

**Matriks Metalloproteinaz İnhibitörü Etkili İlaç
Taşıyan Salım Sisteminin Kıkırdak Hastalıkları
Tedavisindeki Etkinliğinin İncelenmesi**

Proje No: 109T098

Y.Doç.Dr. Dilek KESKİN
Doç.Dr. Ayşen TEZCANER

AĞUSTOS 2011

ANKARA

Önsöz

Projede klinik olarak kullanımı yaygın bir ilaç olan doksisisiklinin antibiyotik özelliğinin yanında sahip olduğu matriks metalloproteinaz enzimlerini engelleme fonksiyonu kullanılarak osteoartrit hastalığının tedavisine yönelik yeni bir yaklaşım geliştirilmiştir. Kıkırdak hasarlarındaki temel sorun olan matriks yıkımını engellemeye yönelik bu yöntemde, antibiyotik özelliği ile ilacın diğer dokularda yan etki oluşturmaması ve daha etkin olabileceği yüksek dozda kullanımının mümkün olması için doksisisiklinin biyouyumlu, polimerik bir taşıyıcıda lokal olarak osteoartritli eklem uygulanabileceği mikroküre formunda kontrollü ilaç salım sistemi hazırlanmıştır. Ayrıca bu sistemin tedavideki etkinliğini arttırmak için ikinci bir grup mikroküre doksisisiklinin kondroitin sülfatla birlikte yüklenmesi ile oluşturulmuştur. Mikrokürelerin hazırlanması, in situ özelliklerinin belirlenmesi ve in vitro üç boyutlu osteoartrit modelinde biyouyumluluk ve biyoetkinliklerinin incelenmesi temelde ODTÜ Mühendislik Bilimleri Bölümü, Biyomalzeme ve Doku Mühendisliği Laboratuvar'ında ve kısmen ODTÜ Merkez Laboratuvar'ında yapılmıştır. Malzemelerin canlı sistemde osteoartrit modelinde uygulanması ODTÜ Mühendislik Bilimleri Bölümü Deney Hayvanları Laboratuvar'ında gerçekleştirilmiştir. Uygulama sonrası tedavi etkinliğine yönelik histolojik analizler Hacettepe Üniversitesi Histoloji ve Embriyoloji AD'da, radyolojik incelemeler ODTÜ Sağlık ve Rehberlik Merkezinde, Biyomekanik analizler ise ODTÜ Teknokent'te bulunan FAMEMED firmasında yapılmıştır. Projenin tamamı TÜBİTAK-TBAG tarafından desteklenmiştir.

İçindekiler

Şekillerin Listesi.....	5
Tabloların Listesi.....	8
Özet.....	9
Giriş.....	11
1. Genel bilgiler.....	13
2. Gereç ve Yöntemler.....	20
2.1. Osteoartrit Tedavisine Yönelik Biyoaktif Ajan Taşıyan Mikrokürelerin Hazırlanması ve Özelliklerinin <i>In Situ</i> Ortamda İncelenmesi.....	20
2.1.1. Doksisisiklin Yüklü Mikrokürelerin Hazırlanması.....	20
2.1.2. Doksisisiklin-Kondroitin Sülfat (D-CS) Kombinasyonu Yüklü Mikrokürelerin Hazırlanması.....	20
2.1.3. Mikrokürelere Hapsolan İlaç Miktarının Belirlenmesi.....	21
2.1.4. Doksisisiklin veya Doksisisiklin-Kondroitin Sülfat Kombinasyonu Yüklü Mikrokürelerin İlaç Salım Profilinin Belirlenmesi.....	21
2.1.5. Mikrokürelerin Parçacık Boyut Analizleri.....	22
2.1.6. Mikrokürelerin Taramalı Elektron Mikroskopisi ile Mikrokürelerin Yüzey ve Şekil Analizleri.....	22
2.1.7. Mikrokürelerin ve Doksisisiklin Biyouyumlulukların İncelenmesi.....	22
2.1.8. Kondroitin Sülfat-Doksisisiklin Kombinasyonu Yüklü Mikrokürelerin Gama Işınlarıyla Sterilize Edilmesi.....	23
2.2. Osteoartrit Tedavisine Yönelik Biyoaktif Ajan Taşıyan Mikrokürelerin <i>In Vitro</i> Ortamda Değerlendirilmesi.....	23
2.2.1. Sağlıklı ve Osteoartritli Tavşandan Primer Kıkırdak Hücresi İzolasyonu ve Kültürü.....	23
2.2.2. İki Boyutlu <i>In Vitro</i> Osteoartrit Modelinin Oluşturulması.....	24
2.2.3. Üç Boyutlu <i>In Vitro</i> Osteoartrit Modelinin Oluşturulması.....	24
2.2.4. İki ve Üç Boyutlu Osteoartrit Modellerinde Hücre Canlılığının Tayini.....	26
2.2.5. İki ve Üç Boyutlu Osteoartrit Modellerinde Kollajen Miktarlarındaki Değişimlerin Belirlenmesi.....	27
2.2.6. İki ve Üç Boyutlu Osteoartrit Modellerinde Glikozaminoglikan Miktarlarındaki Değişimlerin Belirlenmesi.....	27
2.2.7. İki ve Üç Boyutlu Osteoartrit Modellerinde Hücrelerin DNA Miktarlarının Tayini.....	28
2.2.8. <i>In Vitro</i> Osteoartrit Modelinde Matriks Metalloproteinaz-13 (MMP-13) Miktarı/Aktivitesinin Ölçülmesi.....	28
2.2.9. <i>In Vitro</i> Deneyle Salınan Doksisisiklin Miktarının Ölçülmesi.....	28
2.3. <i>In Vivo</i> Osteoartrit Modelinin Oluşturulması ve Değerlendirilmesi için Yapılan Test ve Ölçümler.....	28
2.3.1. Radyolojik Değerlendirmeler.....	29

2.3.2. Histolojik İncelemede Kullanılan Gereç ve Yöntemler	30
2.3.3. Biyomekanik Testler	33
2.4. İstatiksel Analizler	34
2.4.1. İn Vitro Uygulama Sonuçlarının Değerlendirilmesinde Kullanılan İstatistiksel Analizler	34
2.4.2. İn Vivo Uygulama Sonuçlarının Değerlendirilmesinde Kullanılan İstatistiksel Analizler	34
3. Bulgular ve Tartışma	36
3.1. In situ Deneylerin Bulguları	36
3.1.1. Kondroitin Sülfat-Doksisiklin Kombinasyonu Yüklü Mikrokürelerin Yüzey Özellikleri ve Morfolojileri	36
3.1.2. Kondroitin Sülfat-Doksisiklin Kombinasyonu Yüklü Mikrokürelerin Boyut Dağılımları	39
3.1.3. Kondroitin Sülfat-Doksisiklin Kombinasyonu Yüklü Mikrokürelere Hapsolan İlaç Miktarının Belirlenmesi	40
3.1.4. Kondroitin Sülfat-Doksisiklin Kombinasyonu Yüklü Mikrokürelerin Salım Profillerinin İncelenmesi	42
3.1.5. Mikrokürelerin Gama Işınlarıyla Sterilize Edilmesi	45
3.2. İn vitro Hücre Kültürü Deneylerinin Sonuçları	46
3.2.1. İn Vitro Biyoyumlulukları Sonuçları	46
3.2.2. İn Vitro Osteoartrit Modelinin Analiz Sonuçları	48
3.2.2.1. Primer Osteoartrit Kıkırdak Hücre Kültürü	48
3.2.2.2. İn Vitro Osteoartrit Modelinin Oluşturulması	50
3.2.2.3. Glikozaminoglikan (GAG) Miktarları ile İlgili Sonuçlar	50
3.2.2.4. Kollajen Miktarları ile İlgili Sonuçlar	53
3.2.2.5. İn Vitro Osteoartrit Modelinde MMP-13 Düzeylerinin Karşılaştırılması	56
3.2.2.6. İn Vitro Deneylerde Doksisiklin Salım Sonuçları	58
3.3. In Vivo Deney Sonuçları	59
3.3.1. In Vivo Deneysel Tavşan Osteoartrit Model Oluşturulması	59
3.3.2. Mikroküre Uygulanmış Osteoartritli Eklemlerde İyileşmenin Değerlendirilmesi ..	61
3.3.2.1. Radyolojik Değerlendirmeler	61
3.3.2.2. Biyomekanik Değerlendirmeler	66
3.3.2.3. Histolojik Değerlendirmeler	69
4. SONUÇLAR ve ÖNERİLER	76
KAYNAKLAR	78

Şekillerin Listesi

Şekil 1. Doksisisiklin hyclate'in kimyasal yapısı (SigmaAldrich)	16
Şekil 2. Siklik kaprolakton ve onun homopolimeri olan PCL'in kimyasal yapıları	17
Şekil 3. Üç boyutlu agaroz-kondrosit disklerin hazırlanma aşamaları, a) hücre ve agaroz karışımının 3 mm kalınlığında elektroforez camları arasındaki boşluğa dökülmesi, b) jelin soğuması için steril koşullarda bekletilmesi, c) steril deri biyopsi kalemi ile jelden disklerin kesilmesi	25
Şekil 4. Mikrokürelerin agaroz diskler üzerine konulduğu hücre kültür inserti	26
Şekil 5. Sertlik Ölçüm cihazı (Durometer)	34
Şekil 6. İndentasyon test bölgelerinin lokasyonu eklem kıkırdağının medyal (a) ve lateral (b) bölgeleri lanset ile belirtilmektedir.	34
Şekil 7. Çıkarılan eklemlerin indentasyon cihazı ile sertlik ölçümlerinin yapılması	34
Şekil 8. % 4'lük PVA ile hazırlanmış kondroitin sülfat yüklü PCL (14kDa) mikrokürelerin taramalı elektron mikroskobu mikrografileri	37
Şekil 9. % 1 PVA+%1 jelatin ile hazırlanmış kondroitin sülfat yüklü PCL (14kDa) mikrokürelerin taramalı elektron mikroskobu mikrografileri	37
Şekil 10. % 4'lük PVA ile hazırlanmış kondroitin sülfat yüklü PCL (65kDa) mikrokürelerin taramalı elektron mikroskobu mikrografileri	38
Şekil 11. % 4'lük PVA ile hazırlanmış doksisisiklin ve kondroitin sülfat yüklü PCL (14 kDa) mikrokürelerin taramalı elektron mikroskobu mikrografileri	39
Şekil 12. D-CS kombinasyonu yüklü PCL mikrokürelere ait parçacık boyut analizi grafiği	40
Şekil 13. D-CS kombinasyonu yüklü PCL mikrokürelere ait taramalı elektron mikroskopisi görüntüleri	40
Şekil 14. Doksisisikline ait standart tepe noktası (5 µg/ml)	41
Şekil 15. Doksisisikline için HPLC analizlerinde kullanılan kalibrasyon eğrisi	41
Şekil 16. D-CS kombinasyonu yüklü PCL mikrokürelere ait ilaç miktarını gösteren tepe noktası	42
Şekil 17. Doksisisiklinin sudaki çözeltisine ait spektrum	42
Şekil 18. Doksisisiklinin fosfat tampon çözeltisindeki kalibrasyon eğrisi	43
Şekil 19. D-CS yüklü PCL mikrokürelerinin fosfat tamponu için salım profilleri (n=3)	43
Şekil 20. D-CS kombinasyonu içeren mikrokürelerin kümülatif % doksisisiklin salım profili (n=3)	44
Şekil 21. D-CS yüklü PCL mikrokürelerinin 3 aylık salım sonunda elde edilen SEM görüntüleri.	45

Şekil 22. D-CS kombinasyonu yüklü PCL mikrokürelere ait gama ışınması sonrası taramalı elektron mikroskopisi görüntüleri	45
Şekil 23. 3T3 hücrelerinin 48 saatlik inkübasyon sonunda canlılık yüzdeleri	46
Şekil 24. Farklı doksisisiklin konsantrasyonu ile inkübe edilen 3T3 hücrelerinin 48 saatlik inkübasyon sonunda faz kontrast resimleri.	47
Şekil 25. Doksisisiklin yüklü ve boş PCL mikrokürelere ile inkübe edilmiş hücrelerin canlılık yüzdeleri	47
Şekil 26. Sağlıklı ve osteoartrit primer kırıkta hücrelerin kültürasyonun farklı evrelerindeki faz kontrast mikrografileri. (Oklar hücrelerin iki fotoğraf arasındaki farklı noktalarını işaret etmektedir.(10X)	49
Şekil 27. 3 günlük inkübasyon sonunda agaroz içinde hapsedilmiş osteoartrit kırıkta hücrelerinin faz kontrast mikrografileri (10X büyütme)	50
Şekil 28. GAG miktarının belirlenmesinde kullanılan kalibrasyon eğrisi	51
Şekil 29. Kondrosit-Agaroz disklerde 9 ve 15. günün sonunda toplam GAG miktarı (n=4)	52
Şekil 30. Vasata salınan toplam GAG miktarı (n=4)	53
Şekil 31. Kollajen miktarının belirlenmesinde kullanılan kalibrasyon eğrisi	54
Şekil 32. Kondrosit-Agaroz disklerde 9 ve 15. günün sonunda hidroksiprolin cinsinden toplam kollajen miktarları (n=4)	54
Şekil 33. Vasata salınan hidroksiprolin cinsinden toplam kollajen miktarı (n=4)	55
Şekil 34. In vitro deneylerde MMP-13 düzeylerinin belirlenmesi için kullanılan kalibrasyon eğrisi ve linear regresyon denklemi	56
Şekil 35. In vitro deneylerde gruptaki MMP-13 düzeyleri (n=4)	57
Şekil 36. Hücre kültür vasatı için oluşturulan doksisisiklin kalibrasyon eğrisi	58
Şekil 37. Hücre kültür ortamında mikrokürelere doksisisiklin salım profili	59
Şekil 38. Osteoartrit oluşturulan eklem kırıkta bulunan lezyonlu bölge. Ok lezyonlu bölgeyi göstermektedir.	60
Şekil 39. Eklemlerin kollajenaz enjeksiyonundan 3 hafta sonraki radyografileri a) önden b) yandan görünüş	60
Şekil 40. Kollajenaz enjeksiyonundan 6 hafta sonra eklem radyografileri	61
Şekil 41. OA oluşturulmuş ancak tedavi edilmemiş tavşanların 4 hafta sonundaki radyografileri (kollajenaz enjeksiyonundan 10 hafta sonra) a) önden b) yandan görünüş	61
Şekil 42. OA oluşturulmuş ve hiyaluronan enjekte edildikten 4 hafta sonraki eklem radyografileri a) yandan b) önden görünüş	62
Şekil 43. OA oluşturulmuş ve hiyaluronan enjekte edildikten 8 hafta sonraki eklem radyografileri a) önden b) yandan görünüş	63
Şekil 44. OA oluşturulmuş ve 5 mg D MS enjekte edildikten 8 hafta sonraki eklem radyografileri a)önden b)yandan görünüş	63

