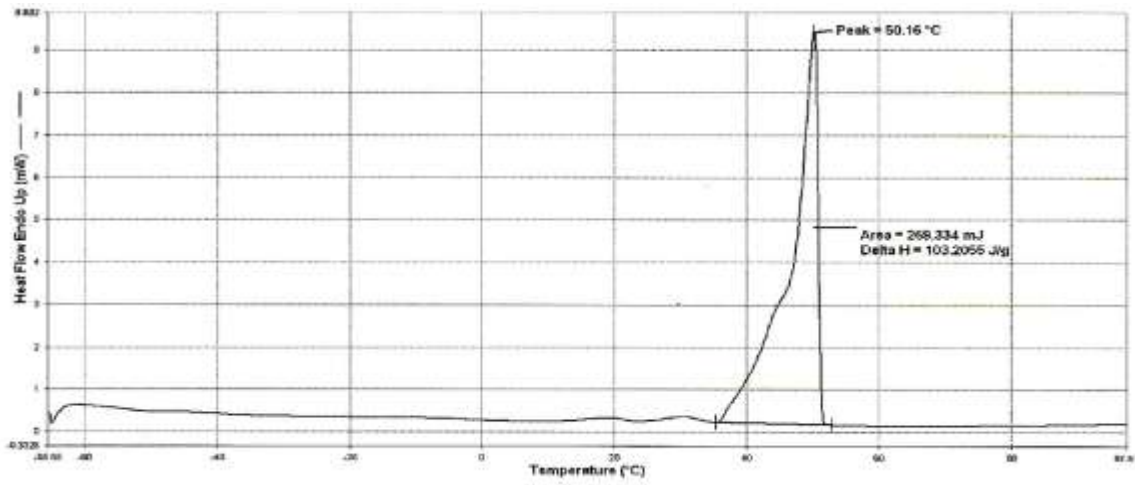


(B)

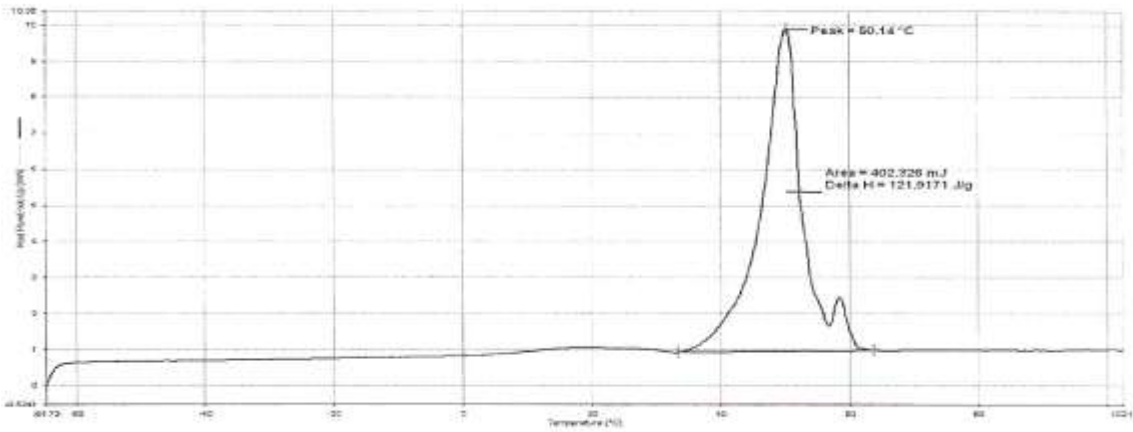
Şekil 3. PEG-PCL kopolimerlerinin DSC termogramları: (A) PEG-PCL (4 saat polimerleşme süresi ile hazırlanan), (B) PEG-PCL (6 saat polimerleşme süresi ile hazırlanan)



(A)

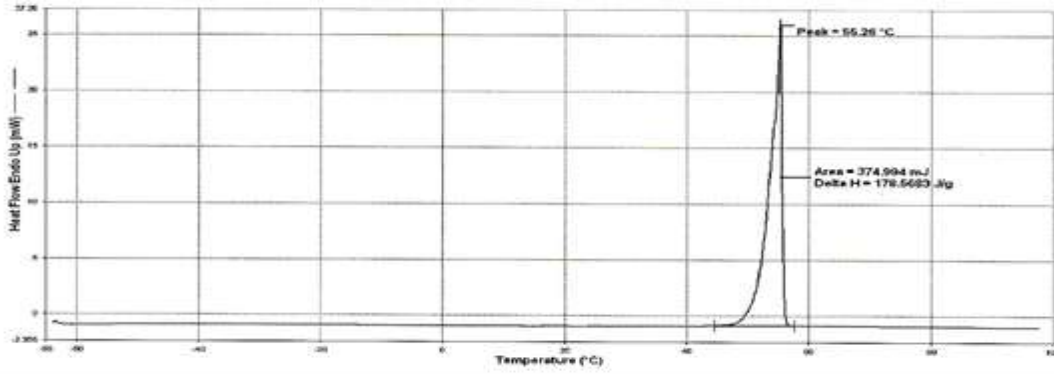


(B)

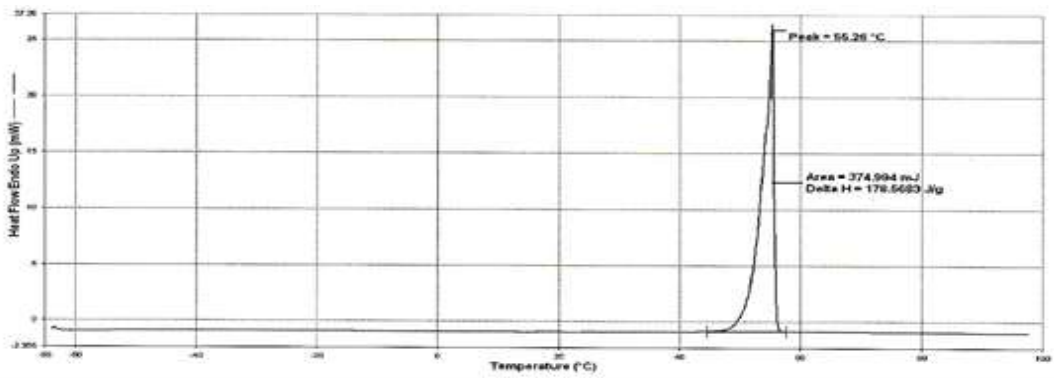


(C)

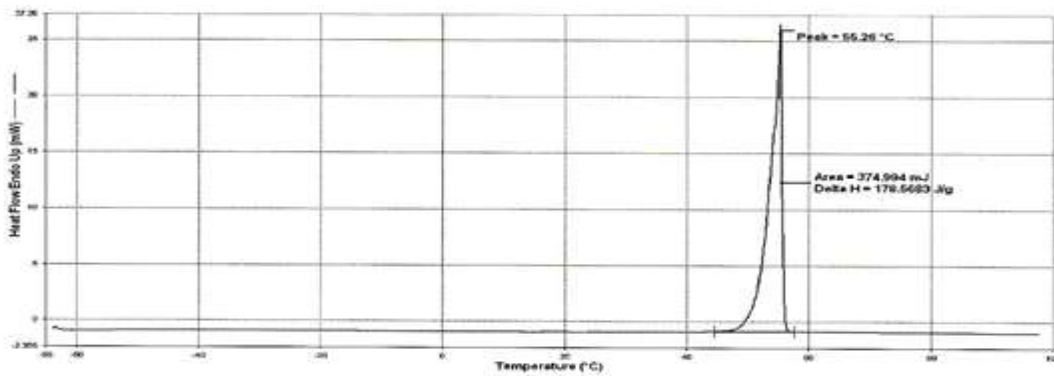
Şekil 4. Farklı mol oranları ile başlatılan MPEG-PCL kopomerlerinin DSC termogramları: (A) MPEG-PCL (1:1), (B) MPEG-PCL (1:10), (C) MPEG-PCL (1:20)



(A)



(B)

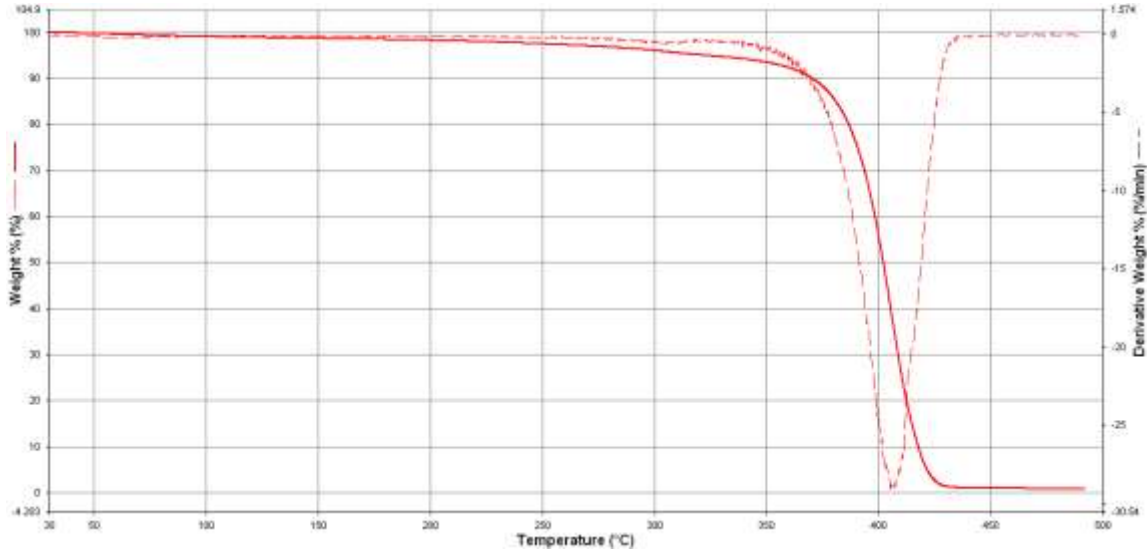


(C)