- Şekil 45.** OA oluşturulmuş ve 7.5 mg D MS enjekte edildikten 8 hafta sonraki eklem radyografileri a)önden b)yandan görünüş 64
- Şekil 46.** OA oluşturulmuş ve 5 mg D-CS MS enjekte edildikten 8 hafta sonraki eklem radyografileri a)önden b)yandan görünüş 64
- Şekil 47.** OA oluşturulmuş ve 7.5 mg D-CS MS enjekte edildikten 8 hafta sonraki eklem radyografileri a)önden b)yandan görünüş 65
- Şekil 48.** Sağlıklı tavşan eklemi a)önden b)yandan görünüş 65
- Şekil 49.** OA oluşturulmuş ancak tedavi edilmemiş tavşanların 8 hafta sonundaki radyografileri (kollajenaz enjeksiyonunundan 14 hafta sonra) a) önden b) yandan görünüş 66
- Şekil 50.** Mekanik testlere hazırlık için epoksiye gömülmüş tavşan eklemi 67
- Şekil 51.** Tavşan lateral kondil eklem kırırdağının sertlik ölçümü sonuçlarının gruplar için karşılaştırılması (n=6) 68
- Şekil 52.** Tavşan medyal kondil eklem kırırdağının sertlik ölçümü sonuçlarının gruplar için karşılaştırılması (n=6) 69
- Şekil 53.** Üstte hematoksilen eozin, altta Masson trikromla boyalı 1- 3 ile derecelendirilmiş osteoartritli eklem kesitleri görülmektedir. Yüzey devamlılığının değişen derecelerde olduğu ve kondrosit düzeninin yer yer bozulduğu dikkati çekmektedir. 70
- Şekil 54.** Solda hematoksilen eozin, sağda Masson trikromla boyalı grade sağlıklı eklem kesitleri görülmektedir. Eklem kırırdağının yüzeyinin kesintisiz ve düzgün olduğu izlenmektedir. 70
- Şekil 55.** A-C'de sağlıklı eklem kırırdağı düz kırırdağ yüzeyi, intact kemik kırırdağ bileşkesi ve sağlıklı kondrosit morfolojisi göstermektedir. D-L, fibrilasyon, yarı oluşumu (K'da) matriks dejenerasyonu ile safranin O boyanmasında azalma (F, I ve L) ve hücre içeriğinde değişikliklerle giden farklı derecelerde OA kaynaklı eklem dejenerasyonu göstermektedir. F'de kemik ekspozite olmuştur. Hiyaluronan gruplarındaki eklem dejenerasyonu (G-L) ise tedavisiz OA grubuna göre daha azdır. OA: Osteoarthritis, HE: Haematoksileneozin, MT: Masson trikrom, SO: SafraninO. 71
- Şekil 56.** Farklı tedavi gruplarına ait eklem kırırdağları hafif ila orta derecede, fibrilasyonu kondrosit dejenerasyonu ve matriks hasarı ile giden OA kaynaklı eklem kırırdağı değişiklikleri göstermektedir. Tüm gruplarda dejenrasyonun şiddeti tedavisiz OA grubuna göre daha iyidir. Bazı tedavilerle safranin O boyanması geri kazanılmaktadır (C F, I ve L). J ila L'de hafif pürüklü ya da düz eklem yüzeyi görülmektedir. OA: Osteoarthritis, HE: Haematoksilen eozin, MT: Masson trikrom, SO: Safranin O 73

Tabloların Listesi

Tablo 1. In vitro deneylerde kullanılan Mikroküre deney grupları	26
Tablo 2. İn vivo deney grupları	29
Tablo 3. Tibiofemoral eklemlerde Osteoartrit düzeyinin Kellgren-Lawrence Radyolojik değerlendirme ölçeği	30
Tablo 4. Mankin'in histolojik kıkırdak hasarı skorlama sistemi	31
Tablo 5. Pritzker ve diğ.ne göre kıkırdak hasarı skorlama sistemi	32
Tablo 6. OA skor -yarı kantitatif metod (skor=derece x evre)	33
Tablo 7. OA kıkırdak histopatoloji-evre değerlendirme (Evre=kıkırdak hareketinin ölçüsü)	33
Tablo 8. Mankin skorlamasının tanımlayıcı istatistiksel verileri	74
Tablo 9. OARSI Pritzker skorlamasının tanımlayıcı istatistiksel verileri	75

Özet

Osteoartrit (OA), genellikle bir travma veya yaşlanma ile oluşan dejeneratif bir eklem hastalığıdır. Artrit tedavileri ağrıyı gidermeye, eklemdaki tutukluğu azaltmaya yönelik semptomatik tedavilerdir. Hastalığı tamamen ortadan kaldıran bir tedavi şekli yoktur.

Bu projede, Polikaprolakton (PCL) mikroküreler içine Matriks metalloproteinaz enzimlerini engelleyici etkisi olan Doksisisiklinin (D) hapsedilmesi ile kontrollü salım sistemi hazırlanması ve bu sayede kıkırdak hasarının ilerlemesini engellemeye yönelik yeni bir tedavi stratejisi geliştirilmesi amaçlanmıştır. Ayrıca yenilenme sürecini geliştirmek amacıyla kondroitin sülfat (CS) molekülü doksisisiklin ile birlikte mikrokürelere hapsedilmiştir. In situ doksisisiklin salımının kontrollü ve uzun süreçte olması (3 ayda %37 ilaç salımı), iyi ilaç hapsedme verimliliği (%30) ve istenilen boyutlarda olması hazırlanan ilaç salım sistemlerinin eklem içi uygulamaları için uygunluğunu göstermiştir. Geliştirilmiş mikrokürelerin biyoyumluluğu ve biyoetkinliği sırasıyla 3T3 fibroblast hücre hattında ve kıkırdak hücre kültürlerinde incelenmiştir. Üç boyutlu model, osteoartritli kıkırdak hücrelerinin agaroz içine gömülmesi ve deney süresince ön-enflamatuar sitokinlerden olan interlökin-1 β (IL-1 β) ile birlikte inkubasyonu ile oluşturulmuştur. D ve D-CS mikrokürelerin biyoetkinliği in vitro koşullarda, kıkırdak hücreler tarafından salgılanan matriks bileşenlerinin (glikosaminoglikan ve hidroksiprolin-kollajen) ve matriks metalloproteinaz 13 (MMP-13) miktarlarının ölçülmesi ile değerlendirilmiştir. Mikroküre tedavilerinin hücreler tarafından sentezlenen GAG ve kollajen miktarlarını etkilemediği, ancak parçalanarak vasat salınan GAG miktarlarının azalması ve MMP-13 aktivitesinin düşmesi sonuçlarıyla matriks metalloproteinaz enzimleri üzerinde engelleyici etkisinin olduğu gösterilmiştir. İn vivo deneylerde tavşan femorokondil eklemlerine kollajenaz enzimi enjeksiyonu ile geliştirilen OA modelinde geliştirilen salım sistemlerinin tedavi etkinliği incelenmiştir. OA gelişimini takip eden 6 hafta sonunda yapılan hyaluronan (HYA) enjeksiyonu sonuçlarının 4 ve 8 haftalık uygulamaları kontroller gruplarıyla karşılaştırılmış ve ilaç tedavi gruplarında etkin tedavi süresi 8 hafta olarak belirlenmiştir. D veya D-CS mikroküreler iki farklı dozda yine 6 hafta OA gelişimi sonrasında eklemlere enjekte edilmiş ve 8. hafta sonunda tavşanlar termine edildikten sonra eklemlerdeki iyileşme radyografik puanlama, histolojik analiz ve biyomekanik testler ile değerlendirilmiştir. CS'in eklenmesinin in vitro deneylerde özellikle MMP-13 düzeyinde olumlu katkısı gözlenmiştir. In vivo deneylerin radyolojik ve biyomekanik analizlerinde de yine bu ajanın doksisisiklinin pozitif etkisini daha anlamlı hale getirdiği bulunmuştur. D ve D-CS yüklü mikrokürelerin enjekte edildiği grupların HYA enjekte edilmiş ve tedavi görmemiş gruplarla karşılaştırıldığında genel tedavi potansiyelleri açısından daha iyi olduğu gözlenmiştir.

Anahtar sözcükler: PCL, doksisisiklin, kondroitin sülfat, mikroküre, ilaç salımı, osteoartrit

Osteoarthritis (OA) is known as degenerative joint disease which usually occurs after a trauma or upon aging. Treatments for OA are usually symptomatic; relieve the pain, decrease the paralysis of the joint and increase joint mobility without neither regeneration of the cartilage tissue nor preventing its further breakdown. In this project, we aimed to develop a sustained delivery system of doxycycline, (D), which has inhibitory effect on Matrix Metalloproteinase enzymes, in the form of Polycaprolactone (PCL) microspheres to provide a new strategy for the treatment by preventing the progression of cartilage degeneration. Besides this, in order to improve regeneration process, chondroitin sulfate (CS) was also added to the microspheres together with D. In situ experiments showed the suitability of microspheres for intraarticular applications with their D release being controlled and sustained (37% cumulative drug release in 3 months), good drug encapsulation efficiency (30 %) and having desired dimensions. Biocompatibility and bioefficiency of the developed microspheres were shown with 3T3 fibroblast cell line and chondrocyte cell cultures respectively. The three-dimensional (3D) in vitro model was obtained by using agarose embedded osteoarthritic rabbit chondrocytes which were subjected to an inflammatory cytokine, interleukin-1beta (IL-1 β) throughout treatments for imitating the disease conditions. In vitro evaluations of the bioefficiency of the D and D-CS microspheres were performed by measuring the amounts of cartilage matrix components; glucoseaminoglycan (GAG), hydroxyproline-collagen, as well as by measuring Matrix Metalloproteinaz 13 (MMP-13) activity analysis. Microsphere treatments showed no significant effect on GAG and collagen amounts synthesized by the cells, but the decrease in the amounts of degraded GAGs that are released into cell culture media and reduction in MMP-13 activity compared with untreated controls showed their suppressive effects on Matrix Metalloproteinase enzymes. The treatment efficacy of developed drug delivery systems were evaluated with *in vivo* OA model which was established by intraarticular injection of collagenase to the rabbit joints. The results of hyaluronan (HYA) injections after 6 weeks of OA development, and control groups for 4 and 8 week experiment periods were compared and the efficient treatment period for drug therapies were decided as 8 weeks. D or D-CS MS were applied at two different doses into the joints again at the end of 6th week of OA developments and treatments were assessed by radiographic scoring, histological analysis and biomechanical tests after termination of the rabbits at the end of 8 weeks. Addition of CS showed positive effect on especially in vitro experiments of MMP-13 levels. The radiological and histological analysis of in vivo experiments also demonstrated that this agent improved the positive effect of doxycycline. It was also observed that D ve D-CS MS treated grups were better than HYA injected and untreated groups in terms of overall treatment potencies.

Keywords: PCL, doxycycline, chondroitin sulfate, microsphere, drug delivery, osteoarthritis

Giriş

Artrit pek çok çeşit içeren dejeneratif eklem hastalıklarının ortak adıdır. Bu hastalıklar ülkemizde ve dünyada önemli güç kaybına neden olmaktadır. Özellikle osteoartritin, travma sonucu daha erken yaşlarda ve ani olarak da gelişebilmesi ve kendini onarımı kısıtlı bir doku olan kıkırdakta önemli hasarları içermesi bu yaygın sağlık sorununu ülkemiz açısından daha önemli hale getirmektedir. Daha önce denenmemiş yeni yaklaşımlara ve özellikle ilaç salım sistemleri ile lokal tedavilere yönelim her geçen gün artmaktadır. Bunun temel sebepleri tedavide kullanılan ilaçların yan etkilerinin çok olması, uzun süreli uygulama gerektirmeleri ve yüksek maliyetleri ile belirli seviyedeki hasarlarda kesin bir tedavi sağlayamamaları olarak sayılabilir. Son yıllarda kıkırdak onarımı için, hastalığın gidişini değiştiren ilaç tedavisi veya farklı cerrahi tedavi yöntemleri de kullanılmaktadır. Bu ilaçlardan kıkırdağın ana bileşenlerinden olan kondroitin sülfat veya glikozaminoglikanlar, ağızdan alınan formulasyonlar olarak kullanılmakta, ancak şeker hastalığında kullanılamama, sınırlı iyileşme ve yüksek maliyet gibi sorunlar içermektedirler. Bu grupta kullanılan diğer bir ilaç, hiyaluronan, eklem içine uygulanarak bu sorunlara kısmi çözüm getirmekte ve hastalarda % 50 başarı ile olumlu sonuç vermektedir. Ne var ki, bu yöntemde de diğer iki ilaçtaki sınırlı iyileşme sorunu yanı sıra uygulamanın periyodik olarak yapılması nedeniyle hasta ve doktor için ek tedavi süresi ve materyali maliyeti sorunları da bulunmaktadır. Küçük veya orta büyüklükteki kıkırdak yaralanmalarının onarımında kullanılan cerrahi yöntemlerde de sınırlı iyileşme sağlanabilmektedir. Doksisisiklin ve türevi ilaçların kıkırdak hasarından sorumlu olan matriks metalloproteinaz ve kollajenaz türü enzimleri engelleyici özelliği bilinmesine rağmen yan etkileri nedeniyle sistemik kullanımı kısıtlıdır. Bu nedenlerle, henüz klinikte bu ilaçlar ile kıkırdak hasarları tedavisi amacıyla denemelere rastlanmamıştır. Bu projede doksisisiklin içeren kontrollü salım sistemlerinin hiyaluronan taşıyıcılarla enjekte edilebilir formda geliştirilerek tek seferlik uygulanmasının, kollajen doku yıkımının engellenmesini sağlayarak konvansiyonel tedaviyi güçlendirdiği gösterilmiştir. Bu nedenle geliştirilen sistemin yukarıda bahsedilen sorunlara çözüm getirmesi beklenmektedir. Projede geliştirilen sistemdeki bütün malzemelerin klinikte farklı amaçlar için kullanılması ve biyoyumlu olması klinik uygulamalar için bir ürüne dönüştürülebilmesini kolaylaştırmaktadır. Ayrıca doksisisiklin ve kondroitin sülfat içeren bu salım sisteminin sadece hasarlı bölgeye uygulanabilmesi, uzun süre lokal etkinlik sağlarken diğer dokulara hiçbir yan etki göstermemesi nedeniyle de önem taşımaktadır. Doksisisiklin salım sisteminin analitik modellenmesi ile önemli parametrelerin salımdaki rolünün matematiksel gösterilmesi ve bu parametrelerdeki değişimin salım hızına etkisi de grubumuzca çalışılmıştır.

Bu proje kapsamında yürütülen araştırmalar Mühendislik Bilimleri Bölüm'ü doktora öğrencisi Özlem Aydın'ın doktora tezinin bir kısmı olarak Temmuz 2011'de sunulmuş ve başarılı

bulunmuştur. Proje ve tez kapsamındaki sonuçlar, biyomalzeme, biyomedikal, fizikokimya, biyokimya, temel tıp, biyomekanik ve matematiksel modelleme gibi farklı alanlarda yeni bilgiler üretilmesini sağlamıştır. Bu sonuçların literatüre anlamlı katkı getireceği düşünülmektedir. Son yıllarda hastalıkların tedavisinde konvansiyonel tedavilerin yanında farklı stratejiler geliştirilmesine yönelik çalışmaların sayısı artmaktadır. Klinikte uygulamaya dönüşme potansiyeli yüksek olan ve farklı ürünler olarak dünya çapında kullanımı artan bu sistemlerin ilaç sektörüne ekonomik ve işlevsel yeni boyut kazandıracağı düşünülmektedir. Bu çalışma, elde ettiği sonuçlar ile özellikle toplumda büyük kesimi etkileyen osteoartrit tedavisi için kontrollü salım sistemlerinin kliniğe uygulanabilirliğine yönelik atılmış bir adım olarak değerlendirilebilir.

1. Genel bilgiler

Kıkırdak hasarları tedavisi zor hastalıklardır. Yaşlı nüfusun artması, halk arasında eklem kireçlenmesi olarak da adlandırılan artrit hastalığının da daha sık görülmesine neden olmaktadır. Bu hastalık, 1988'den günümüze artış gösteren yapay eklem uygulamalarının artık toplumun daha geniş kitlelerine yayılmasına neden olmuştur. Dejeneratif eklem hastalığı olarak da tanımlanan artritin toplumda oldukça yaygın olduğu ve yaşlanan nüfusun artmasıyla uygulanacak eklem değiştirme cerrahisinin de artacağı öngörülmektedir. Amerika Birleşik Devletleri'nde 2030 yılında yaklaşık 700.000 kişiye kalça ve diz eklemi değiştirme cerrahisinin uygulanacağı öngörülmektedir. Bu cerrahilerin 1995 yılında ABD sağlık bütçesine doğrudan yükünün 54.589 milyon dolar olduğu, kalıcı sakatlıkların ise maliyetinin 41.597 milyon dolara ulaştığı bildirilmektedir.

Cerrahinin kendisi veya neden olduğu morbidite/mortalite dışında kişilerin iş ve güçlerinden uzak kalmalarının maliyeti bu sayılara yansıtılmamıştır. Ayrıca, cerrahi ile dahi eski iş gücü, hatta günlük aktivitelerine dönmeyen hastaların bulunduğu bilinmektedir. İşin mali boyutunun ötesinde özellikle morbidite ve mortalitenin kişinin kendisinde veya çevresinde oluşturabileceği sosyal ve psikolojik yıkım belirsizdir. Eklem hastalıkları, bir travma sonucu (sportif aktivitelerde karşılaşılan hasarlar gibi) ya da yaşlanma sürecindeki metabolik değişimler sonucu oluşabileceği gibi kontrol edilmemiş enfeksiyonlarla veya vücudun bağışıklık sisteminin kendi dokularına saldırmasıyla da gelişebilmektedir. İlerleyen yaşlarda vücudun onarım kapasitesi düşmekte ve buna bağlı kıkırdak doku kaybı artmaktadır. Yaş, genetik faktörler, cinsiyet, şişmanlık, doğuştan anatomik eklem bozuklukları, mesleki faktörler osteoartrit hastalığının gelişmesini neden olabilecek risk faktörleridir. Yaş ile eklem (sinoviyal) sıvısında azalmalar sonucunda eklem kıkırdağının esneme kapasitesi azalmakta ve bu da eklemler üzerindeki yükü arttırmaktadır. Bu nedenle eklem bölgesinde kıkırdak dejenerasyonu gelişmektedir.

Eklem iltihaplanması sürecinde şişme, kızarıklık ve ağrı görülür. Artrit'in birçok çeşidi olduğu için, teşhis ve tedavi aşamalarında farklılık ve çeşitlilik içerir. Romatoid artrit tedavisi sinoviyal dokuya yöneliktir ve bağışıklık sistemine ya da inflamasyona karşı ajanların uzun süreli kullanılmasını içerir. Osteoartrit ise, kıkırdak dokusunun iyileşme potansiyelinin azlığı ve genelde hastalık farkedildiğinde yüksek miktarda kıkırdak hasarı oluşmuş olması nedeniyle, uygulanan ilaç tedavileri ancak ağrıyı ve eklemdeki tutukluluğu azaltma ve eklemdeki fazla hasar görmesini engellemeye yöneliktir. Erken safhalarda tedavi eklemdeki inflamasyonu gidermeye yöneliktir (KUTSAL, 1999; KUTSAL, 2003). Osteoartrit, artritin en sık rastlanan türüdür. 65 yaş üstü erkeklerin %60'ı ve kadınların ise %70'inde görülmektedir (SARZİ-PUTTİNİ, 2005; GERWIN, 2006, DENG, 2007). Osteoartriti kıkırdağın mekanik özellikleri, normal kıkırdaktan daha az sertlikte (stiffness) ve daha azalmış çekme

mukavemetinde olduğunu göstermektedir. Artritli kıkırdakta matriks bozulmasının ilk belirtisi doku su tutma ve geçirgenliğindeki artışıdır. Bunun temel sebebi dokudaki negatif yüke sahip proteoglikanların yarattığı ozmotik basıncın kollajen ağının yıkımından dolayı kontrol edilememesidir. Artritli dokularda kollajenaz (kollajeni parçalayan enzim) aktivitesinin genetik olarak artmış olduğu, bunun sonucu olarak da ortamda çok miktarda parçalanmış kollajen tip II bulunduğu görülmüştür (EISENBERG, 1988, THIABAULT, 2002). Doksisisiklin ve türevi ilaçların metaloproteinazları ve kollajenaz enzimini engelleyici etkinliği birçok in vitro çalışmada gösterilmiştir. Matriks metaloproteinazlar bağ dokuyu (özellikle kollajeni) parçalama ve bozma özelliğine sahip enzimlerdir (NAGASE, 2003; MILNER, 2005; WANG, 2008). Bunlardan özellikle MMP-13'ün, önceleri sadece insanda meme kanserinde kollajenaz etkisi gösterdiği ve ratlarda kemik dokusundaki osteoblastlarla ilgili kollajenaz olduğu düşünülmüş fakat daha sonra bunlara ilaveten insanda kemik ve kıkırdak dokusunda da bulunduğu görülmüştür. Bu kollajenazın (MMP-13) kıkırdakta baskın olarak bulunan tip II kollajeni, tip I'den daha etkin bir biçimde parçaladığı da ispatlanmıştır. Bunun yanısıra aynı kollajenazın yine kıkırdakta matriks temel malzemesi olan proteoglikanları ve kollajenin farklı bir formu olan jelatini de parçaladığı gösterilmiştir (AIGNER, 2003; WILSON, 2007). Bu etkilerinden dolayı MMP-13, kollajenazın kıkırdak yıkımlarına en çok sebep olduğu bilinen romatoid artrit ve osteoartritte kıkırdak dokusunun bozulmasındaki ana mekanizmada rol aldığı düşünülmektedir. Doksisisiklin türevi ilaçların gelişmekte olan kemik ve diş dokusunda olumsuz etkisinin olduğu da bilinmektedir. Bu ve diğer yan etkileri (antibiyotik özellikleri ile ilgili) nedeniyle bu ilaçların sistemik kullanımı kısıtlıdır. Bu nedenlerle, hücre kültürü çalışmaları, MMP'lerin kollajen yıkımını önlemek üzere inhibitör (engelleyici) potansiyelleri olan doksisisiklin türü ilaçların terapötik kullanımını gerekli gösterse de henüz klinikte bu ilaçlar ile denemelere rastanmamıştır. Buna rağmen dünya çapında pek çok laboratuvarında kollajenaz aktivitesini inhibe etmek üzere doksisisiklin analogları ile ilgili araştırmalar farklı dokular üzerinde sürmektedir (HANEMAAIJER, 1998; DENG, 2007; SHANMUGANATHAN, 2008). Bu araştırmaların amacının kemik kollajenazlarına nötr ve kıkırdak dokusundakilere karşı etkin bir analog bulmak olduğu görülmektedir. Bu aşamada antimikrobiyal etkinliği ortadan kaldırılmamış olsa dahi, kollajenaz aktivitesi korunan doksisisiklin lokal olarak (sistemik veya lokal hücreler üzerinde olumsuz etki göstermeyecek kadar az dozlarda çıkışını sağlayacak bir salım sistemi içerisinde) kullanmanın kıkırdak hasarlarının tedavisine yeni bir yaklaşım getireceği düşünülmektedir. Özellikle kanser gibi birçok tedavisi zor hastalığa karşı ilaç hedeflendirilmesi yöntemi üzerine dünyada yaygın olarak araştırmalar sürmektedir. Bu tür tedavilerin yakın gelecekte klinikte de konvansiyonel ilaç uygulamalarının yerini alacağı düşünülmektedir. Temelde ilaç hedeflendirilmesi sadece hasarlı bölgeye etken maddenin biyouyumlu taşıyıcılar içerisinde verilmesi (pasif hedeflendirme) veya hasarlı

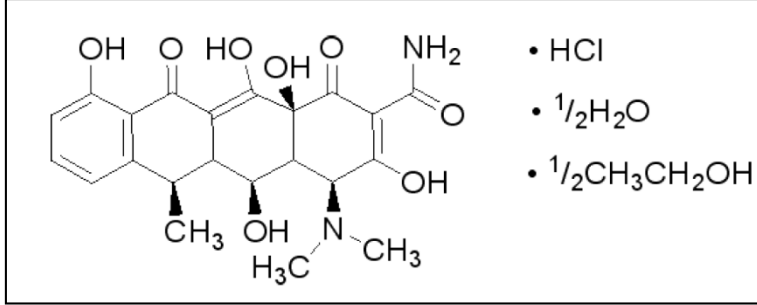
hücreleri bulacak özel ligandlar bağlanması sonucunda sistemik olarak uygulanmasını (aktif hedeflendirme) içermektedir.

Bu projede kıkırdak dokusunun sistemik olarak ulaşılması zor bir yapıda olması (kapalı bir sistem olması) ve lokal tedavinin desteklenmesini sağlayacak malzemelerin de taşıyıcı rolüyle kullanılmasının mümkün olması nedeniyle pasif hedeflendirme yöntemi uygun bulunmuştur. Günümüzdeki kıkırdak tedavileri temelde osteoartrit sonucu dokuda kaybedilmiş olan ve eklem kıkırdağının kemikten gelen mekanik kuvvetlere direncini artıran proteoglikanların (hiyaluronan gibi) aralıklarla enjeksiyonunu içermektedir. Ancak kıkırdak yıkımındaki önemli bir parametre olan kollajenin MMP-13 tarafından parçalanmasına veya kollajen dokusunun onarımına yönelik hiçbir tedavi bulunmamaktadır (HOLLAND, 2003; WILSON, 2007; SHANMUGANATHAN, 2008). Bu amaçlarla yukarıda bahsedilen antikollajenaz etkisi olan doksisisiklin içeren salım sistemleri hazırlanıp, hiyaluronan taşıyıcılarla enjekte edilebilir formda uygulanmasının hem kollajen doku tedavisi hem de konvansiyonel tedaviyi birleştireceği düşünülmektedir. Böylece şu an uygulanmakta olan haftada bir veya iki hiyaluronan enjeksiyonu gibi hem hasta hem de ortopedist açısından yorucu ve zahmetli bir tedavi yönteminin sadece tek seferlik uygulamaya dönüştürülebilmesi ve daha başarılı sonuçlar elde edilebilmesi hedeflenmektedir.

Kıkırdak için dizayn edilmiş biyomalzemenin yapısal ve mekanik özellikleri içinde mükemmel biyouyumluluk, kontrol edilebilir bozunum oranı ve iyi işlenebilirliği gelir (HEYWOOD, 2004). Kıkırdak dokusunun yeniden oluşumundaki başarı, seçilen biyomalzemenin kıkırdak dokusunun doğal yapısına ne kadar benzer olduğuyla ilgilidir. Hiyaluronan, hücreler arası matrikste çok miktarda bulunmaktadır (SOLCHAGA, 2001). Kondroitin sülfat, prototeoglikan ve tip 2 kollajen sentezine katkıda bulunur (SECHRIEST, 2000). Dolayısıyla kıkırdak dokusunu tedavi etmek için kullanılan bu ajanlar zaten kıkırdak dokusunun yapıtaşlarındandır (DENG, 2007).

Literatürde doksisisiklin ve benzeri antibiyotiklerle hazırlanmış polimerik salım sistemleri ile ilgili pek çok in situ, in vitro ve in vivo araştırma bulunmaktadır (SENDİL, 1999; SLOTS, 1990; AISHWARYA, 2008; PATEL, 2008) Bu sistemler genellikle mikrobiyal kökenli hastalıkların (enfeksiyonların) lokal tedavisini amaçlayarak geliştirilmiştir. Septik artrit tedavisi için enfekte olmuş eklem için geliştirilmiş yavaş salım formülasyonları doksisisiklin ile hazırlanmıştır. Doksisisiklinin tetrasiklin grubu antibiyotikler içinde en stabil olduğu bilinmektedir (Şekil 1). Dolayısıyla yavaş salım formülasyonları için en uygun antibiyotiktir (HAERDI-LANDERER, 2008). Ayrıca doksisisiklinin kondrosit koruyucu olduğu hem in vitro hem de insan üzerinde klinik deneylerde belirlenmiştir. Doksisisiklinin hayvan eklemlerindeki doku uyumluluğu ise kanıtlanmıştır (HAERDI-LANDERER, 2008; HAERDI-LANDERER, 2007). Periodontal

hastalıklarda doksisisiklinin diğer tetrasiklin grubu üyelerine nazaran toksik yan etkilerinin oldukça az olduğu görülmüştür (PATEL, 2008; MUNDARGI, 2007).



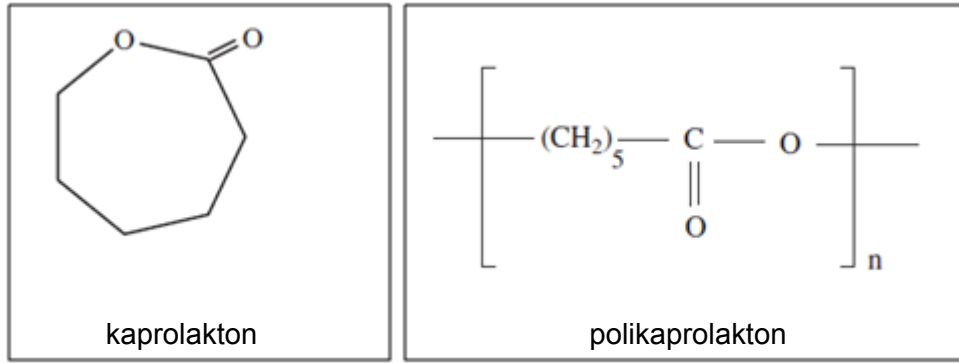
Şekil 1. Doksisisiklin hyclate'in kimyasal yapısı (Sigma-Aldrich)

Antimikrobiyel özelliklerinin dışında, doksisisiklinin, matriks metalloproteinazları (MMP) inhibe ettiği de gösterilmiştir (NORDSTROM, 1998; SIEMONSMA, 2003, PATEL, 1999). Doksisisiklin tedavisinin antimikrobiyel dozun altında, periodontal hastalıkların aktivitesini MMP'leri ve ön-inflamasyon sitokinleri azaltarak düşürdüğü bulunmuştur (CHOI, 2004). Doksisisiklinin MMP aktivitesini artiritte, periodontitiste (GAPSKI, 2004) ve aortik anevrizmada (MANNING, 2003) azalttığı görülmüştür (SHANMUGANATHAN, 2008).

Henüz doksisisiklinin türevleri ile veya kollajenaz etkisine sahip analogları ile kıkırdakta osteoartrit modelinde tedavi araştırılmak üzere yapılmış bir salım sistemi çalışması bulunmamaktadır.

Poli ε-kaprolakton (PCL), alifatik poliesterler grubundan biyobozunur bir polimerdir (Şekil 2). PCL, aynı zamanda biyoyumlu bir polimer olmasından dolayı da kontrollü ilaç salım sistemleri ve diğer biyomalzeme araştırmalarında da yıllardan beri kullanılan bir malzemedir. Yarı kristal bir yapıya sahip olan PCL'in camsı geçiş sıcaklığının (T_g), eksi 60°C'den düşük olduğu literatürde belirtilmiş ve proje araştırmalarında da gösterilmiştir. Düşük kristalinitesi ve T_g'sine rağmen diğer poliesterlere göre daha yavaş bozunması, PCL'in daha uzun süreli tedavi amacına yönelik salım sistemlerinde tercih edilmesine sebep olmuştur. Ayrıca mekanik özelliklerinin çok kuvvetli olmaması mekanik mukavemet gerektiren biyomalzemelerde (yük taşıma amacıyla- kemik implantları gibi) bu polimerin tek başına kullanımını kısıtlamaktadır. Bu özelliklerinin geliştirilmesi için farklı polimerlerle karışım (blending)- kopolimerizasyon veya farklı malzemelerle kompozit yapılabildiği görülmektedir (ERDEMLI, 2010; SINHA, 2004; MUNDARGI, 2007). Bu özellikleri dışında PCL'in eklem kıkırdağındaki sinoviyal bölgeye uygulanacak bir salım sistemi taşıyıcısı olarak kullanılmasının uygunluğunu gösteren diğer sebepler biyoyumlu, biyobozunur olması ve aynı zamanda bozunum sonucunda diğer poliesterler gibi asidik bir çevre oluşturmamasıdır (AISHWARYA, 2008).Böylece kıkırdak dokusundaki protein ve hücrelerin hiçbir şekilde zarar

görmemesi, istenilen rejenerasyona ulaşılması beklenmektedir. Literatürde PCL için farklı salım sistemi denemelerine rastlanmıştır. Bunlardan protein salımı ile ilgili olanlarda (BENOIT, 1999; OSTACOLO, 2008), bu polimerin protein bütünlüğü ve ortamın pH'sını değiştirmeyişi nedeniyle tercih edildiği belirtilmektedir (OSTACOLO, 2008; AISHWARYA, 2008). PCL'in diğer polimerlere oranla düşük bozunması, menapoz sonrası hormon tedavileri gibi uzun süreli tedaviler için tercih edilmesine de neden olmaktadır (ZALFEN, 2008). Ayrıca in vitro çalışmalardaki stabilitesi ve düşük maliyeti de bu polimerin çok tercih edilmesinde etkindir (HA, 1997; LUCIANI, 2008).