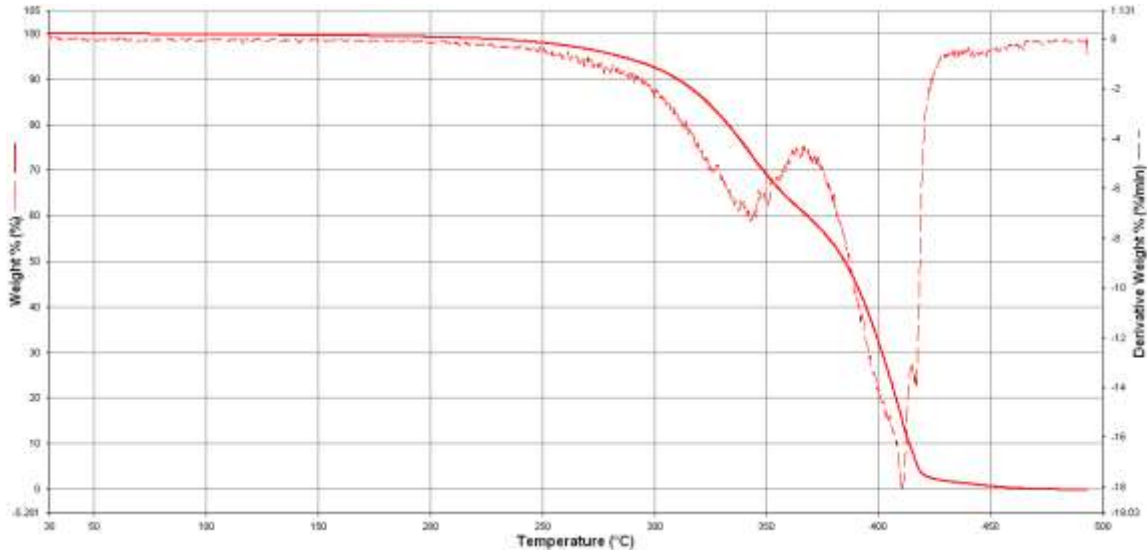
Şekil 5. Farklı mol oranları ile başlatılan PEG-PCL-PEG kopolimerinin DSC termogramları: (A) MPEG-PCL (1:20), (B) MPEG-PCL (1:100), (C) MPEG-PCL (1:200)

EK-4

TGA Termogramları

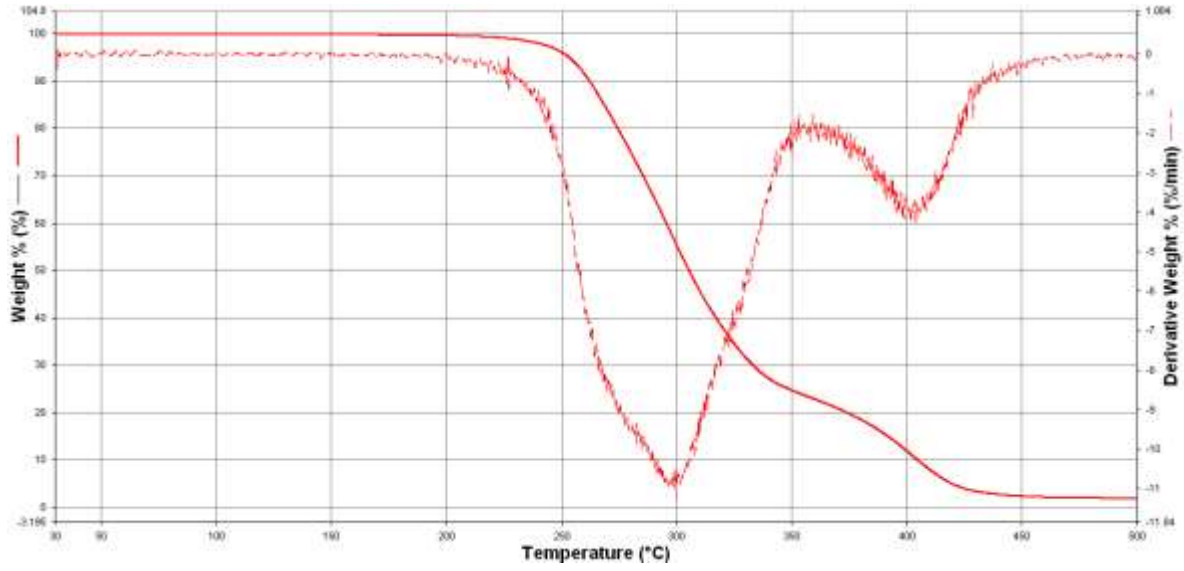


(A)

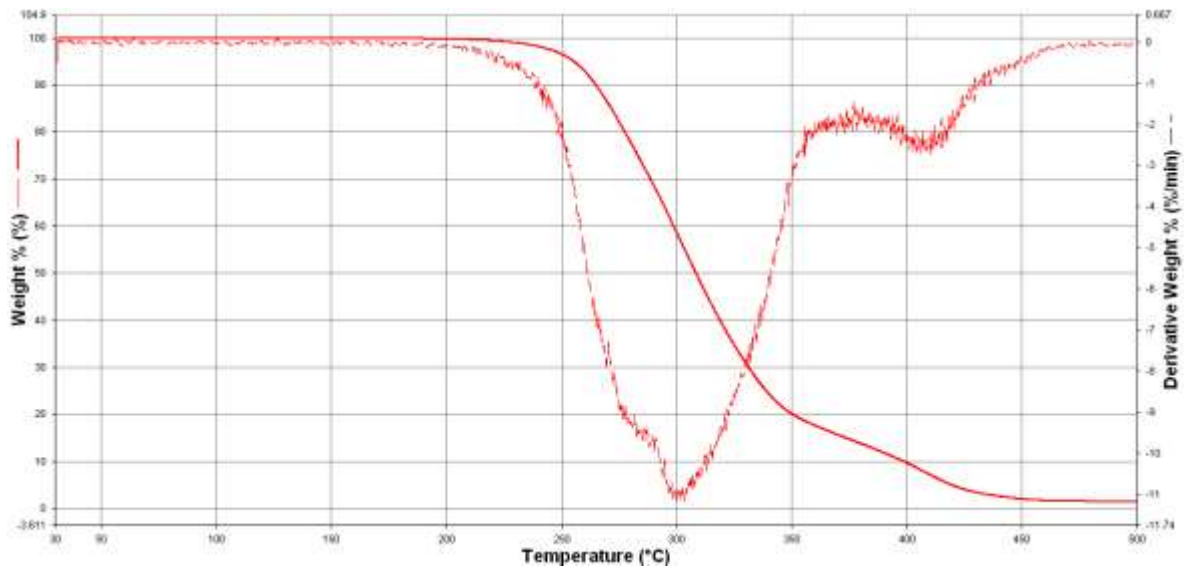


(B)

Şekil 1. PEG ve PCL homopolimerlerinin TGA termogramları: (A) PEG homopolimeri, (B) PCL homopolimeri.

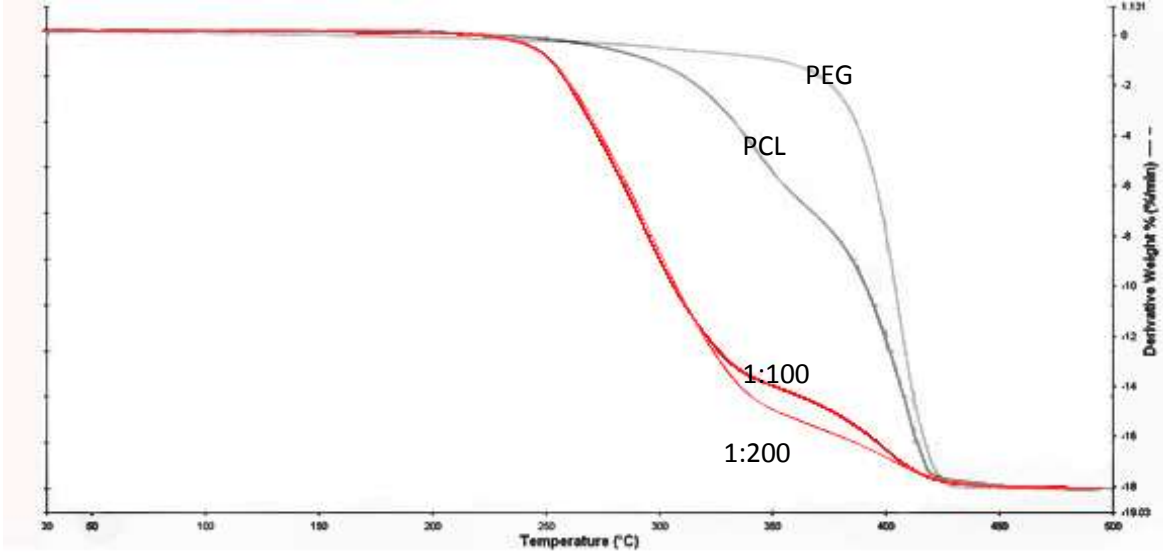


(A)



(B)

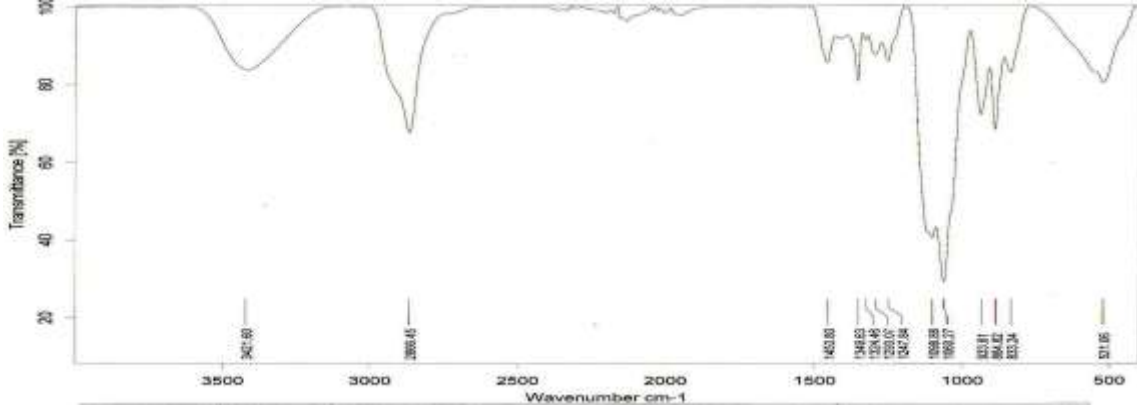
Şekil 2. Farklı monomer mol oranları ile başlatılan PEG-PCL-PEG kopolimerlerinin TGA termogramları: **(A)** 1:100 MPEG:ε-CL oranı ile sentezlenen PEG-PCL-PEG kopolimeri, **(B)** 1:200 MPEG:ε-CL oranı ile sentezlenen PEG-PCL-PEG kopolimeri.



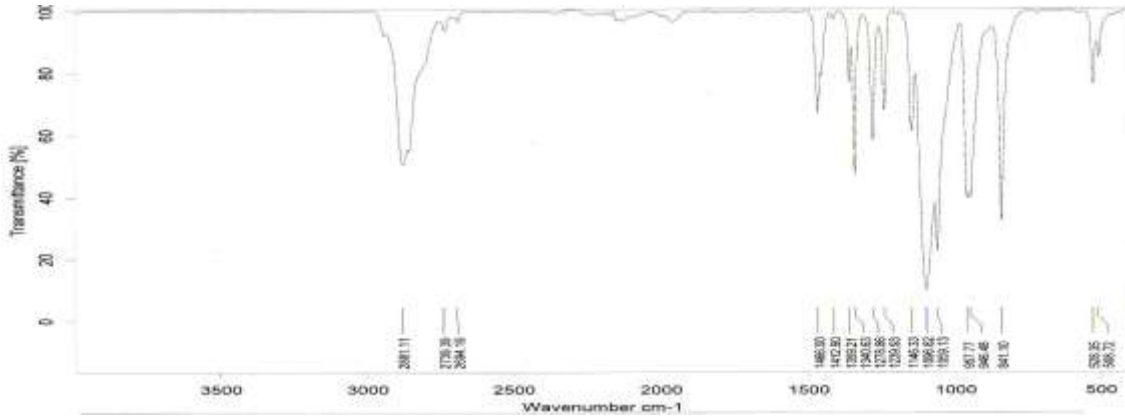
Şekil 3. PEG ve PCL homopolimerleri ve 1:100 veya 1:200 monomer mol oranları ile başlatılan PEG-PCL-PEG kopolimerlerinin diferansiyel termogram eğrileri

EK-5

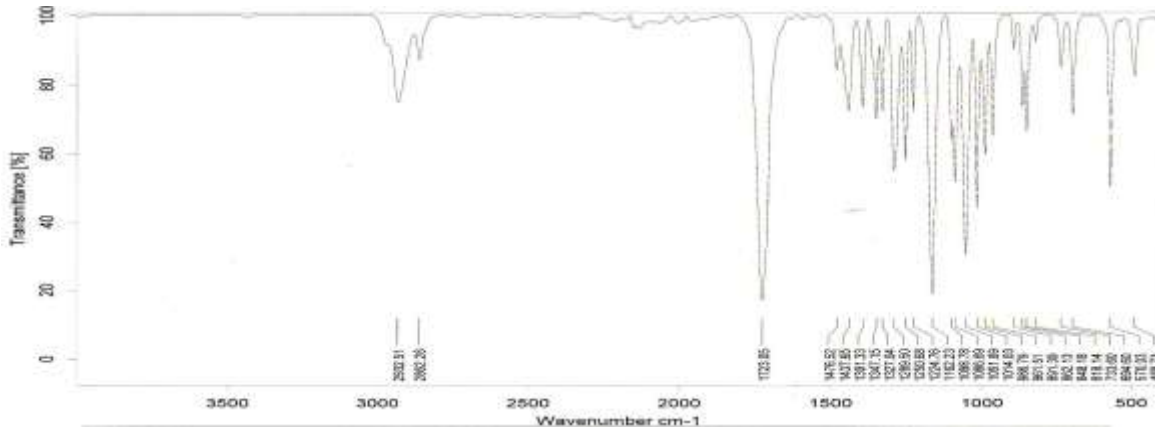
FT-IR Spektrumları



(A)

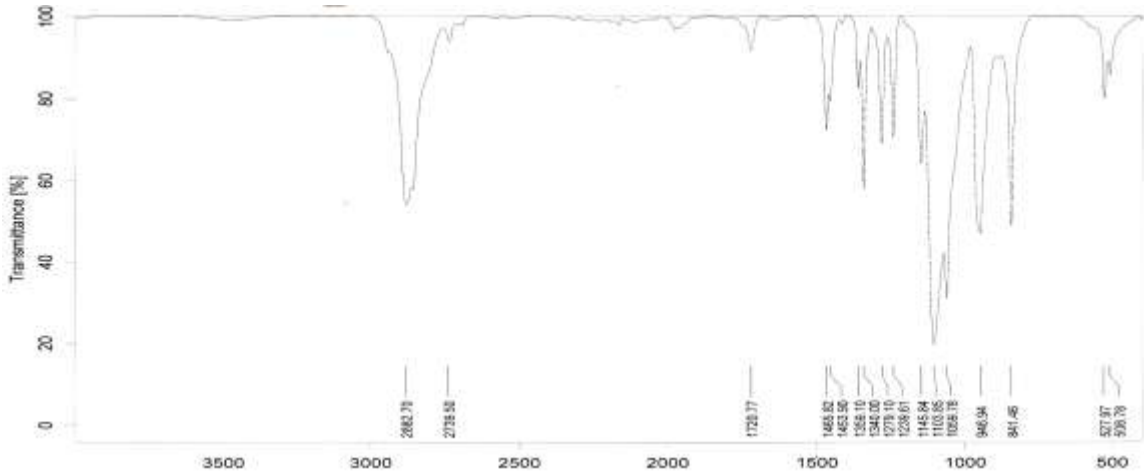


(B)

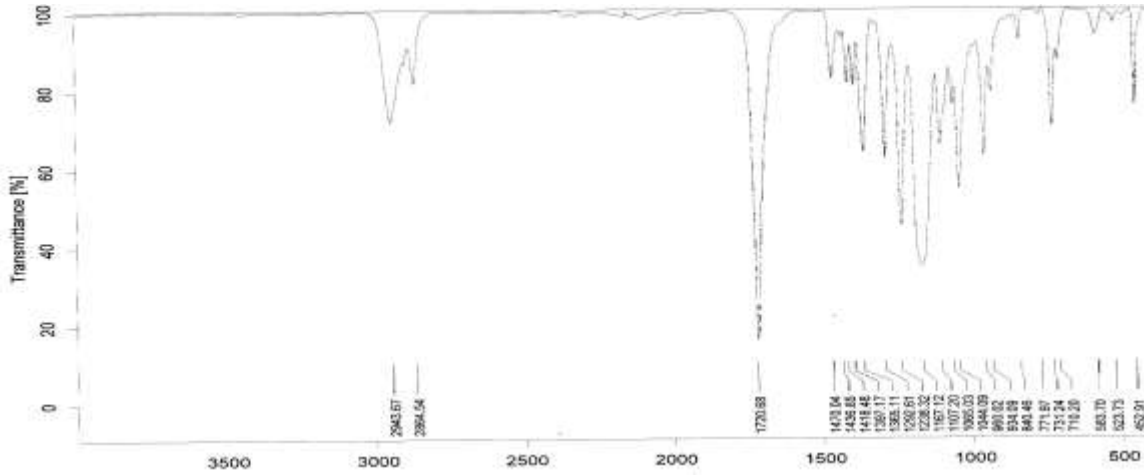


(C)

Şekil 1. FTIR spektrumları (A) PEG oligomeri, (B) MPEG oligomeri, (C) ε-kaprolakton monomeri

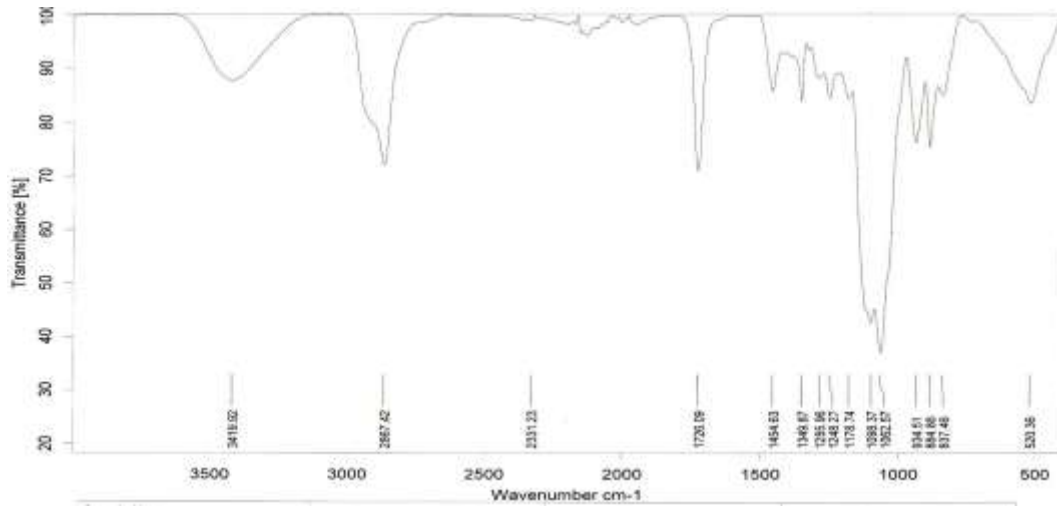


(A)