Şekil 2.Siklik kaprolakton ve onun homopolimeri olan PCL'in kimyasal yapıları (NAIR, 2007).

Biyoaktif ajanların kontrollü salım sistemleri diğer hastalıkların tedavisinde de öne çıkmaktadır. Özellikle kanser tedavilerinde kontrollü salım çalışmaları gelişim aşamasındadır (NISHIYAMA, 2006; PURI, 2008). Kalp, beyin ve hatta diş hastalıkları tedavisine yönelik araştırmalarda da polimerik salım sistemleri kullanılmaktadır (MUNDARGI, 2007; AISHWARYA, 2008; PATEL, 2008; RAFFIN, 2007; WESTEDT, 2006). Hasarlı veya enfekte kemik dokusunun tedavisi için de enjekte edilebilir sistemler kullanılmasını içeren klinik olarak kullanılan sistemler bulunmakta (DIEFENBECK, 2006; HANSEN, 2005), bunların daha etkin formlarına yönelik araştırmalar sürmektedir (YOUNG, 2008). Farklı ilaç denemeleri de mevcuttur. Bunlardan deksametazon, sentetik, steroidal anti-inflamatuar bir ilaç olup, implanttan dolayı oluşan ağrı ve inflamasyonu gidermek için mikroküre ve lipozom formlarında hazırlanmıştır (ZOLNIK, 2008).

Normal eklemlerde sitokinlerin önemli rol aldığı anabolik ve katabolik metabolizma denge içindedir. İnterlökin-1 (IL-1), interlökin-6 (IL-6) ve tümör nekroz faktörü (TNF- α) gibi sitokinler, proinflamatuvar sitokinler olarak bilinir. Bu sitokinler, inflamatuvar değişikliklerin oluşmasında ve patojenin ortadan kaldırılmasını sağlayan hızlı bağışıklık yanıtının ortaya çıkmasında rol alırlar. IL -1'in IL-1 α ve IL-1 β olmak üzere iki alt tipi vardır. Ayrıca interlökinlerin, sepsis, diyabet, otoimmün hastalıklar ve osteoporoz oluşumunda etkili oldukları da düşünülmektedir. Bu iki form, farklı genler tarafından kodlanan sırasıyla 159 ve 153 aminoasitlik peptidlerdir.

Birbirleri ile sadece % 26 oranında benzer olmalarına rağmen biyolojik aktiviteleri ve potansiyelleri benzerdir. Ayrıca aynı hücre yüzey reseptörlerine benzer birleşme eğilimleriyle (afinitelerle) bağlanırlar.

İnterlökin-1 (IL-1), interlökin-6 (IL-6) ve tümör nekroz faktörü (TNF- α) gibi sitokinler, proinflamatuvar sitokinler olarak bilinir. Bu sitokinler, inflamatuvar değişikliklerin oluşmasında ve patojenin ortadan kaldırılmasını sağlayan hızlı bağışıklık yanıtının ortaya çıkmasında rol alırlar. IL -1'in IL-1 α ve IL-1 β olmak üzere iki alt tipi vardır. Ayrıca interlökinlerin, sepsis, diyabet, otoimmün hastalıklar ve osteoporoz oluşumunda etkili oldukları da düşünülmektedir. Bu iki form, farklı genler tarafından kodlanan sırasıyla 159 ve 153 aminoasitlik peptidlerdir. Birbirleri ile sadece % 26 oranında benzer olmalarına rağmen biyolojik aktiviteleri ve potansiyelleri benzerdir. Ayrıca aynı hücre yüzey reseptörlerine benzer birleşme eğilimleriyle (afinitelerle) bağlanırlar.

Travmalar kıkırdak katabolizmasını artırarak yıpranmayı kolaylaştırır. Yıkıcı süreçler yaşla azalan onarım kapasitesini aşınca kıkırdak kaybı başlar ve bu kayıp zamanla artar. Mikro travmalar "interlökin-1 β " ve "tümör necrosis factor" gibi sitokinlerin salgılanmasına ve iltihabi bir reaksiyona yol açar. Bu sitokinler kondrositlerin proteolitik enzimler salgılamasını artırır; böylece kıkırdak hasarı ilerler. Kıkırdak hasarını artıran başlıca enzimler matriks metalloproteinazlarıdır. Karşıt etkili "transforming growth factor-beta" ve "insulin-like growth factor-1" gibi kıkırdağı koruyucu büyüme faktörleri salgılanması da artar. Gençlerde bu büyüme faktörleri iltihaba yol açan sitokinlerin etkisini silmekte başarılı olur. Ancak yaşlanma ile dokuların büyüme faktörlerine cevabı gittikçe azaldığı için denge kıkırdak hasarı lehine bozulur.

Bir glikozaminoglikan olan kondroitin sülfat, doğal olarak eklem kıkırdağının hücre dışı matriksinde bulunur. Kondroitin sülfat, dallanmamış, uzun polisakkarit zincirinde N-asetilgalaktozamine ve glukuronik asitin tekrarlanan disakkarit yapısını içerir. Pek çok klinik çalışmada osteoartrit tedavisi için uygunluğu test edilip kanıtlanmıştır (NERUCCI, 2000). Kondroitin sülfat tedavisinin avantajlarının nedenlerinin başında kıkırdak dokusu matriksinin sentezlenmesi arttırması, interlökin gibi enflamatuvar sitokinlerini bastırması ve kıkırdak yıkımını azaltması kabul edilmektedir.

Bu çalışmada, bu özelliğinin yanı sıra sudaki çözünürlüğünün yüksek olmasından dolayı da kullanılmaktadır. Küre yapımında kullanılan Polikaprolakton (PCL), hidrofobik bir polimer olduğu için su alarak şişme özelliği göstermez. Dolayısıyla kondroitin sülfatın su alarak şişmesi ve bu şekilde de polimerin su difüzyonunu hızlandırması hedeflenmektedir. Bu sayede, osteoartrit oluşumu sırasında kıkırdak dejenerasyonuna bağlı olarak artan matriks metalloproteinazların (MMP) engellenmesi için kullanılan doksisisiklinin daha etkili bir şekilde eklem sıvısına diffüzenmesi ve beraberinde tedaviyi olumlu etkileyeceği düşünülen KS

salınması mümkün olacaktır. Yapılan yeni bir çalışmada kondritin sülfat, PLGA partiküllerinin içine çift emülsiyon yöntemiyle hapsedilmiş (JIANG, 2011) ve bu salım sisteminin osteoartrit tedavisinde başarılı olduğu gösterilmiştir. Projede, kondroitin sülfat ile doksisisiklinin PCL mikrokürelere birlikte yüklenerek OA kıkırdak üzerinde hastalık seyrini olumlu değiştirme potansiyeli de araştırılmıştır.

Projede yapılan çalışma doksisisiklinin veya kollajenaz etkisine sahip analogları ile kıkırdakta osteoartrit modelinde tedavi araştırılmak üzere yapılmış ilk salım sistemi çalışmasıdır. Günümüzdeki ilaç tedavilerinin yetersizliği ve yüksek maliyeti sebebiyle projedeki gibi alternatif tedavi yöntemleri aranmaktadır. Alternatif tedavilerin insan vücudundan önce hücre daha sonra ise insan dışı canlılarda test edilmesi, etkinliğin tespiti ve konu ile ilgili temel bilgilerin oluşturulması açısından büyük önem taşımaktadır.

Literatürde bulunan doksisisiklin ve türevlerine yönelik kontrollü salım sistemleri önerilen projeden tamamen farklı amaçlara yöneliktirler ve tedavi etkinlikleri de farklı yönlerden incelenmişlerdir. Literatürde bilgimize henüz osteoartritte görülen yüksek derecede kıkırdak matriks degradasyonuna karşı bir MMP ve kollajenaz inhibitör etkili salım sistemi ile ilgili araştırma yapılmamıştır. Biyoaktif ajanların salım sisteminin geliştirilmesi için ön araştırmaların canlı veya canlıya ait doku vs. içermeyen laboratuvar koşullarında yapılması daha sonra in vitro (hücre-doku düzeyinde araştırmalar), in vivo (rat, tavşan gibi hayvanlarla) araştırmalarla tedaviye yönelik başarılılığının ve diğer etkilerinin incelenmesini gerektirmektedir. Klinik uygulamalara-denemeler geçilmeden önce bu deneylerin optimize edilmesi ve istatistiksel verilerle sonuçların gösterilmesi gereklidir. Bu aşamaların 1. kısmını oluşturan salım sistemi geliştirme ve laboratuvar koşullarında özelliklerini belirleme grubumuzca daha önceden tamamlanmış, TÜBİTAK-TBAG tarafından desteklenen bu proje ile de in vitro-in vivo araştırmalarla geliştirilen salım sistemlerinin biyoetkinliği ve uygulanabilirliği araştırılmıştır.

2. Gereç ve Yöntemler

2.1. Osteoartrit Tedavisine Yönelik Biyoaktif Ajan Taşıyan Mikrokürelerin Hazırlanması ve Özelliklerinin *In Situ* Ortamda İncelenmesi

2.1.1. Doksisisiklin Yüklü Mikrokürelerin Hazırlanması

Doksisisiklin yüklü PCL mikroküreler su fazında yağ fazı (oil in water, o/w) emülsiyon metoduna göre hazırlanmıştır. Yüzey aktif madde (sörfektant) olarak polivinil alkol (PVA, Aldrich) tek başına (% 4) veya jelatin ile birlikte sulu ortamında hazırlama işlemi, doksisisiklinin polimer içerisine hapsedilip çözücülerinden uzaklaştırılmasını (solvent evaporation) içermektedir. Organik faz için polimer olarak 14 veya 65 kDa molekül ağırlığında PCL ile % 6.5, kloroform çözeltisi hazırlanmıştır. Bu faza 100 mg doksisisiklin ilave edilip vorteks yardımı ile homojen dağılması sağlanmıştır. Sulu faza organik fazın damlatılması sırasında ısı ve karıştırma hızı (1100 rpm) kontrol edilmiştir. Organik faz uçurulduktan sonra oluşturulan mikroküreler yıkanıp, santrifüjle dış ortamdan uzaklaştırılmış ve 30°C de vakum etüv (Nüve- EV060) içerisinde kurutulmuştur. Mikroküreler kullanma anına kadar 4°C'de desikatörde saklanmıştır.

2.1.2. Doksisisiklin-Kondroitin Sülfat (D-CS) Kombinasyonu Yüklü Mikrokürelerin Hazırlanması

Projede kapsamında literatürde daha önceden çalışılmamış olan doksisisiklin-kondroitin sülfat kombinasyonu yüklü PCL mikroküreler geliştirilmiştir. Bunun için öncelikle kondroitin sülfat içeren ancak doksisisiklin içermeyen PCL mikroküreler hazırlanmıştır. Mikroküre yapımında tekli emülsiyon yöntemi kullanılmıştır. Yüzey aktif madde (sörfektant) olarak polivinil alkol (PVA, Aldrich) tek başına (% 4) veya jelatin ile birlikte (% 1'lik konsantrasyonlarda) denenmiştir. Mikrokürelerin birbirine yapışması sorunu yüzey aktif madde (sörfektan) olarak % 4 PVA (polivinil alkol) kullanılması ile aşılmıştır ve mikroküre boyutlarının küçültmesi amacıyla karıştırma hızı yüksek olan homojenizatör (IKA-Ultraturrax T-25) kullanılmıştır. Literatürde yapılan araştırmalarda karıştırma hızının artırılmasının küre boyutlarını küçülttüğü gözlenmiştir (RADIN, 2009). Organik faz olarak hazırlanan 14 veya 65 kDa PCL (% 6.5, kloroform) çözeltisine kondroitin sülfat (CS)-2 mg (Sigma) eklenip 4-5 dakika boyunca vorteks aracılığıyla homojen dağılması sağlanmıştır. PCL-CS karışımı sulu faza damlatılarak üç saat boyunca homojenizatörde (3400 rpm) karıştırılmıştır. Daha sonra karıştırmaya kloroformu uzaklaştırmak için 1100 rpm'de devam edilmiştir. Sentrifugasyon ile sulu ortamdan ayrıştırılan mikroküreler, sörfektanın mikrokürelerden uzaklaştırılması için iki kez saf su ile yıkanıp 6000 rpm'de tekrar sentrifuj edilip vakum fırınında (Nüve- EV060) bir gece kurutulmuş ve analizleri yapılana kadar 4°C'de desikatörde saklanmıştır.

Tüm optimizasyon denemelerin sonucunda en uygun şekil ve yüzey özelliklere sahip mikrokürelerin hazırlanması için düşük moleküler ağırlığa sahip PCL (14 kDa) ve sulu faz içinde %4'lük PVA kullanılmasına karar verilmiştir. Doksisisiklin ve kondroitin sülfatın birlikte yüklenmesi için tüm şartlar aynı tutulmuş ancak homojenizatör ile yüksek hızda (3400 rpm) karıştırma süresi 3 saatten yarım saate indirilmiştir. Mikrokürelerin yapısal kararlılıklarını emulsifikasyon ajanının hacmi ve konsantrasyonu etkilediği ve yüksek miktarda PVA'nın mikrokürelerin yapısal bütünlüklerini azalttığı gösterilmiştir (KEMALA, 2010). Bu nedenle ikinci aşamada ilk olarak sulu fazın hacmi 40 ml olarak seçilmiştir. Ancak kondroitin sülfatın eklenmesi ile mikroküre yerine membransı yapıların elde edildiği gözlenmiştir. Bunun yüksek reaktiviteye sahip kondroitin sülfatın sulu fazla etkileşerek PVA'nın emulsifikasyon etkisini azaltmasından kaynaklandığı düşünülmektedir. Bu nedenle sulu fazın hacmi 75 ml'ye çıkartılmıştır.

2.1.3. Mikrokürelere Hapsolan İlaç Miktarının Belirlenmesi

D-CS kombinasyonu yüklü PCL mikrokürelerin ilaç tutma verimliliğinin belirlenmesi için mikroküreler, tetrahidrofuran (THF) ve metanol (1:1 oranında) çözeltisinde üç gün boyunca manyetik karıştırıcı ile karıştırılmış ve bu sıvıya ekstrakte olan ilacın miktarı 6000 rpm'de 25 dk boyunca santrifügasyon sonrası supernatant fazından belirlenmiştir. Bu fazdan alınan örneklerdeki doksisisiklin miktarı önce 0.2 µm'lik enjektör filtreden (PALL) geçirilmiş ve daha sonra UV-görünür dedektörlü HPLC cihazında (SPD-20A, Shimadzu, Prominence), 275 nm dalgaboyunda yapılan ölçümlerle belirlenmiştir. HPLC analizlerinde C18 kolon (Inertsil ODS-3, 5 µm, 250x4.6 mm; GL Sciences, Japan) ve mobil faz olarak metanol, asetonitril ve tetrahidrofurandan (50:40:10, v/v) kullanılmıştır. Örnekler sisteme 37°C'de verilmiştir.