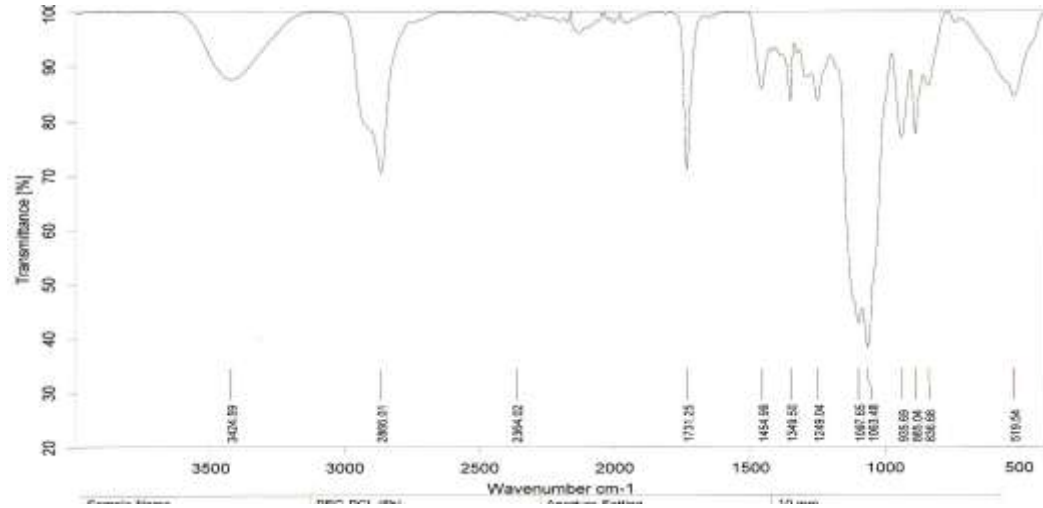


(B)

Şekil 2. Sentezlenen homopolimerlerin FT-IR spektrumları (A) PEG, (B) PCL

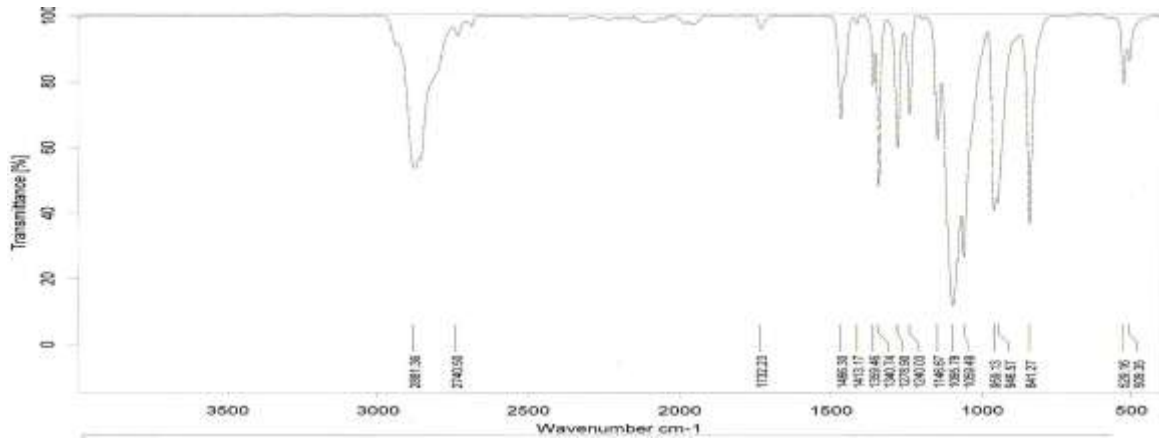


(A)

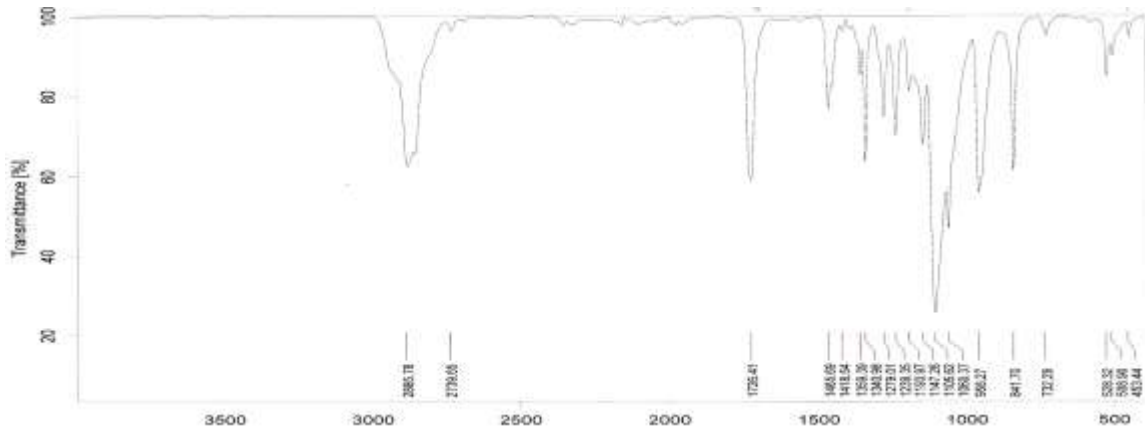


(B)

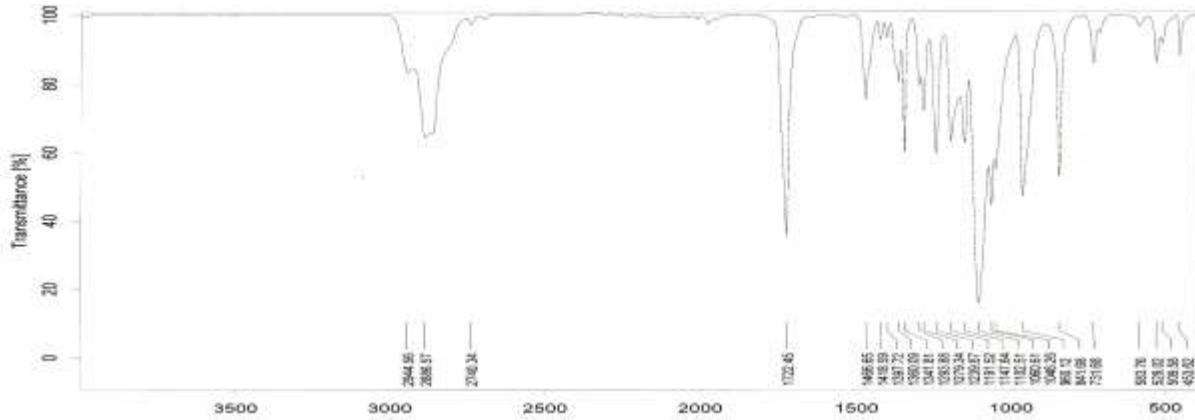
Şekil 3. Sentezlenen PEG-PCL diblok kopolimerlerinin FTIR spektrumları (A) PEG-PCL (4 saat polimerleşme süresi ile hazırlanan), (B) PEG-PCL (6 saat polimerleşme süresi ile hazırlanan)



(A)

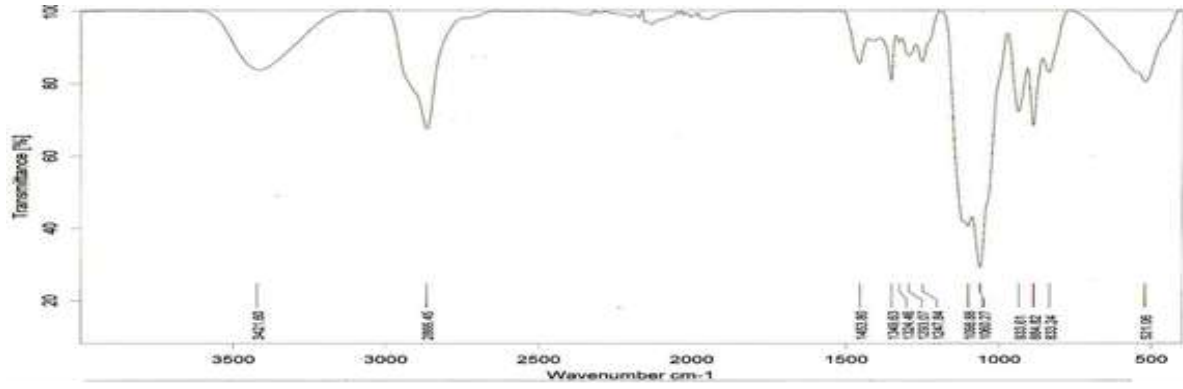


(B)

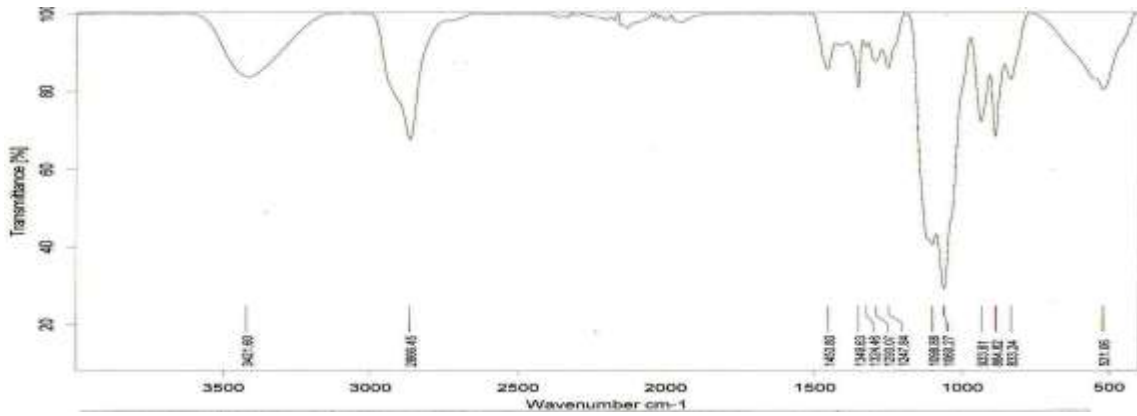


(C)