Hapsolan doksisisiklin miktarının hesaplanabilmesi için yine bu HPLC prosedürü ile standart ilaç konsantrasyonlarında kalibrasyon eğrisi hazırlanmıştır. Aşağıdaki eşitlikler kullanılarak yüklenen ilaç miktarı ile hapsolma verimi belirlenmiştir.

$$\% \text{ İlaç Yükleme} = \frac{\text{Ağırlıkça ilaç miktarı}}{\text{Ağırlıkça mikroküre miktarı}} \times 100 \quad (1)$$

$$\% \text{ İlaç Tutma Verimliliği} = \frac{\% \text{ İlaç miktarı}}{\% \text{ Teorik yükleme}} \times 100 \quad (2)$$

2.1.4. Doksisisiklin veya Doksisisiklin-Kondroitin Sülfat Kombinasyonu Yüklü Mikrokürelerin İlaç Salım Profilinin Belirlenmesi

İlaç salım profili ve kinetiğinin belirlenmesi için belirli miktarlarda mikroküreler fosfat tampon çözeltisi (pH 7.4, 0.01M) içerisinde 12 kDa ortalama boyutta geçirgenliğe sahip diyaliz

torbalarına (Sigma) iki tarafı kısaça kısıtılarak konulmuş ve yine aynı tampon çözeltiyi içeren kapaklı cam kaplar içerisinde, kapalı ortamda 37°C'de çalkalamalı su banyosunda (Nüve-ST402) bekletilmiştir. Bellirli aralıklarla diyaliz torbalarının dışındaki tampon çözeltiden alınan örneklerin 275 nm'deki absorbans değerleri spektrofotometrede (Hitachi-U-2800A) ölçülerek mikrokürelerden salınan ilaç miktarları bulunmuştur. İlaç miktarı tayini için aynı dalga boyunda tampon çözeltide absorbans değerleri belirlenen standart doksisisiklin çözeltilerinin linear kalibrasyon eğrisine ait regresyon analizi denklemleri kullanılmıştır.

2.1.5. Mikrokürelerin Parçacık Boyut Analizleri

PCL mikrokürelerinin parçacık boyut analizleri ODTÜ Merkezi Laboratuvarı'nda Malvern Mastersizer 2000 kullanılarak ölçülmüştür.

2.1.6. Mikrokürelerin Taramalı Elektron Mikroskopisi ile Mikrokürelerin Yüzey ve Şekil Analizleri

Gama ile sterilizasyonu yapılmış ve yapılmamış doksisisiklin-kondroitin sülfat kombinasyonu yüklenmiş PCL mikrokürelerin şekil ve yüzey morfoloji özellikleri ODTÜ Metalürji ve Malzeme Mühendisliği Bölümü SEM Laboratuvarı'ndaki 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.

2.1.7. Mikrokürelerin ve Doksisisiklin Biyoyumluluklarının İncelenmesi

Doksisisiklinin doza bağlı toksik etkisi ve hazırlanan PCL mikrokürelerinin biyoyumlulukları 3T3 hücreleri ile in vitro sitotoksikite testleri ile test edilmiştir. 3T3 hücre hattı ŞAP Enstitüsü'nden satın alınmış ve %10 FCS içeren DMEM vasatı içinde kültive edilmişlerdir.

Hücreler kuyucuk başına 4.4×10^4 ekilmiş ve yapışmaları için saat karbon dioksit etüvinde inkübe edilmiştir. Doksisisiklin çalışması için hücreler 0, 5, 10, 15 ve 20 µg/ml doksisisiklin içeren DMEM vasatı içinde kültive edilmiştir. Detayları Bölüm 2.2.4'de verilen MTT testi ile canlılıkları ölçülmüştür. Ayrıca hücrelerin morfolojileri iki günlük inkübasyon sonucunda faz kontrast mikroskobu ile incelenmiştir.

Mikrokürelerin biyoyumlulukları test edilmesinden önce detayları aşağıda verilen gama ışınması ile sterilize edilmiştir. Mikroküreler kültür kabının kuyucuklarına (5 mg küre/kuyucuk) konulduktan sonra bir gece boyunca %98 alkol içinde bekletilerek yeniden sterilize edilmişlerdir. Daha sonra 3T3 hücreleri kuyucuk başına 4.4×10^4 eklemiş ve iki gün boyunca karbon dioksit etüvinde bekletilmiştir. İki günlük inkübasyonu sonunda mikroküreler vasat ile birlikte çekilmiş ve MTT canlılık testi çalışılmıştır.

2.1.8. Kondroitin Sülfat-Doksisiklin Kombinasyonu Yüklü Mikrokürelerin Gama Işınlarıyla Sterilize Edilmesi

İn vitro ve in vivo deneylerde kullanılmak üzere hazırlanan D ve D-CS kombinasyonu yüklü PCL mikroküreler sterilizasyon amacıyla 25 kGy'e karşılık gelecek şekilde ışınlanmıştır (DORATI ve ark, 2005). Işınlama işlemi TAEK, Sarayköy Nükleer Araştırma ve Eğitim Merkezi (SANAEM)'nde bulunan ISSLEDOVATELJ (Gamma-cell) Co60-γ ışınlama kaynağı ile oda sıcaklığında gerçekleştirilmiştir. Bu kaynağın ışınlama hızı 1.74 KGy/saattir.

2.2. Osteoartrit Tedavisine Yönelik Biyoaktif Ajan Taşıyan Mikrokürelerin *In Vitro* Ortamda Değerlendirilmesi

2.2.1. Sağlıklı ve Osteoartritli Tavşandan Primer Kıkırdak Hücresi İzolasyonu ve Kültürü

Sağlıklı kıkırdak hücresi izolasyonu için erişkin olmayan erkek tavşanlar kullanılmıştır. Tavşanlar termine edildikten sonra eklem kıkırdaklarından kıkırdak hücreleri enzimatik yöntemle izole edilmiştir. Öncelikle femur ve diz eklem bölgelerindeki yumuşak dokular aseptik şartlar altında temizlenmiş ve kıkırdak dokusu parçalar halinde çıkartılmıştır. Kıkırdak parçaları % 70'lik alkolde 2-3 dakika bekletildikten sonra 15 saat 100 ünite/ml kollejenaz tip II ile inkübe edilmiştir. Bu süre sonunda 100 µm gözenek boyutlu naylon filtreden geçirilip 2000 devirde çevirilmiş ve kıkırdak hücreleri pellet olarak elde edilmiştir. Hücreler, % 10'luk fetal kalf serum (FCS), 10 ünite antibiyotik/ml, % 1 nonessansiyel amino asit ve 0.4 mM prolin içeren DMEM/High Glucose (4.5g/l) vasat içinde karbondioksit etüvünde kültive edilmiştir (SALVAT, 2005). Büyüme vasatı üç günde bir yenilenmiştir. Kıkırdak hücreleri % 0.05'lik tripsin-EDTA ile 1:3 oranında pasajlanmıştır. Bütün deneylerde 2-4. pasaj kıkırdak hücreleri kullanılmıştır.

OA'lı tavşandan izolasyon amacıyla diz (femorokondyl) eklemlerinde OA oluşturulmuş erişkin erkek tavşanlar kullanılmıştır. OA geliştirilmesi için tavşanlara eklem içi kollajenaz tip II (*Clostridium histolyticum*) enjekte edilmiştir. Kullanılan kollajenazın enzim aktivitesi 456 U/mg olacak gelecek şekilde, izotonik sodyum klorür ile kollajenaz çözeltisi hazırlanmıştır (4 mg/ml). Eklem içi enjeksiyon için kollajenaz çözeltisi 0.22 mm'lik filtreden geçirilerek steril hale getirilmiştir. Enjeksiyondan önce denekler Ketamin-Ksilazin (1:0.5) kombinasyonu ile uyutulmuş her iki arka bacak diz eklemine birinci ve dördüncü günde birer enjeksiyon yapılmıştır. Deneysel osteoartrit modelinin oluşması için enjeksiyonun birinci gününden geçerli olmak üzere 6 hafta beklenmiştir (KIKUCHI, 1998). Bu sürenin sonunda hayvanlar termine edildikten sonra eklemler çıkarılmıştır. Alkolde (% 96 'lık) 3 dakika tutulduktan sonra DMEM High Glucose içinde karbondioksit etüvünde 4-5 saat bekletilmiştir. Bu sürenin sonunda eklemde kıkırdak dokusu aseptik şartlar altında ince tabaka halinde soyulmuştur.

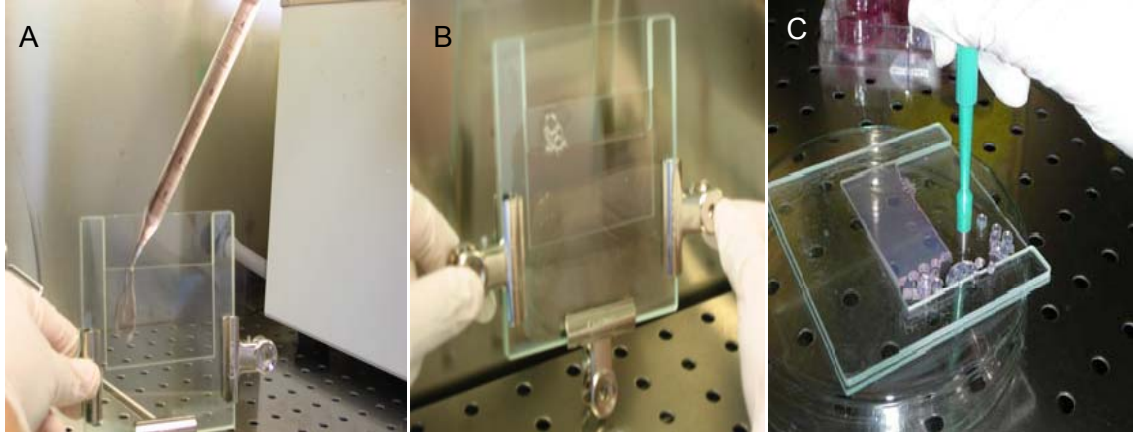
Daha sonra sağlıklı tavşandan kıkırdak elde edilmesinde kullanılan aşamalar uygulanarak kıkırdak hücreleri pellet olarak elde edilmiştir. Hücreler, sağlıklı hücrelerle aynı tip vasat içerisinde ve aynı şartlar altında kültive edilmiş ve pasajlanmıştır. OA'lı hücrelerle yapılan in vitro hücre kültürü deneylerinde 1. ve 2. pasaj kıkırdak hücreleri (kondrositler) kullanılmıştır.

2.2.2. İki Boyutlu İn Vitro Osteoartrit Modelinin Oluşturulması

Sağlıklı yavru tavşandan elde edilen kıkırdak hücreleri 6 kuyucuklu plaka kullanılarak, kuyucuk başına 5×10^4 hücre olacak şekilde ekilmiştir. Hücreler, fetal kalf serum (FCS, % 5), askorbik asit (80 μ M), deksametazon (100 nM), Insulin-transferrin-sodium selenite media supplement (ITS) (% 1) ve streptomisin (% 0.1) içeren DMEM-High Glucose (4.5g/l) vasatı içerisinde kültive edilerek çoğaltılmış ve yeniden farklılaşmaya bırakılmıştır (BARКСBY, 2006). Hücreler 48 saat inkübe edildikten sonra, aynı içerikli vasata serum ilave edilmeksizin interlökin 1 β (20 ng/ml) eklenmiştir. Bu vasatta 48 saat ve 72 saat boyunca hücreler inkübe edilerek iki tip çalışma yürütülmüştür (CORTIAL, 2006). İnkübasyonlar sonunda interlökin 1 β içeren vasat uzaklaştırılarak in vitro OA modeli oluşturulup oluşturulmadığı, standart hücre kültürü ortamında bekletilen bu hücrelerin 7. ve 14. günlerdeki hücre sayıları, GAG sentezi ve kollajen miktarı tayini ile incelenmiştir.

2.2.3. Üç Boyutlu İn Vitro Osteoartrit Modelinin Oluşturulması

Erişkin osteoartritli tavşandan elde edilen kıkırdak hücre süspansiyonu (4×10^6 /ml) % 4'lük düşük sıcaklık jelleşmeye sahip agaroz tip VII (Sigma) ile 1:1 oranında homojen olarak karıştırıldıktan sonra steril elektroforez camları arasına (3 mm cam aralayıcı kullanılarak) dökülmüş ve yarım saat laminer güvenlik kabininde jelleşmeye bırakılmıştır (Şekil 3a ve b) (KAVAS, 2010). Deri biyopsi kalemi ile 5 mm çapı ve 3 mm yüksekliğinde parçalar kesilerek üç boyutlu kondrosit-agaroz diskler elde edilmiştir (Şekil 3c). Bu aşamada hücreler % 5 FCS, 80 μ M askorbik asit, 100 nM deksametazon, % 1 ITS ve % 0.1 streptomisin içeren DMEM-High Glucose (4.5 g/l) vasatı içine kültive edilerek çoğaltılmış ve yeniden farklılaşmaya bırakılmıştır (BARКСBY, 2006). Bu süreç sırasında disklerin besiyeri 3 gün aralıklarla değiştirilerek etkin besin difüzyonu sağlanmıştır. İnkübasyonun ilk gününde, vasata 10 ng/ml interlökin-1 β eklenmiştir ve 72 saat tutulmuştur. İnkübasyon sonunda interlökin-1 β içeren vasat uzaklaştırılarak in vitro OA modeli oluşturulup oluşturulmadığı hücre sayısı, GAG sentezi ve kollajen miktarı tayinleri ile değerlendirilmiştir.



Şekil 3. Üç boyutlu agaroz-kondrosit disklerin hazırlanma aşamaları, a) hücre ve agaroz karışımının 3 mm kalınlığında elektroferez camları arasındaki boşluğa dökülmesi, b) jelin soğuması için steril koşullarda bekletilmesi, c) steril deri biyopsi kalemi ile jelden disklerin kesilmesi.

Mikroküreler ile yapılan in vitro deneylerde üç boyutlu OA modeli için yukarıda belirtilen yöntemde modifikasyon yapılmıştır. Kısaca fosfat tampon çözeltisinde hazırlanmış %2'lik düşük jelleşme sıcaklığına sahip agaroz ($25 \pm 5^\circ\text{C}$) (Sigma) ile %20'lik FCS ve 1 ml'sinde 1×10^6 hücre içeren 2X RPMI-1640 vasat (içeriğinde bulunan tuzlar, amino asitler ve vitaminler normal vasatın iki katı olan RPMI vasatı) eşit hacimde karıştırılmış ve 24 kuyucuklu plakada jelleşmeye bırakılmıştır. Jelleşmesi için 4°C 'de 5 dakika bekletildikten sonra 1 ml %10'luk FCS ve %0.1'lik streptomisin içeren RPMI-1640 vasatı her bir kuyucuğa eklenmiştir. Plakalar 37°C 'de %5 CO_2 ve %95 nem içeren ortamda inkübe edilmişlerdir. Bu süreç sırasında kuyucuklardaki besiyeri 3 gün aralıklarla değiştirilerek etkin besin difüzyonu sağlanmıştır. İnkübasyonun üçüncü gününde, vasata 20 ng/ml interlökin-1 β eklenmiştir. Her vasat değişiminde aynı miktar ilave edilmiştir (KUROKI, 2002). Bu modifikasyonla OA geliştirilmesi için ön deneylerde kullanılan yöntemde görülen disklerin hazırlanması sırasında kontaminasyon, disk boyutu limitasyonu nedeniyle gruplarda az hücre sayısı v.b. bazı sorunlar ve riskler ortadan kaldırılmıştır.