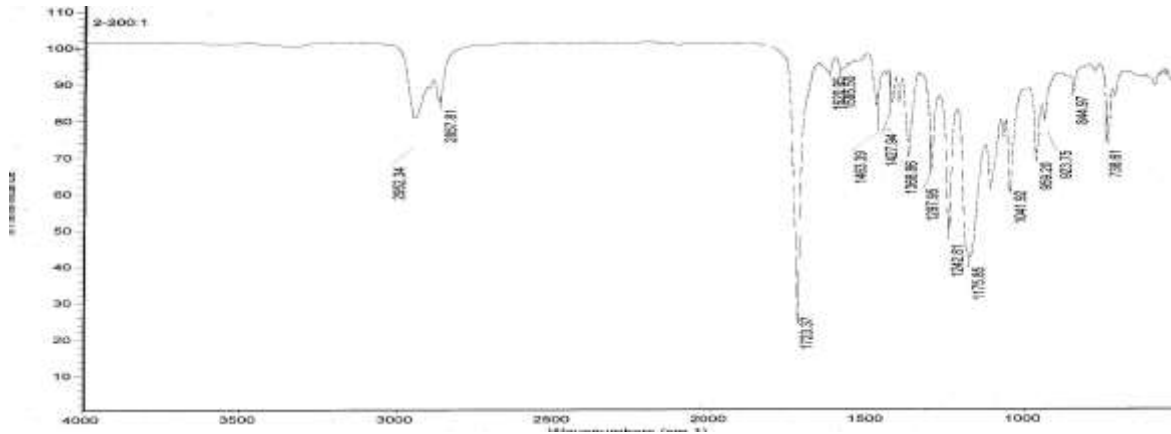
Şekil 4. Farklı mol oranları ile başlatılan MPEG-PCL diblok kopolimerlerinin FTIR spektrumları
 (A) MPEG-PCL (1:1), (B) MPEG-PCL (1:10), (C) MPEG-PCL (1:20)



(A)



(B)

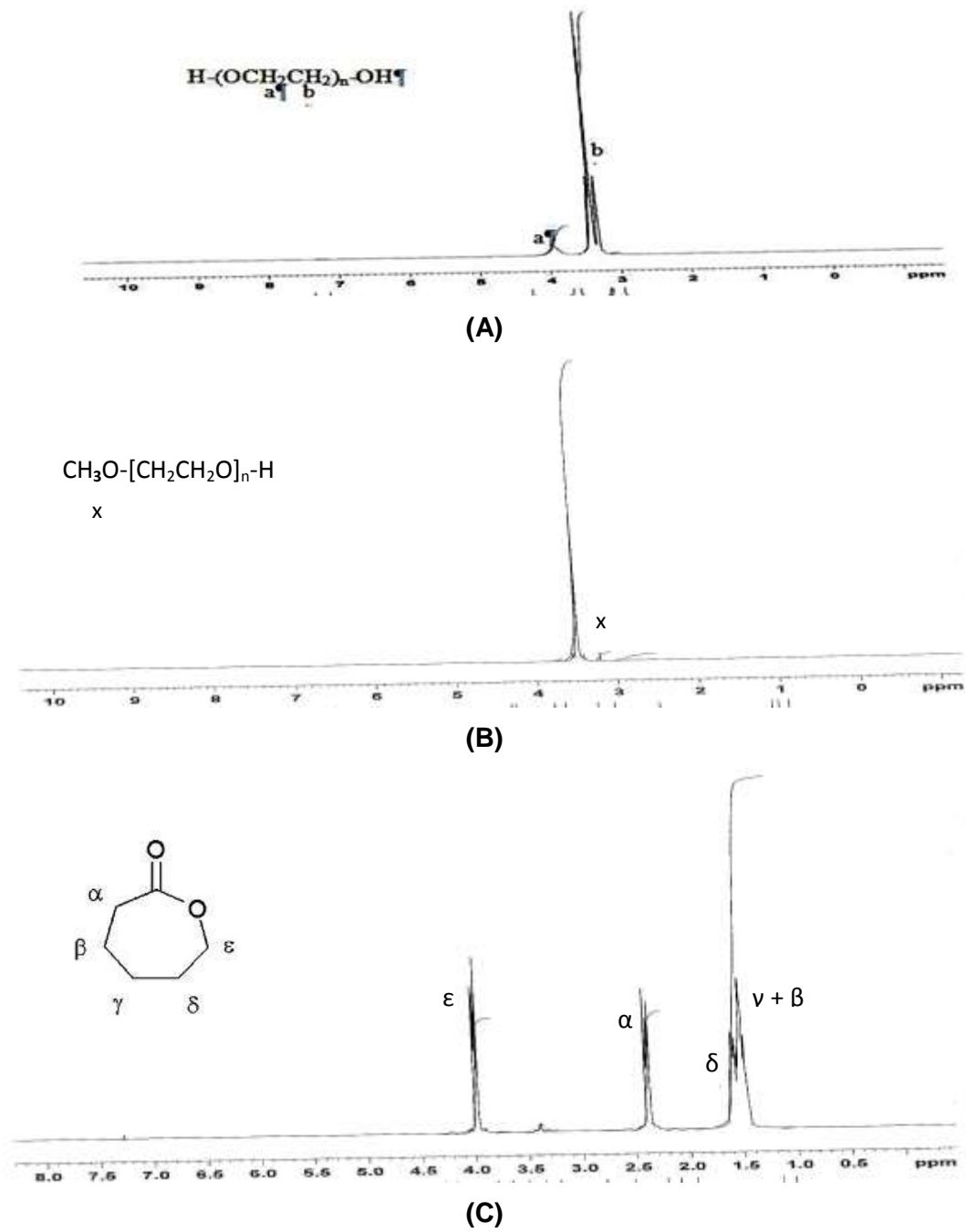


(C)

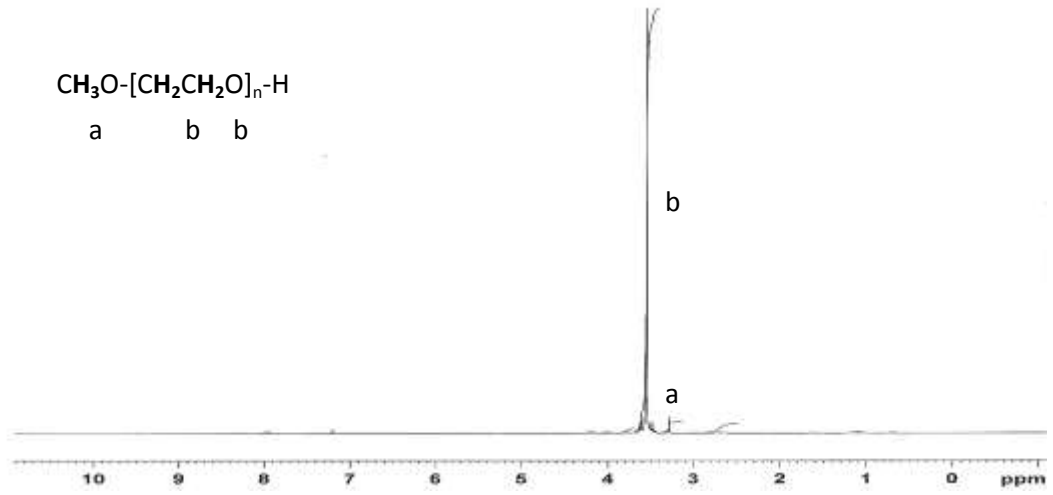
Şekil 5. Farklı monomer mol oranları ile başlatılan PEG-PCL-PEG kopolimerlerinin FTIR spektrumları: **(A)** 1:20 MPEG:ε-CL oranı ile sentezlenen PEG-PCL-PEG kopolimeri; **(B)** 1:100 MPEG:ε-CL oranı ile sentezlenen PEG-PCL-PEG kopolimeri, **(C)** 1:200 MPEG:ε-CL oranı ile sentezlenen PEG-PCL-PEG kopolimeri

EK-6

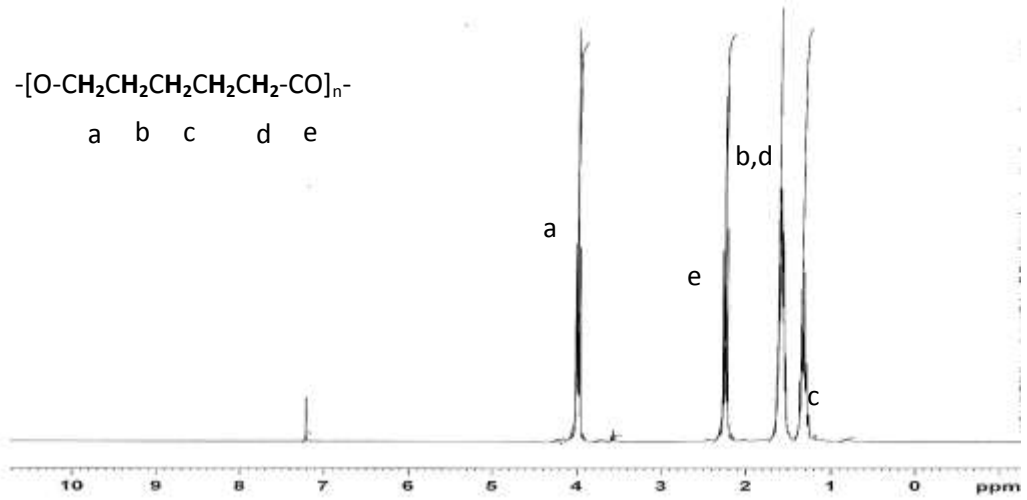
NMR Spektrumları



Şekil 1. NMR spektrumları: (A) PEG oligomeri, (B) MPEG oligomeri, (C) ϵ -kapolakton monomeri

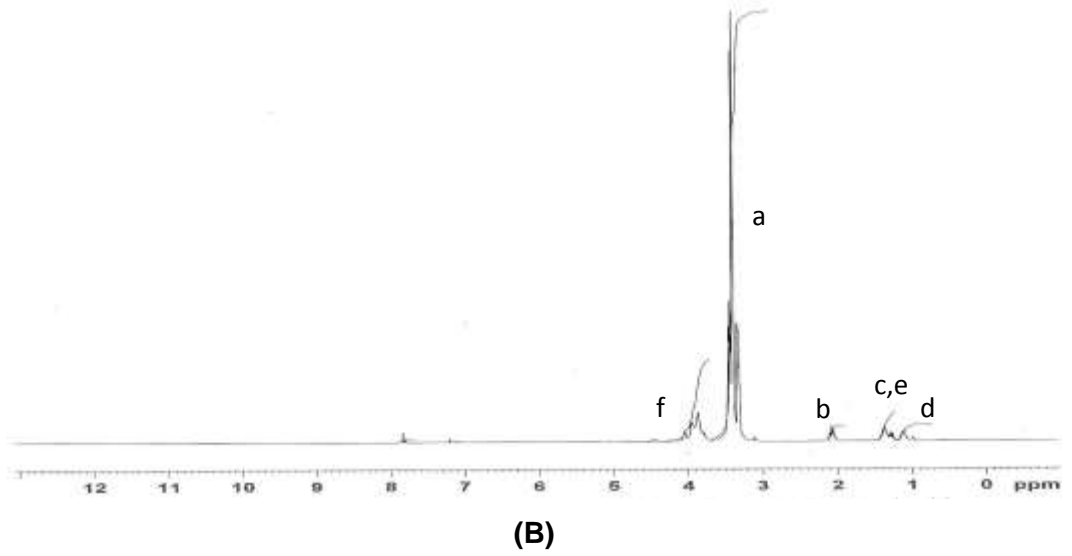
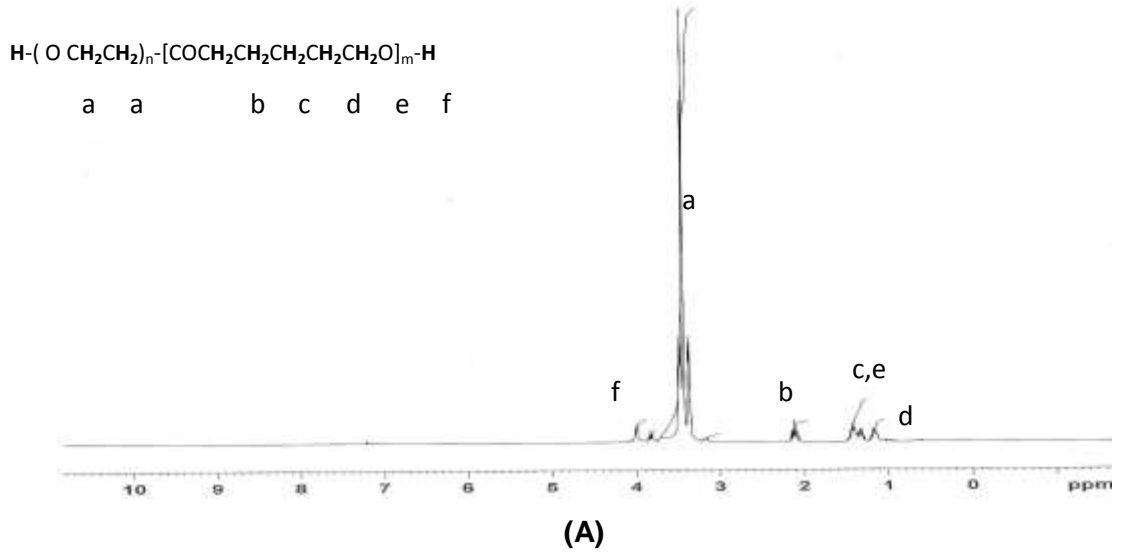


(A)

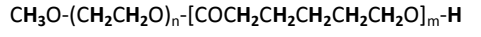


(B)

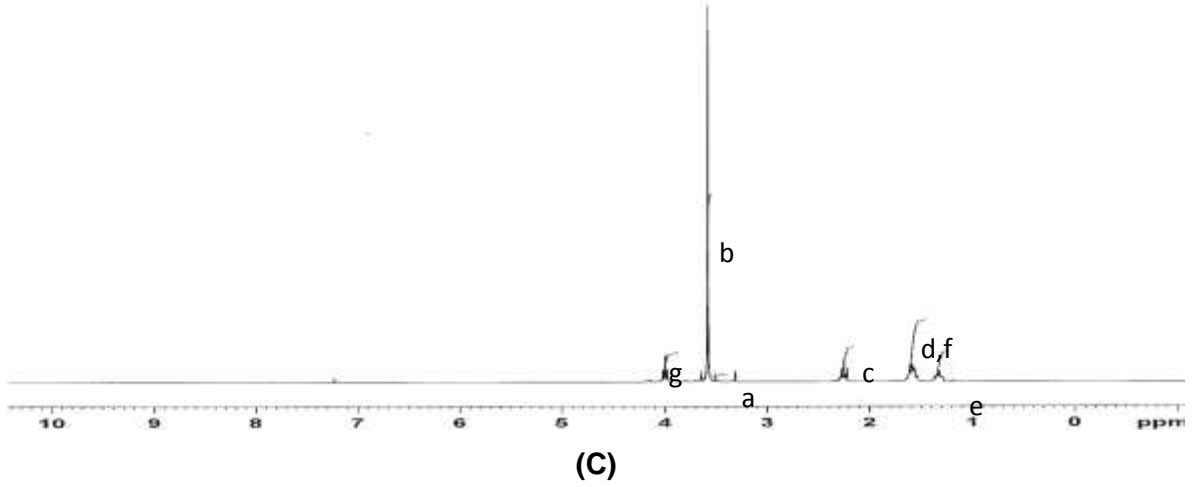
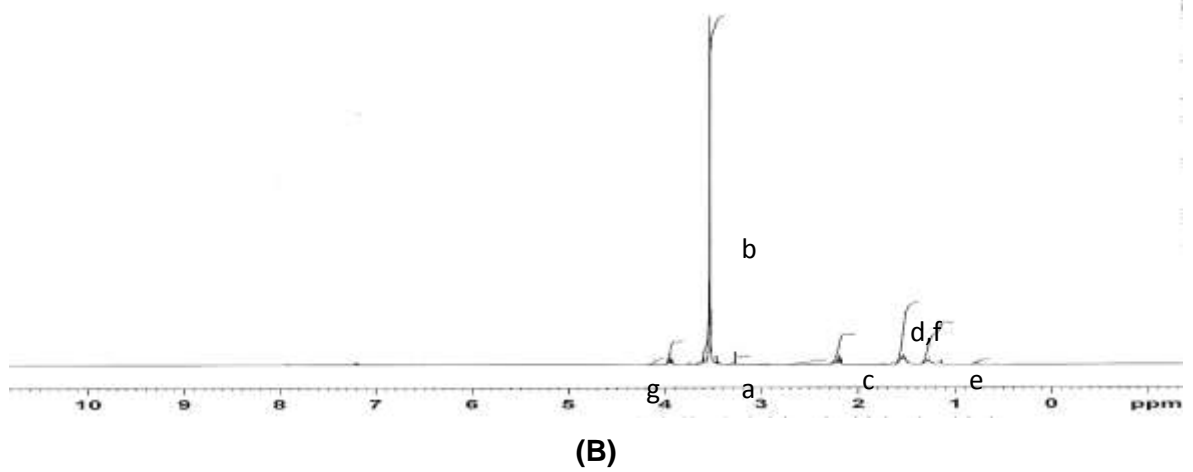
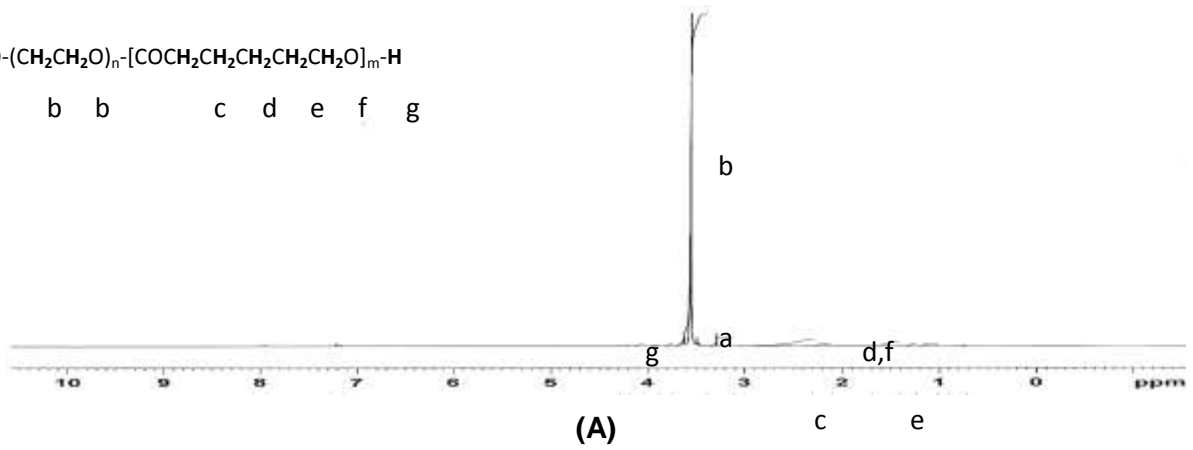
Şekil 2. Sentezlenen homopolimerlerin NMR spektrumları (A) PEG, (B) PCL