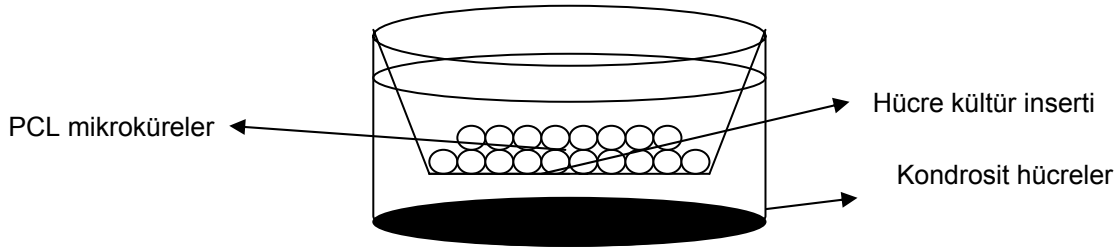
Mikrokürelerle yapılan hücre kültürü çalışmalarında örnekler 4 gruba ayrılmıştır. Bunlar, vasata sadece 20 ng/ml interlökin-1 β eklenen, vasata 20 ng/ml interlökin-1 β ile 5 mg D MS ve vasata 20 ng/ml interlökin-1 β ile 5 mg D-C MS eklenen gruplardır. D MS olarak tanımlanan grup, doksisisiklin yüklü PCL mikrokürelerdir. D-CS MS ise, yine PCL ile hazırlanan kondroitin sülfat-doksisisiklin kombinasyonu yüklü mikrokürelerdir (Tablo 1). Sonuncu grup ise, vasata ne interlökin-1 β , ne de mikroküre eklenmeyen gruplardır.

Mikrokürelerin, Şekil 4'de görülmekte olan hücre kültür inserti kullanılmak suretiye agaroz disklere salım yapması sağlanmıştır. Mikroküre ilaç salım sisteminin OA'ya yönelik etkinliği için İnterlökin-1 β eklendikten sonra 9. ve 15. günlerde agaroz disklerde depolanan ve bu süre

zarfında tüm vasat içine salınan GAG ve kollajen miktarları tayin edilmiş ve agaroz disklerde depolanan DNA miktarı ile normalize edilerek değerlendirilmiştir. Bu sonuçlar kontrol grubu olarak kullanılan OA'li hücre içeren, mikroküre eklenmemiş disklerin aynı süre sonundaki GAG, kollajen ve DNA miktarları ile karşılaştırılmıştır. Ayrıca in vitro deneyler süresince mikrokürelere salınan ilaç miktarının belirlenmesi için vasattan alınan örnekler 341 nm'de spektrofotometrik olarak ölçülmüştür.

Tablo 1. In vitro deneylerde kullanılan Mikroküre deney grupları

Mikroküre grubu	Yüklenen İlaç
D MS	Doksisiklin
D-CS MS	Doksisiklin+kondroitin sülfat



Şekil 4. Mikrokürelerin agaroz diskler üzerine konulduğu hücre kültür inserti

2.2.4. İki ve Üç Boyutlu Osteoartrit Modellerinde Hücre Canlılığının Tayini

İki boyutlu modelde altı kuyucuklu plakaya ekilmiş olan hücrelerin, üç boyutluda ise agaroz içerisindeki kondrosit hücrelerin sayıları MTT testi ile incelenmiştir. Bu yöntemle hücre sayılarının hesaplanması için öncelikle bilinen belirli sayıda kondrosit hücresiyle kalibrasyon eğrisi hazırlanmıştır. İn vitro uygulamalar sonrasında hücre sayılarının ölçülmesi için kuyucuklara DMEM düşük glukoz vasat içerisinde MTT (5 mg/ml) eklenmiş ve 4 saat, 37 °C' de ve % 5 karbondioksit ortamında karanlıkta bekletilmiştir. MTT ortamdan uzaklaştırılıp kuyucuklar fosfat tampon çözeltisi ile yıkanmıştır. Son olarak, DMSO eklenerek 10 dakika orbital çalkalayıcı üzerinde bekletilerek hücre içerisindeki formazan kristallerinin çözülmesi sağlanmıştır. Kuyucukların 550 nm dalga boyundaki ışık tutulum değerleri mikropilaka okuyuculu spektrofotometre (BioTek, USA) ile ölçülmüştür.

2.2.5. İki ve Üç Boyutlu Osteoartrit Modellerinde Kollajen Miktarlarındaki Değişimlerin Belirlenmesi

Hücrelerin kıkırdak matrisindeki temel malzemelerden biri olan kollajeni sentezlemelerindeki değişimleri incelemek için hidrokspirolin testi ile ölçüm yapılmıştır. Bu testle hem hücreli disklerin inkübe edildikleri vasat hem de kendileri ayrı ayrı değerlendirilmiştir. Diskler, papain (Tip III, 125 µg/ml, 2 mM dithiothreitol içeren) ile 60 °C' de 20 saat parçalanmıştır. Agaroz jelleri tamamen eritmek için diskler 70 °C' de 10 dakika daha bekletildikten sonra karıştırıcı ile karıştırılmış ve 12 000 devirde, 10 °C' de, 5 dakika çevirilerek santrifuj edilmiştir. Papain ile parçalanmış hücreler ve disklerden 100 µl örnekler alınarak NaOH ile karıştırılmış ve otoklavlanmıştır. Daha sonra karışım kloramin T ile karıştırıldıktan sonra Ehrlich aldehit reaktifi ile karıştırılmak suretiyle kromofor oluşumu için 65°C'de 20 dakika bekletilmiştir. Aynı işlem toplanan vasata da uygulanmıştır. Daha sonra 550 nm'de spektrofotometrik ölçümle hidrokspirolin tayinleri yapılmıştır. 4-L-hidrokspirolinin standart olarak kullanılması ile hazırlanan kalibrasyon eğrisi hidrokspirolin hesaplamalarında kullanılmıştır. Hidrokspirolinde kollajene çevirme faktörü 8 olarak kabul edilmektedir. (REDDY, 1996). Disklerin kollajen miktarı için DNA ile normalizasyon yapılmıştır.

2.2.6. İki ve Üç Boyutlu Osteoartrit Modellerinde Glikozaminoglikan Miktarlarındaki Değişimlerin Belirlenmesi

Interlökin 1β ile etkileşim sonrasındaki inkübasyon süresince agaroz-kondrosit disklere hücreler tarafından depolanan ve vasata salınan sülfatlı glikozaminoglikan (sGAG) miktarları Dimetilmetilen mavisi (DMMB) testi (Glisin/NaCl içerisinde 16 µg DMMB/ml, çözeltisi, pH 3) ile belirlenmiştir (FARNDALE, 1986). Kalibrasyon eğrisi farklı miktarlarda kondroitin sülfatın (0-5 µg) 10 mM EDTA içeren fosfat tampon çözeltisi (pH 6.5) içerisinde çözülerek spektrofotometrik ölçülmesi ile hazırlanmıştır. Toplam sGAG miktarlarının tayini için vasat ve diskler/hücreler toplanmış olup, diskler/hücreler papain (Tip III, 125 µg/ml, 2 mM dithiothreitol içeren) ile 60 °C' de 20 saat parçalanmıştır. Agaroz jelleri tamamen eritmek için diskler 70 °C' de 10 dakika daha bekletildikten sonra karıştırıcı ile karıştırılmış ve 12 000 devirde, 10 °C' de, 5 dakika çevirilerek santrifuj edilmiştir. Supernatantın 50 µl'si 1.25 ml DMMB boya çözeltisi ile 24 kuyucuklu plaka içerisinde karıştırılmış ve 525 nm dalga boyundaki ışık tutulum değerleri ölçülmüştür. Aynı şekilde toplanan hücre vasatının 50 µl'si 1.25 ml DMMB boya çözeltisi ile 24 kuyucuklu plaka içerisinde karıştırılmış ve 525 nm dalga boyundaki ışık tutulum değerleri ölçülmüştür. Ölçüm sonuçları kalibrasyon eğrisinden elde edilen denklem kullanılarak diskler ve vasatlar için ayrı ayrı sGAG miktarlarına dönüştürülmüştür. Hücre ve diskten ölçülen GAG miktarları hoechst boyası kullanılarak florimetrik olarak bulunan DNA miktarları ile normalize edilmiştir.

2.2.7. İki ve Üç Boyutlu Osteoartrit Modellerinde Hücrelerin DNA Miktarlarının Tayini

Floresan boyalar (örn. Hoechst boyası, DAPI, propidium iyodür) DNA'ya bağlanabildiklerinden hücrenin kromatinini dolayısıyla çekirdeği görünür hale gelebilir. Bu yöntemde canlı veya ölü tüm hücreleri boyayabilen bir boya kullanılır. Ancak ölü ve canlı hücre ayrımı net olarak yapılabildiğinden, kesin ve net sonuç alınmış olur. Burada canlılığın belirleyicisi hücre zarının bütünlüğünün bozulmamış olmasıdır. Projede papain ile parçalanmış hücreler/disklerin DNA miktarları Hoechst 33258 boyası (Invitrogen) ile florimetrik yöntemle Modulus Fluorometer cihazı kullanılarak ölçülmüştür. Hoechst 33258 350 nm'de eksitasyon ve 450 nm emisyon dalga boylarına sahiptir (MASUOKA, 2005). DNA miktarları buzağı timusundan elde edilen DNA standartı ile Modulus Fluorimeter cihazının kalibre edilmesi sonucu miktersal olarak ölçülmektedir. Bu değerler GAG ve kollajen miktarlarının normalize edilmesi için kullanılmıştır. DNA tayini için cihazın protokolü kullanılmıştır.

2.2.8. İn Vitro Osteoartrit Modelinde Matriks Metalloproteinaz-13 (MMP-13) Miktarı/Aktivitesinin Ölçülmesi

Örneklerin MMP-13 enzim miktarı/aktivitesi enzime bağlı immunosorbent analiz (ELISA) yöntemi ile belirlenmiştir. İn vitro deneyler sonrasında gruplara ait vasatlar toplanmış ve -80 °C'de saklanmıştır. Tavşan MMP-13 molekülüne uygun olarak alınan ELİZA Kit'in (Cusabio, ABD) protokolüne uygun olarak ölçümler yapılmıştır. Bütün örnekler 2 tekrarlı ölçülmüş ve sonuçlar standart MMP-13 konsantrasyonları için elde edilen kalibrasyon eğrisi (konsantrasyon-Optik yoğunluk) ile konsantrasyon değerlerine çevrilmiştir.

2.2.9. İn Vitro Deneylerde Salınan Doksisisiklin Miktarının Ölçülmesi

İN vitro 3 boyutlu osteoartrit modeli çalışmalarında mikrokürelerden ortama salınan doksisisiklin miktarı spektrofotometrik yöntemle 341 nm'de abzorban ölçümleri ile belirlenmiştir. Hücre kültür vasatı içine salınan ilaç miktarının belirlenmesi için hücre kültür vasatı içinde ilaç için kalibrasyon eğrisi oluşturulmuştur.

2.3. İn Vivo Osteoartrit Modelinin Oluşturulması ve Değerlendirilmesi için Yapılan Test ve Ölçümler

DeneySEL Osteoartrit oluşumu yukarıda anlatılan (bölüm 2.2.1.) kollajenaz uygulaması tek sefer veya birinci ve dördüncü gün olacak şekilde iki sefer enjeksiyon yapılması ile araştırılmıştır. Deney gruplarında anestezi altında arka bacak diz eklemlerinde artirit oluşturmak amacıyla kollajenaz tip II (*Clostridium histolyticum*)(Sigma)(626 units/ mg katı kollajen enzim aktivitesine sahip) enjekte edilmiştir. Enjeksiyon sonrasında eklem kıkırdağında oluşacak hasarın saptanması için yine anestezi altında eklem radyografileri 3.

ve 6. haftalarda alınmıştır. Deneysel osteoartrit modelinin oluşması için enjeksiyonun birinci gününden geçerli olmak üzere tek enjeksiyon uygulamalarında 5 hafta 2 enjeksiyon uygulamalarında ise 6 hafta beklenmiştir (KIKUCHI, 1998). Tek ve iki kollajenaz enjeksiyon yapılan tavşanların eklemleri sırasıyla 4 ve 6 hafta sonunda çıkartılmış ve histolojik incelemeler için Hacettepe Tıp Fakültesi Histoloji AD'na gönderilmiştir.

İn vivo OA modeli oluşumu için 6 hafta beklendikten sonra tavşanlar gruplara ayrılmıştır. Tablo 2'de bu gruplar görülmektedir. İlk grup tavşanlara tedavi uygulanmamıştır. İkinci grup tavşanlara hyaluronan enjekte edilmiştir. Üçüncü ve dördüncü grup tavşanlara Tablo 1'deki mikroküreler enjekte edilmiştir. Hyaluronan enjekte edilen grup 4 ve 8 hafta bekletildikten sonra sonlandırılmıştır. Tablo 1'de özellikleri verilen bu iki grup mikroküre ile iki ayrı doz çalışması yapılmıştır. Buna göre hyaluronan (HYL) ile birlikte 5 mg D MS ve 7.5 mg D MS karıştırılmıştır. Aynı şekilde yine hyaluronan (HYL) ile birlikte 5 mg D-CS MS ve 7.5 mg D-CS MS karıştırılmıştır. Daha sonra tavşanlara enjekte edilmiştir. Mikroküre enjekte edilen gruplar ise 8 hafta bekletilmiştir. Çıkarılan eklemlerin radyolojisi çekilmiştir. OA modelinin belirlenmesi için röntgenlere radyolojik skorlama (Kellgren-Lawrence Model) yapılmıştır. Hyaluronan ve mikroküre enjeksiyonu yapılan gruplar da histolojik incelemelere tabi tutulmak amacıyla Hacettepe Üniversitesi Histoloji ve Embriyoloji ABD'na götürülmüştür

Tablo 2. İn vivo deney grupları

Grup No	Açıklamalar
1	Sağlıklı eklem (Pozitif kontrol)
2	Osteoartrit Model (2 enjeksiyon)
3	Osteoartritli tedavi edilmemiş eklem (8 hafta)
4	Osteoartritli eklem hyaluronan (HYL) tedavisi (4 hafta)
5	Osteoartritli eklem hyaluronan (HYL) tedavisi (8 hafta)
6	Osteoartritli eklem 5 mg D MS ile HYL tedavisi (8 hafta)
7	Osteoartritli eklem 7.5 mg D MS ile HYL tedavisi (8 hafta)
8	Osteoartritli eklem 5 mg D-CS MS ile HYL tedavisi (8 hafta)
9	Osteoartritli eklem 7.5 mg D-CS MS ile HYL tedavisi (8 hafta)
10	Osteoartrit Model (Tekli enjeksiyon)

2.3.1. Radyolojik Değerlendirmeler

Tedavilerin başlatılmasından belirli süreler sonrasında denekler sonlandırılmış ve uygulama yapılan eklemler radyolojik ve histolojik değerlendirmeler için çıkartılmıştır. Örneklerin röntgen filmleri ODTÜ Sağlık ve Rehberlik Merkezinde bulunan Siemens Multix-C röntgen

makinesi ile alınmıştır. Röntgen makinesi 3.2 mA/s ve 42KW'ye ve X ışını kaynağının diz eklemlerine uzaklığı 100 cm olacak şekilde ayarlanmıştır ve Agfa Crurix film kullanılmıştır. OA'in düzeyinin radyolojik değerlendirilmesi için radyolojik skorlama kullanılmıştır. Eklemler Kellgren-Lawrence metoduna göre Tablo 7'de verilen ölçülerle grupları bilmeyen iki ortopedi cerrahı tarafından skorlanmıştır.