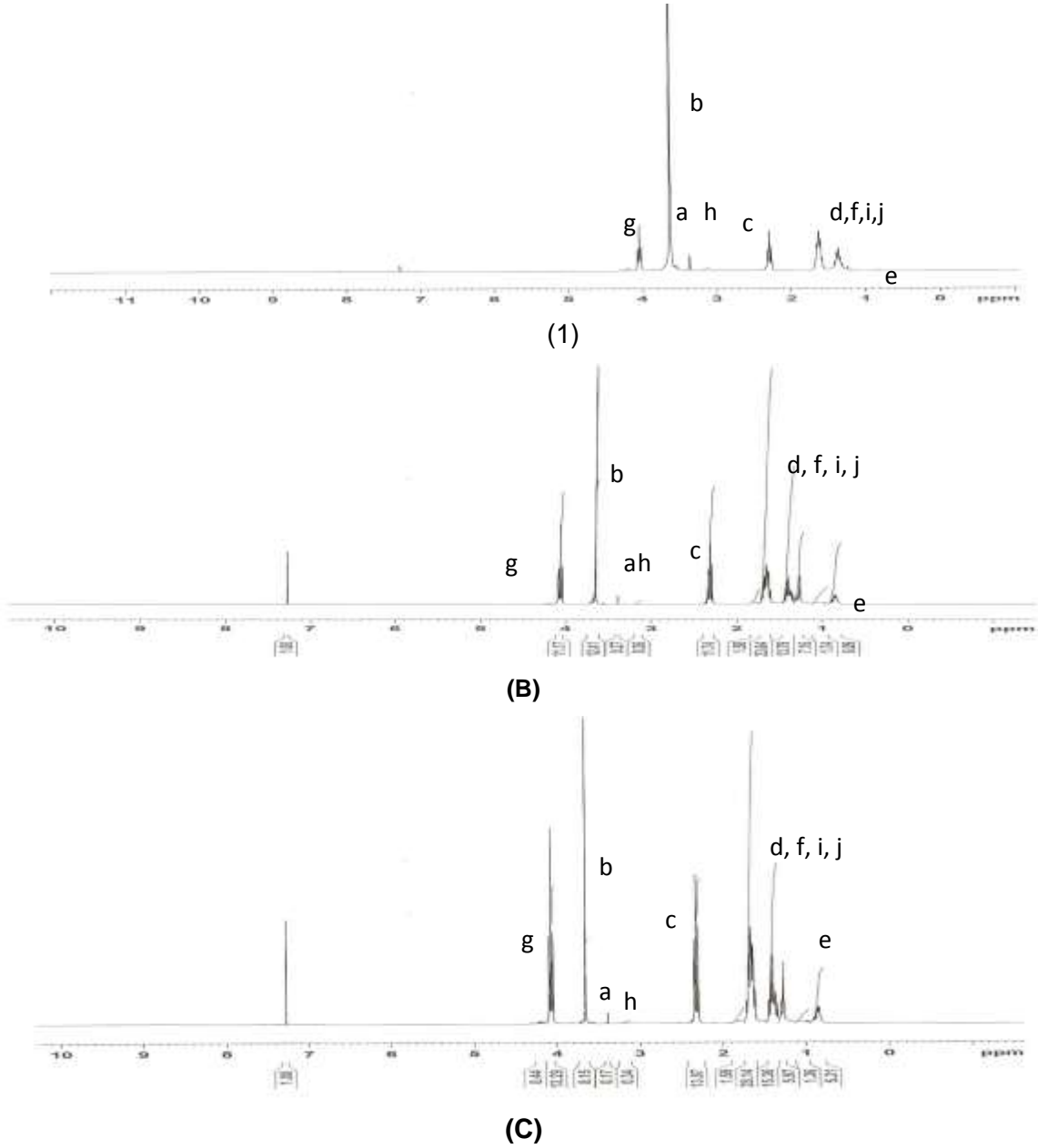
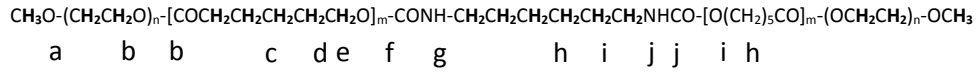
Şekil 3. Sentezlenen PEG-PCL kopolimerlerinin NMR spektrumları **(A)** PEG-PCL (4 saat polimerleşme süresi ile hazırlanan), **(B)** PEG-PCL (6 saat polimerleşme süresi ile hazırlanan)



a b b c d e f g



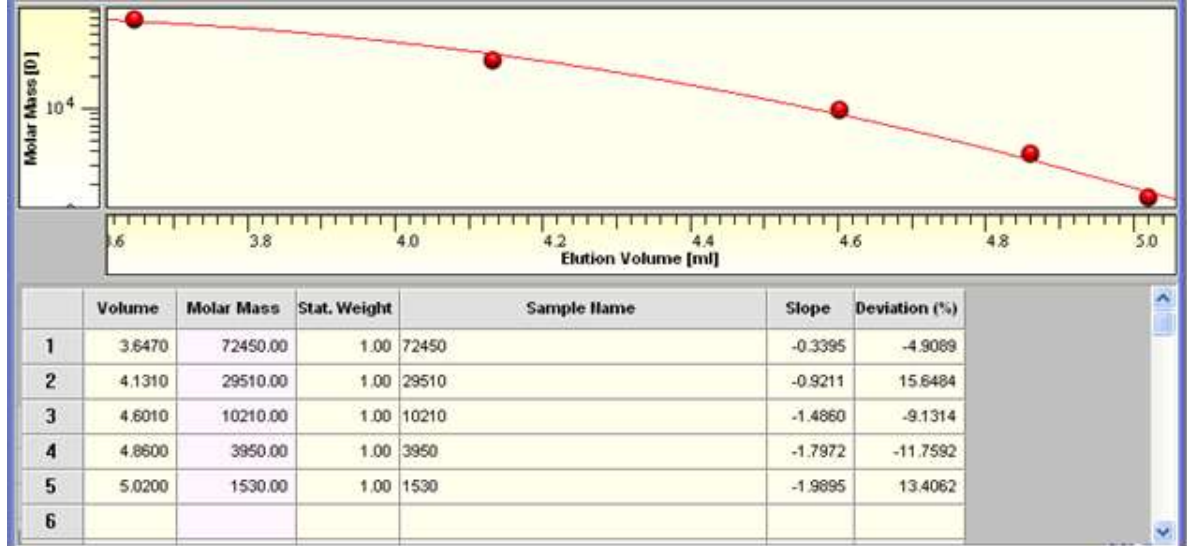
Şekil 4. Farklı mol oranları ile başlatılan MPEG-PCL kopolymerlerinin NMR spektrumları (A) MPEG-PCL (1:1), (B) MPEG-PCL (1:10), (C) MPEG-PCL (1:20)



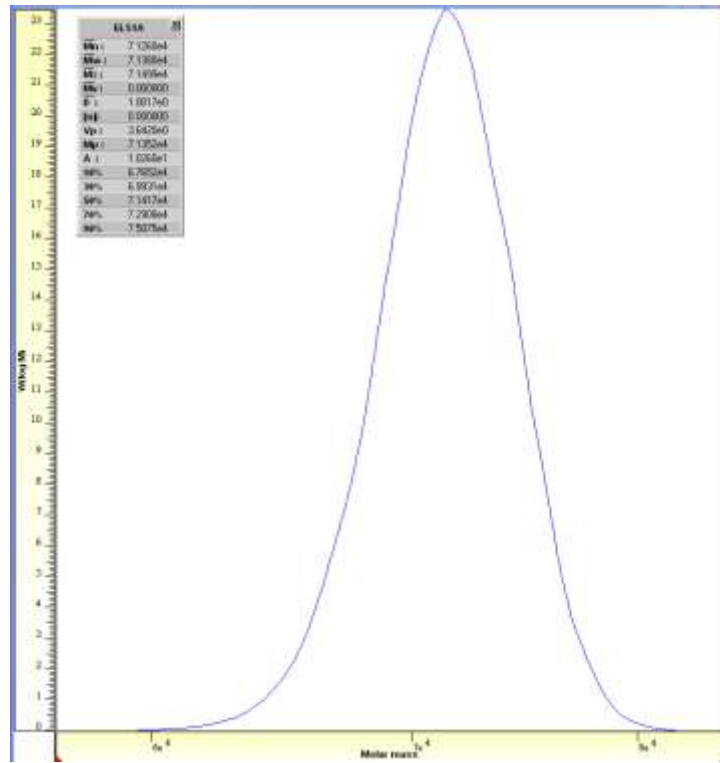
Şekil 5. Farklı monomer mol oranları ile başlatılan PEG-PCL-PEG kopolimerlerinin NMR spektrumları: **(A)** 1:20 MPEG:ε-CL oranı ile sentezlenen PEG-PCL-PEG kopolimeri, **(B)** 1:100 MPEG:ε-CL oranı ile sentezlenen PEG-PCL-PEG kopolimeri, **(C)** 1:200 MPEG:ε-CL oranı ile sentezlenen PEG-PCL-PEG kopolimeri

EK-7

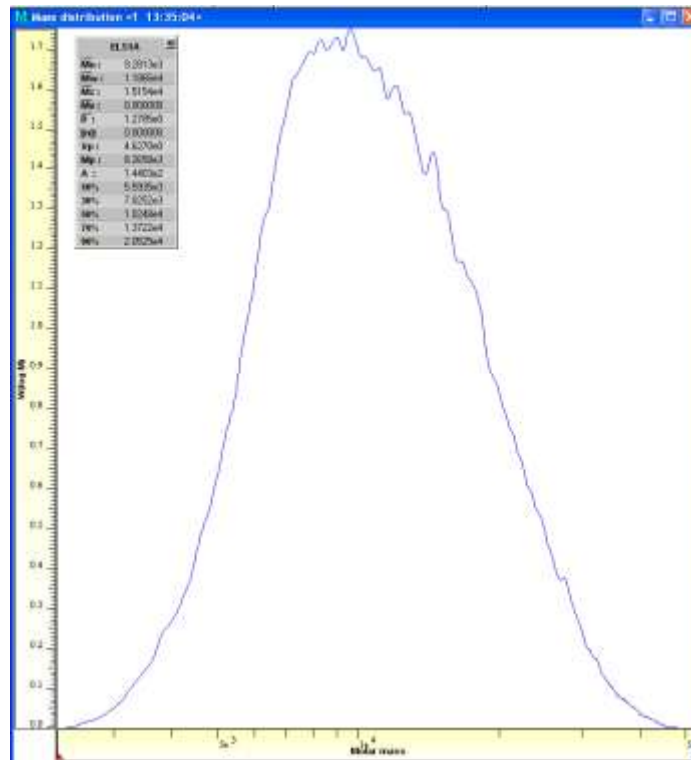
GPC Kromatogramları



Şekil 1. GPC analizi için kullanılan polistiren standartlardan oluşturulmuş kalibrasyon eğrisi