Tablo 3. Tibiofemoral eklemlerde Osteoartrit düzeyinin Kellgren-Lawrence Radyolojik değerlendirmesi ölçeği (KIJOWSKI, 2006).

Derece	Açıklama
0	Radyolojik değişiklik yok
1	Belli belirsiz eklem daralması ve osteofit oluşumu başlangıcı
2	Belirli osteofit oluşumu ile birlikte hasar görmemiş eklem boşluğu
3	Belirli osteofit oluşumu ile birlikte orta düzeyde eklem daralması
4	Belirli osteofit oluşumu ile birlikte ciddi hasarlı eklem boşluğu daralması ve subkondral skleroz

2.3.2. Histolojik İncelemede Kullanılan Gereç ve Yöntemler

Eklem örnekleri uygun cerrahi yöntemle çıkarıldıktan sonra % 10luk nötral formalin çözeltisinde (pH 7.0) oda ısısında radyolojik incelemeye alındı. Ardından tüm örnekler De Castro çözeltisinde (kloral hidrat, nitrik asit, distile su) deaklsifiye edildikten sonra vakumlu otomatik doku takip cihazında parafine gömüldü. Doku takip cihazında teknisyen hatası nedeniyle parafinin dokuya iyi entegre olmadığı doku örnekleri izlem dışı bırakıldı. Kalan iyi örnekler incelemeye alındı. Bu örneklerden elde edilen 5–7 mikrometrelik kesitler hematoksilin & eozin (HE), Masson trikrom (MT) ve safranin O (SO) ile boyandı. Her örnekten elde edilen fotomikrograflar (Leica, DMR) ışık mikroskobuna ekli bilgisayar bağlantılı dijital kamera aracılığıyla elde edildi (Model DFC 480, Leica Westlar Almanya). Mankin ve OARSI kırıkda hasar skorlama sistemleri kullanıldı (PRIZKER, 2006; FARSHID, 2009). Mankin skorlama sisteminde kırıkda yapısı, sınırının bütünlüğü, proteoglikan boyanması ve hücre içeriği değerlendirilmektedir. OARSI skoru ise her örneğe ait OARSI derecesi (grade) ve evresinin (stage) çarpımı ile elde edilir (Tablolar 5,6,7). Grade (derece) OA'deki derinlemesine doku hasarını gösterir. Stage (evre) OA'li eklemin bir ucundan diğer ucuna horizontal tutulumunu ifade eder. OARSI skoru hem grade hem de stage'i içerir.

Tablo 4. Mankin'in histolojik kırıldak hasarı skorum sistemi (FARSHID, 2009)

Yapı	Skor
Normal	0
Yüzey düzensizlikleri	1
Pannus	2
Tranzisyonel zona yarık	3
Radyal zona yarık	4
Kalsifiye zona yarık	5
Tümenden disorganizasyon	6
Tidemark/ sınır integritesi	
Intakt	0
Kan damarları tarafından geçilmiş	1
Proteoglikan boyanması	
Normal	0
Hafif azalma	1
Orta derecede azalma	2
Ciddi azalma	3
Hiç boyanmama	4
Hüresellik	
Normal	0
Diffüz hiperselülarite	1
Cloning	2
Hiposelülarite	3

Tablo 5. Pritzker ve diğ.ne göre kırıkta hasarı skorlama sistemi (PRIZKER, 2006; FARSHID, 2009)

Grade 0:
Yüzey intakt
Kırıkta morfolojisi intakt
Matriks normal yapıda
Hücreler intact, doğru düzenlenimli
Grade 1:
Yüzey intakt
Matriks: Yüzeyel zon intakt, ödem, ve/veya , yüzeyel fibrilasyon, abrazyon, fokal yüzeyel matriks kondansasyonu
Hücreler: Ölü, proliferasyon (yığınlar), hipertrofi death, proliferation (clusters)
Yüzeyel zon reaksiyonu fibrilasyondan daha fazla
Grade 2:
Yüzey devamlı değil
Matriks: Yüzeyel zon devamlı değil, derin fibrilasyon
Kırıktağin üst 1/3ünde katyonik boya ile matriks deplesyonu (Safranin O ya da Toluidine Blue)
Orta zonda fokal perikondriyal artmış boyanma
Kondron kolonlarında yönelim bozukluğu
Hücreler: Ölüm, proliferasyon (yığınlar), hipertrofi
Grade 3:
Vertikal yarıklar
Matrikste midzona doğru vertika yarıklar, dallanmış fissürler,
Alt 2/3 kırıkta (derin zon) katyonik boyanma yokluğu(Safranin O ya da Toluidine Blue)
Polarize ışık mikroskopunda yeni kollagen yapımı
Hücreler: Fissürlere yakın bölgede ölüm, rejenerasyon (yığınlar), hipertrofi.
Grade 4:
Erozyon
Kırıkta matriks kaybı: Yüzeyel katın delaminasyonu, orta katta kist oluşumu
Ekskavasyon: Yüzeyel ve orta katta matriks kaybı
Grade 5:
Denüdasyon
Yüzeyin denüdasyonu, sklerotik kemik ve çıplak yüzeylerin içinde fibröz kırıkta içeren tamir dokusu
Kemik yüzeyine sınırlı tamir içeren mikrokırıklar
Grade 6:
Deformasyon
Osteofitten daha fazla kemik yeniden yapılanması
Mikrokırıklar:Fibröz kırıkta ve kemik yapısında tamir alanı içeren ve önceki yüzeye uzanan biçimde

Tablo 6. OA skor -yarı kantitatif metod (skor=derece x evre)

Derece	Evre			
	S1	S2	S3	S4
G1	1	2	3	4
G2	2	4	6	8
G3	3	6	9	12
G4	4	8	12	16
G5	5	10	15	20
G6	6	12	18	24

Tablo 7. OA kırıkta histopatoloji-evre değerlendirilmesi (Evre=kırıkta hareketinin ölçüsü)

Evre	% katılım (yüzey, alan, hacim)
0	OA aktivitesi görülmez
1	<10 %
2	10-25 %
3	25-50 %
4	> 50 %

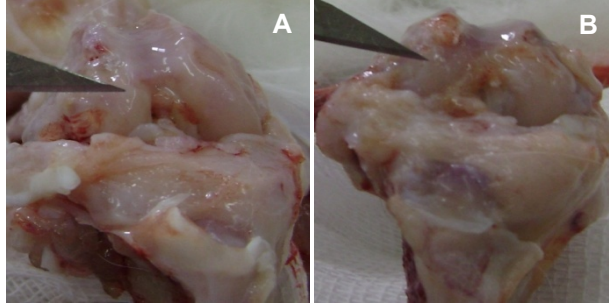
2.3.3. Biyomekanik Testler

Eklem kırıktağının medyal ve lateral femoral kondyl bölgelerinin sertlik (hardness) değerleri bu amaç için dizayn edilmiş durometre mekanik test cihazıyla (Kori Seiki, Japonya) ölçülmüştür. Ölçümler deneklerin terminasyonundan hemen sonra, oda sıcaklığında ASTM D2240 standartlarında (NIEDERAUER, 2004) ve 0-99 arası ölçekle yapılmıştır. Bu ölçümlerde düşük değerler kırıkta dokusunda mekanik dayanımın (sertliğin) azalmasını göstermektedir. Her kondylden 3 ölçüm alınmış ve ortalama değerler hesaplanmıştır.

Mekanik test cihazı ölçüm prensibi temelde Rockwell Sertlik presibine dayanmaktadır. Ölçülen örneğin sertlik düzeyine göre kullanılan probun geometrisi konik, yuvarlak, hatta düz yapıda olabilir. Ölçülen sertlik Shore A sertlik, Shore D sertlik v.b şekilde isimlendirilir. Sert numuneler için kullanılan probe örneği ve ölçüm sistemi şekil 5' te, ölçüm bölgeleri Şekil 6 ve ölçümün yapılması Şekil 7'de gösterilmiştir.



Şekil 5. Sertlik Ölçüm cihazı (Durometer)



Şekil 6. İndentasyon test bölgelerinin lokasyonu eklem kıkırdağının medyal (a) ve lateral (b) bölgeleri lanset ile belirtilmektedir.



Şekil 7. Çıkarılan eklemlerin indentasyon cihazı ile sertlik ölçümlerinin yapılması

2.4. İstatiksel Analizler

2.4.1. In vitro Uygulama Sonuçlarının Değerlendirilmesinde Kullanılan İstatistiksel Analizler

Sağlıklı ve osteoartritli kontroller ile deney grupları arasındaki farklılıkları karşılaştırmak için Mann-Whitney U testi kullanılarak ikili karşılaştırmalar yapılmıştır (SPSS-9 Software, SPSS Inc., ABD). Gruplar arası farklar için $p < 0.05$ seviyesi anlamlı olarak kabul edilmiştir.

2.4.2. In vivo Uygulama Sonuçlarının Değerlendirilmesinde Kullanılan İstatistiksel Analizler

In vivo sonuçların istatistiksel değerlendirilmesinde histoloji ve radyoloji test parametreleri bağımlı değişken, gruplar bağımsız değişken olarak alınmıştır. Dağılımın normalitesi ve

örnek varyanslarının homojenliği Shapiro-Wilk test ile gösterilmiştir. Bütün parametrelerde Kruskal-Wallis testi ile tüm gruplar için çoklu istatistiksel karşılaştırmalar ve Dunn post-hoc testi ile ikili karşılaştırmalar yapılmıştır. Histoloji ve radyoloji ölçümleri arasında korelasyon Spearman test ile değerlendirilmiştir. Fried test / post-hoc testi ile zamanla ilgili farklılıklar belirlenmiştir. Betimsel istatistik değerleri medyan, minimum ve maksimum olarak gösterilmiştir. Gruplar arası farklar $p < 0.05$ seviyesinde anlamlı olarak kabul edilmiştir.

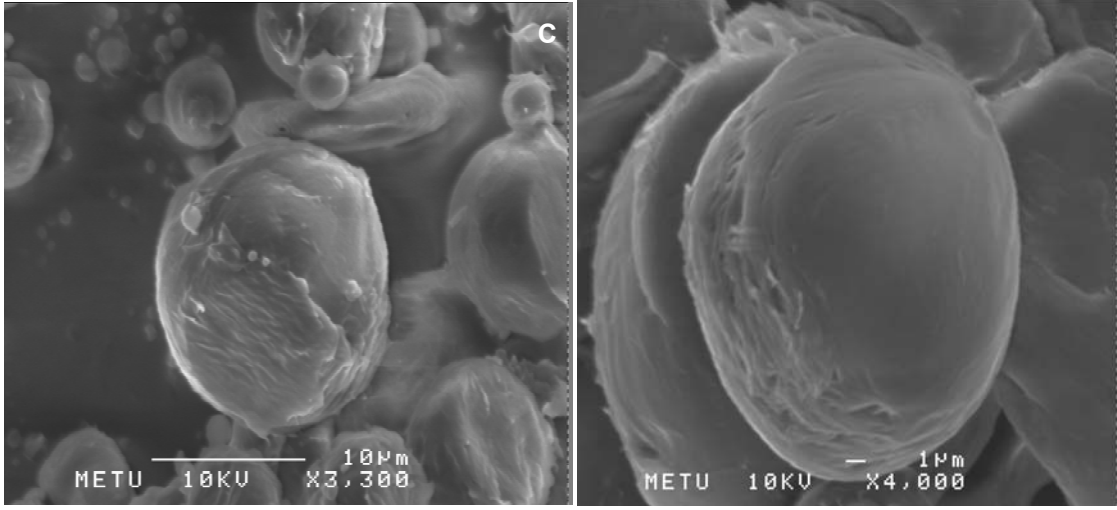
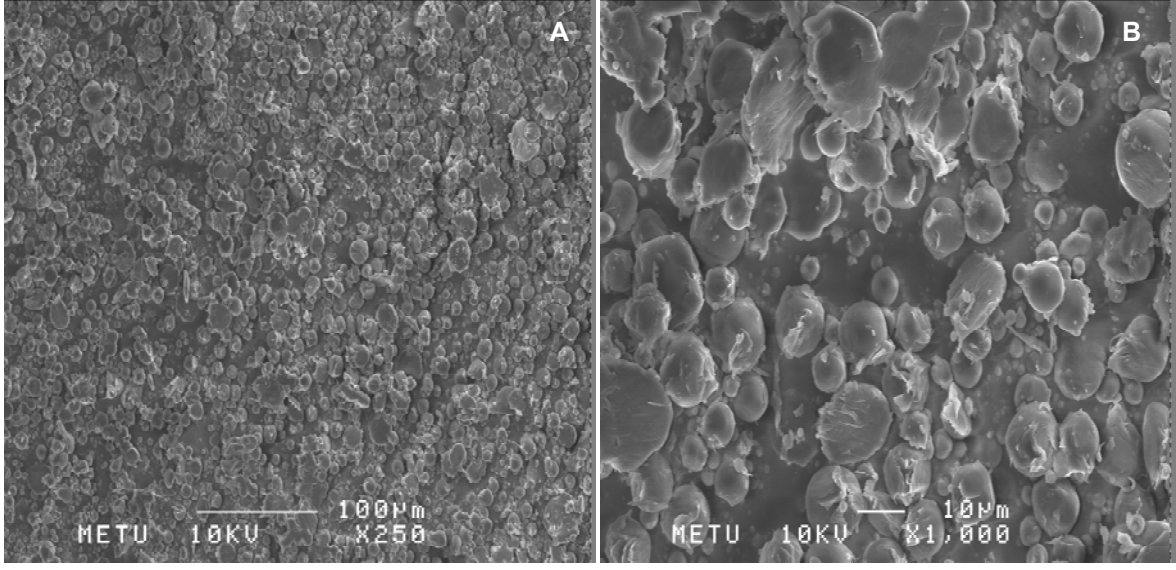
3. Bulgular ve Tartışma

3.1. In situ Deneylerin Bulguları

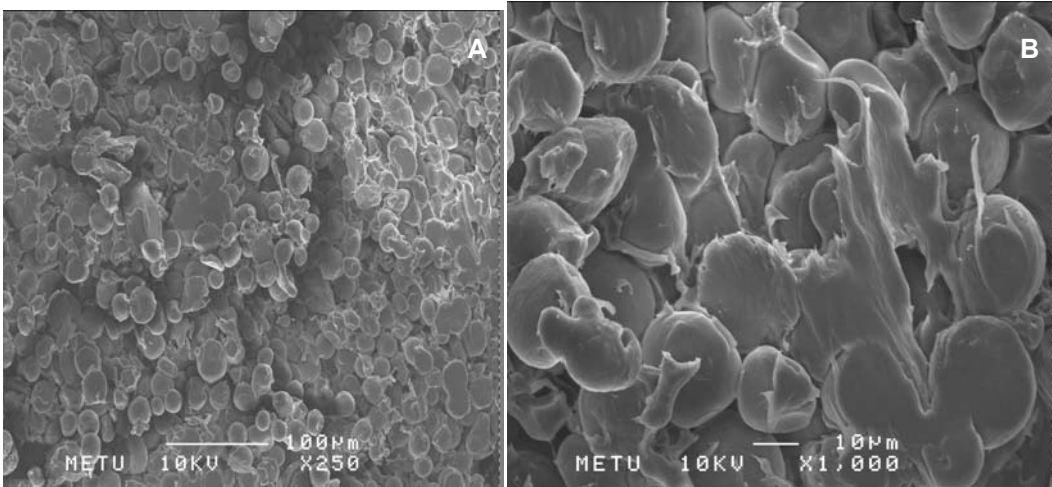
3.1.1. Kondroitin Sülfat-Doksisiklin Kombinasyonu Yüklü Mikrokürelerin Yüzey Özellikleri ve Morfolojileri

Kondroitin sülfat yüklü PCL mikroküreler iki çeşit sörfektan (% 4 PVA ve % 1 PVA- % 1 jelatin) kullanılarak yüksek ve düşük molekül ağırlıklı PCL'den yapılmıştır. Kondroitin sülfatın sulu faza geçişinin engellenmesi için su fazı içinde yağ fazının oluşturulması homojenizasyonla sağlanabilmektedir. Bu yöntemle elde edilen mikrokürelerin (yaklaşık ortalama 10 µm çapında) konvansiyonel karıştırma ile hazırlanan mikrokürelerden daha küçük olduğu gözlenmiştir (O'DONNEL, 1997). ODTÜ Metalurji ve Malzeme Mühendisliği Bölümü'nde bulunan Taramalı Elektron Mikroskobu (SEM) ile mikrokürelerin morfolojik analizleri yapılmış ve fotoğrafları çekilmiştir. Şekil 8'de sörfektan olarak %4'lük PVA'nın kullanıldığı, kondroitin sülfat içeren PCL (14kDa) mikroküreler görülmektedir. Mikroküre yüzeyleri yakından incelendiğinde (Şekil 8c ve d) yüzeylerinin düzgün, olduğu ve mikrokürelerin çok katmanlı polimer tabakaları şeklinde oluştuğu görülmüştür. Mikrokürelerin gözeneklerinin bu büyütmeye (x3000-4000) gözlenmeyecek kadar küçük olduğu düşünülmektedir. Bu mikrokürelerin çapı yaklaşık 13 µm civarında olmakla birlikte Şekil 8a ve b' de daha farklı boyutlarda mikrokürelerin de olduğu görülmektedir.