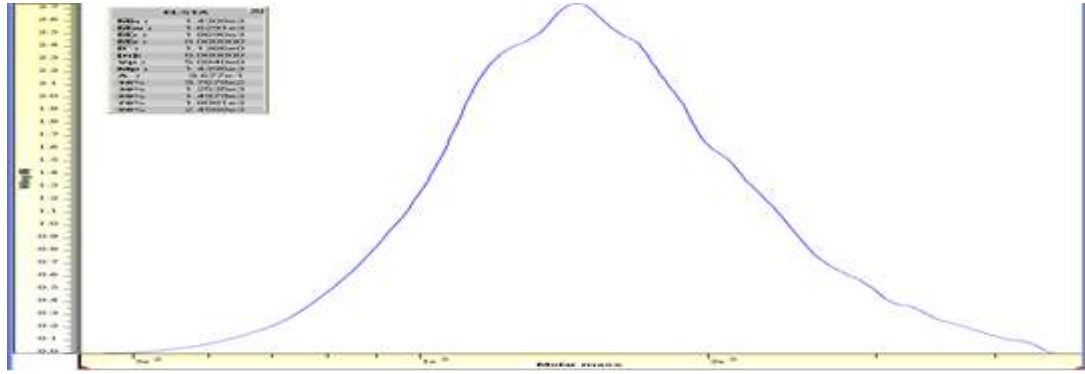


(A)

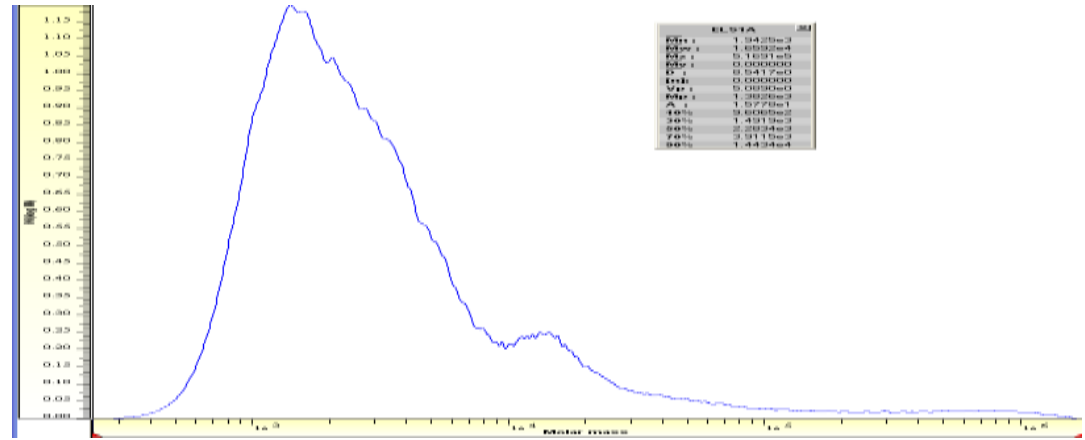


(B)

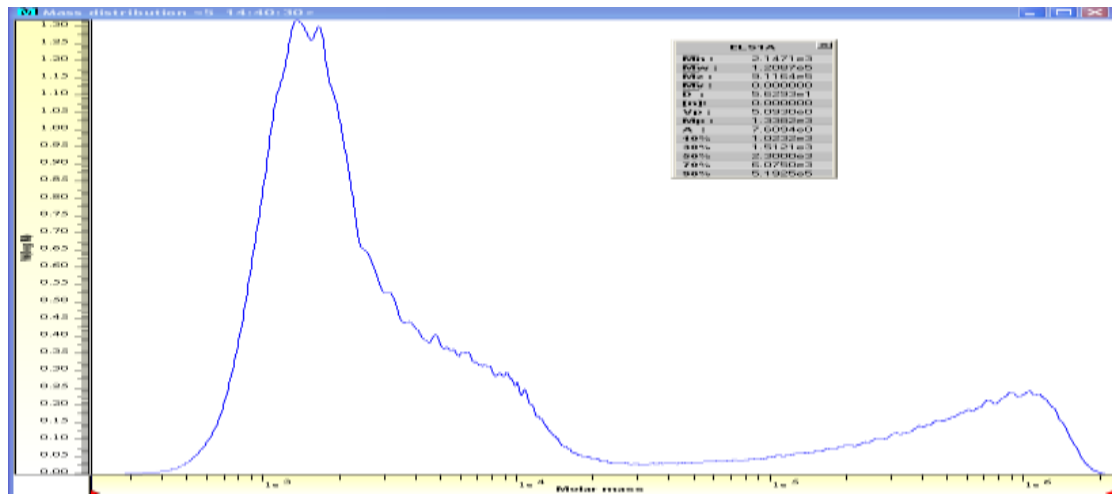
Şekil 2. Sentezlenen homopolimerlerin GPC kromatogramları (A) PEG, (B) PCL



(A)

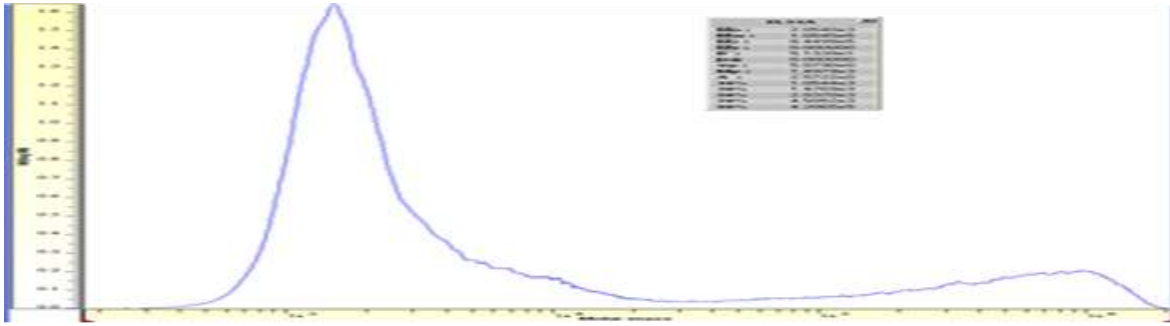


(B)

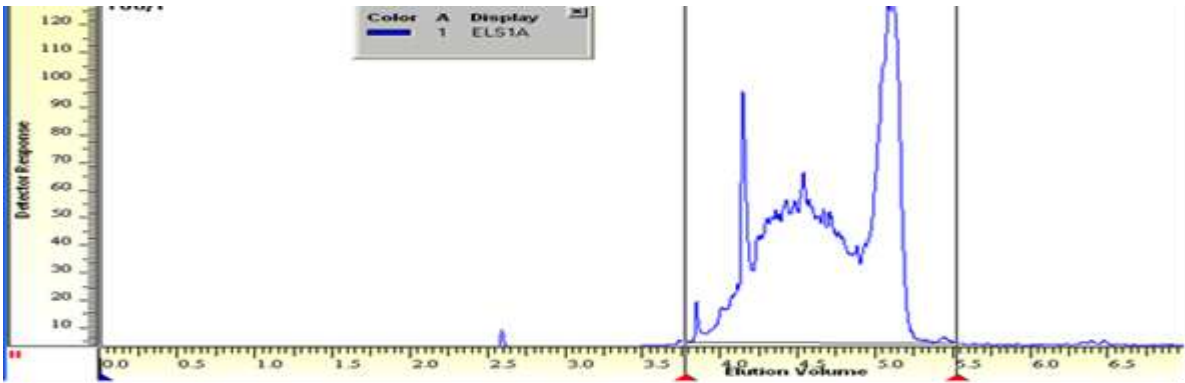


(C)

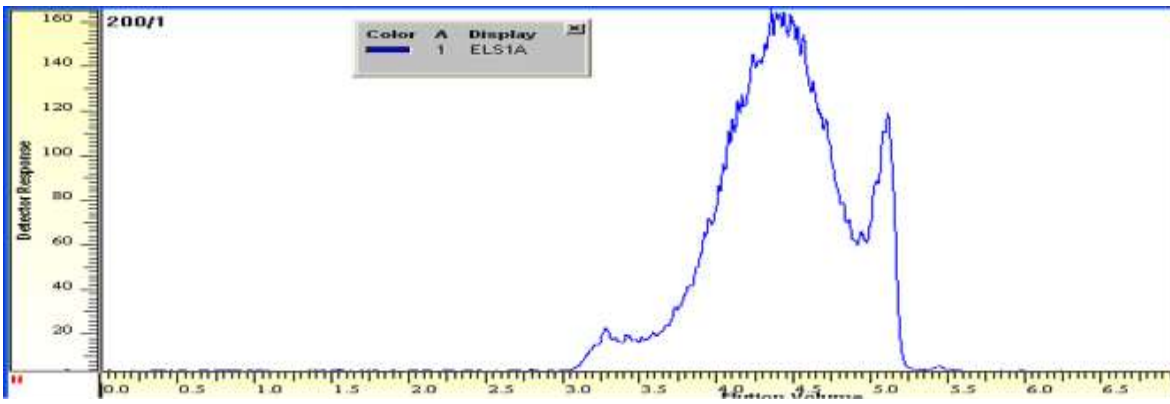
Şekil 3. Farklı monomer mol oranları ile başlatılan MPEG-PCL kopolimerlerinin GPC kromatogramları (A) MPEG-PCL (1:1), (B) MPEG-PCL (1:10), (C) MPEG-PCL (1:20)



(A)



(B)



(C)

Şekil 4. Farklı monomer mol oranlarına sahip PEG-PCL-PEG kopolimerlerin GPC kromatogramları **(A)** 1:20 MPEG:ε-CL oranı ile sentezlenen PEG-PCL-PEG kopolimeri, **(B)** 1:100 MPEG:ε-CL oranı ile sentezlenen PEG-PCL-PEG kopolimeri, **(C)** 1:200 MPEG:ε-CL oranı ile sentezlenen PEG-PCL-PEG kopolimeri.