Sörfektan olarak % 1 PVA+jelatin kullanılarak hazırlanan mikrokürelerin elektron mikrografi görüntüleri Şekil 9a ve b'de sunulmaktadır. Şekil 9a ya göre daha yoğun ve yüksek miktarda mikroküre oluşumu görüntüsü veren bu set mikrokürelerin yakından bakıldığında (Şekil 9b) birbirine yüzeyden yapışarak agregat oluşturduğu ve formlarının düzgün olmadığı gözlenmiştir. Bu yapı, mikrokürelerin yıkanması sonrasında bile toz yerine plakalar halinde toplanabilmesi ile de farkedilmiştir. Bu sonuçlar, %1 PVA-jelatin kombinasyonunun sörfektan olarak kullanılmasıyla elde edilen salım sistemlerinin in vivo deneylere uygun olmadığını düşündürmektedir.

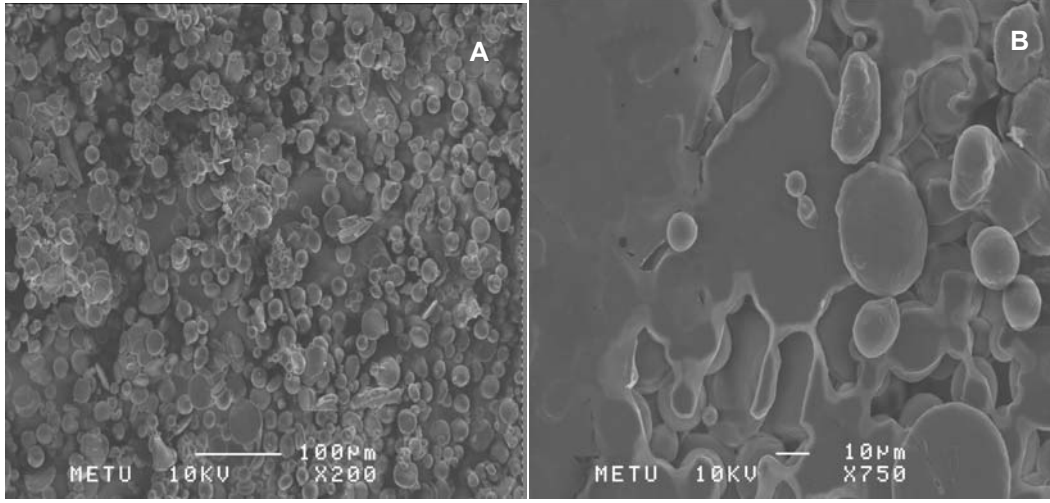


Şekil 8. % 4'lük PVA ile hazırlanmış kondroitin sülfat yüklü PCL (14 kDa) mikrokürelerin taramalı elektron mikroskobu mikrografileri



Şekil 9. % 1 PVA+%1 jelatin ile hazırlanmış kondroitin sülfat yüklü PCL (14 kDa) mikrokürelerin taramalı elektron mikroskobu mikrografileri

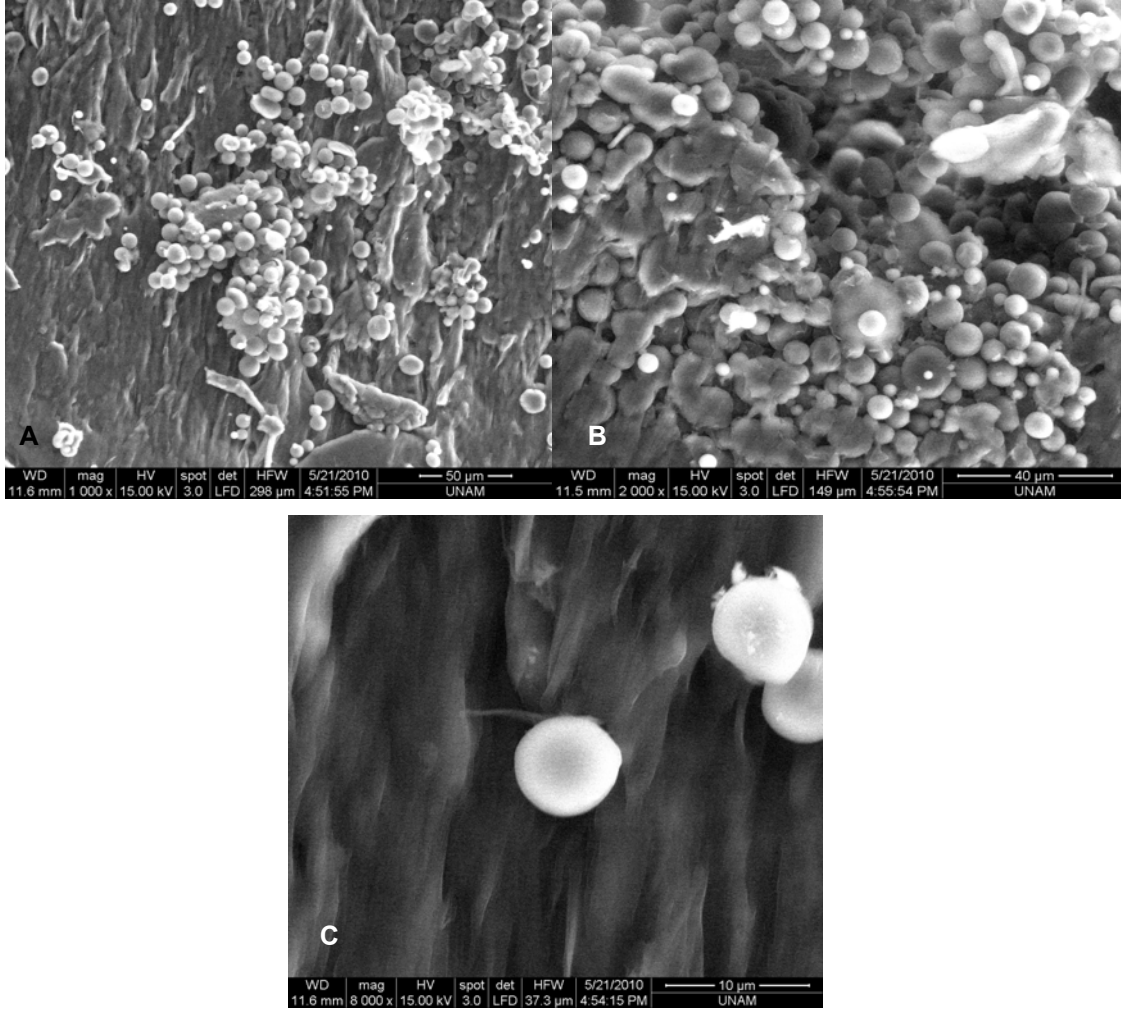
Yüksek molekül ağırlıklı PCL (65 kDa) ile hazırlanan kondroitin sülfat mikroküreler de yine önce % 4'lük PVA kullanılarak oluşturulmuştur. Şekil 10a ve b'de hazırlanan mikrokürelerin mikrografileri verilmektedir. Şekil 10a'da 200 kez büyütmede mikroküre boyut dağılımının homojen olduğu gözlenmiştir. Ancak büyütme oranı 1000'e (Şekil 10b) çıkartıldığında mikrokürelerin alt tabakasında membran gibi bir oluşum olduğu ve dolayısıyla mikrokürelerin bu şekilde birbirine yapıştığı görülmektedir.



Şekil 10. % 4'lük PVA ile hazırlanmış kondroitin sülfat yüklü PCL (65kDa) mikrokürelerin taramalı elektron mikroskobu mikrografileri

Şekil 8, 9 ve 10'teki mikrografilerin değerlendirilmesi sonucunda mikrokürelerin hazırlanması için düşük molekül ağırlıklı PCL ile % 4 PVA kullanılmasına karar verilmiştir. Bu koşullarla doksisiklin ve kondroitin sülfatı birlikte içeren PCL mikroküreler hazırlanmıştır (Şekil 11).

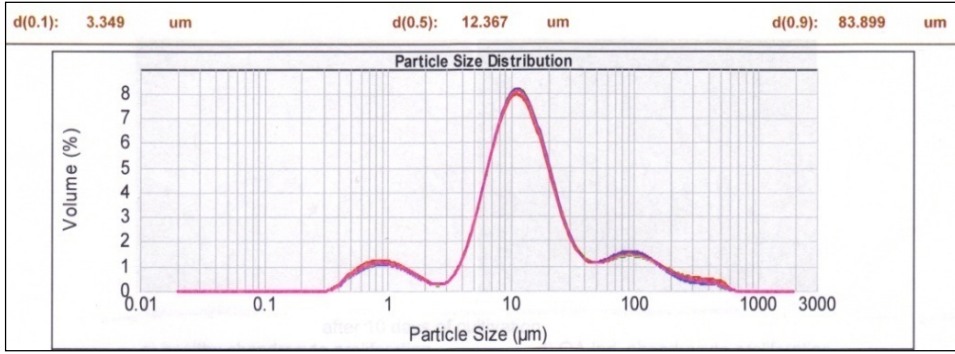
Şekil 11 a ve b'de mikrokürelerin dağılımları gözlemlenmektedir. Ancak, bu analizlerde Şekil 10'daki gibi membransı bir tabakanın oluştuğu ve mikrokürelerin bu tabakaya yapışık olduğu görülmektedir. Şekil 11c'de oluşan mikrokürenin şekil olarak düzgün ve yüzeysel yapısının pürüzsüz olduğu görülmektedir.



Şekil 11. % 4'lük PVA ile hazırlanmış doksisisiklin ve kondroitin sülfat yüklü PCL (14 kDa) mikrokürelerin taramalı elektron mikroskobu mikrografileri

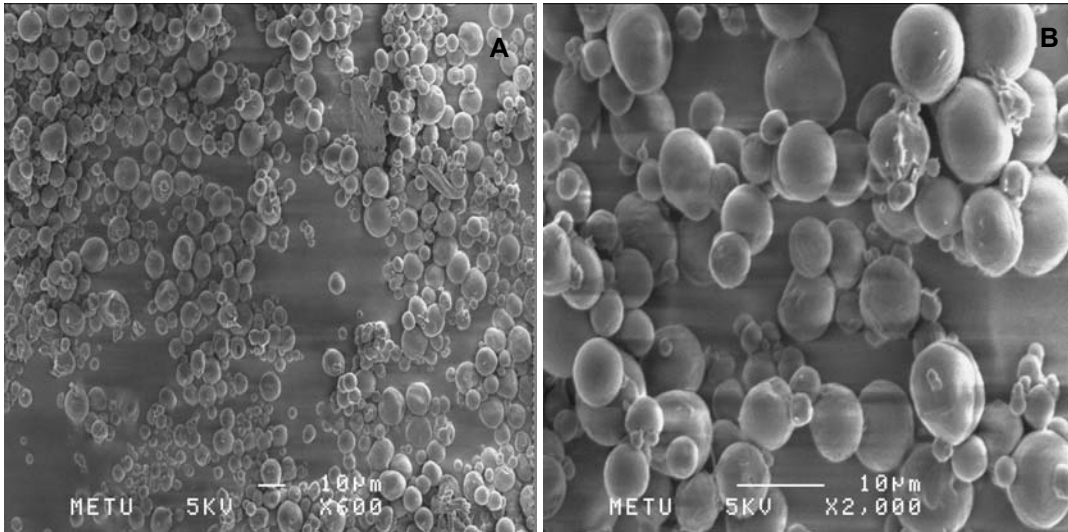
3.1.2. Kondroitin Sülfat-Doksisisiklin Kombinasyonu Yüklü Mikrokürelerin Boyut Dağılımları

Hazırlanan mikrokürelerin boyut dağılımı ve ortalama boyutları ODTÜ Merkezi Laboratuvarı'nda yapılan parçacık boyutu analizi ile belirlenmiştir (Şekil 12). Buna göre mikrokürelerin % 50'sinin çapının, 12 µm'nin altında olduğu ve % 90'ının çapının ise 85 µm'nin altında olduğu görülmektedir. Mikrokürelerin oldukça homojen bir boyut dağılımı oluşturduğu gözlenmiştir. Bu boyutların eklem bölgesine enjeksiyon için uygunluğu proje danışmanlarınca onaylanmıştır.



Şekil 12. D-CS kombinasyonu yüklü PCL mikrokürelere ait parçacık boyut analizi grafiği

Şekil 13'de ise hazırlanan ikili ajan yüklü mikrokürelere ait taramalı elektron mikroskopisi (SEM) ile elde edilen görüntüleri sunulmaktadır.



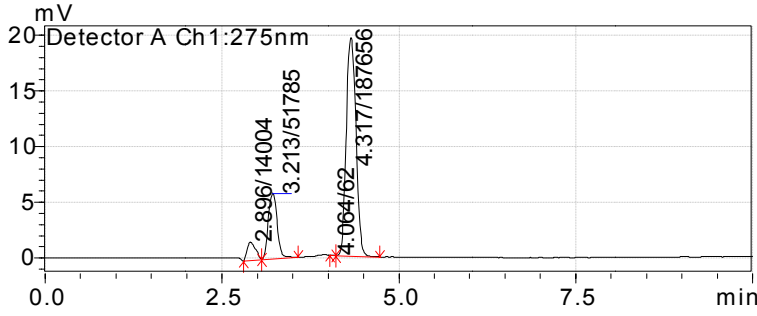
Şekil 13. D-CS kombinasyonu yüklü PCL mikrokürelere ait taramalı elektron mikroskopisi görüntüleri

Şekil 13'de mikrokürelere ait boyut dağılımının homojen olduğu ve yüzeylerinin pürüzsüz olduğu görülmektedir. Boyut analizi sonuçları ile uyumlu olarak mikrokürelere ait çoğunluğunun çapının 15 µm civarında olduğunu göstermektedir. Ayrıca bu mikrokürelere ait agregatlar oluşturmadığı ve sadece CS yüklü mikrokürelere göre formlarının daha düzgün olduğu gözlenmiştir.

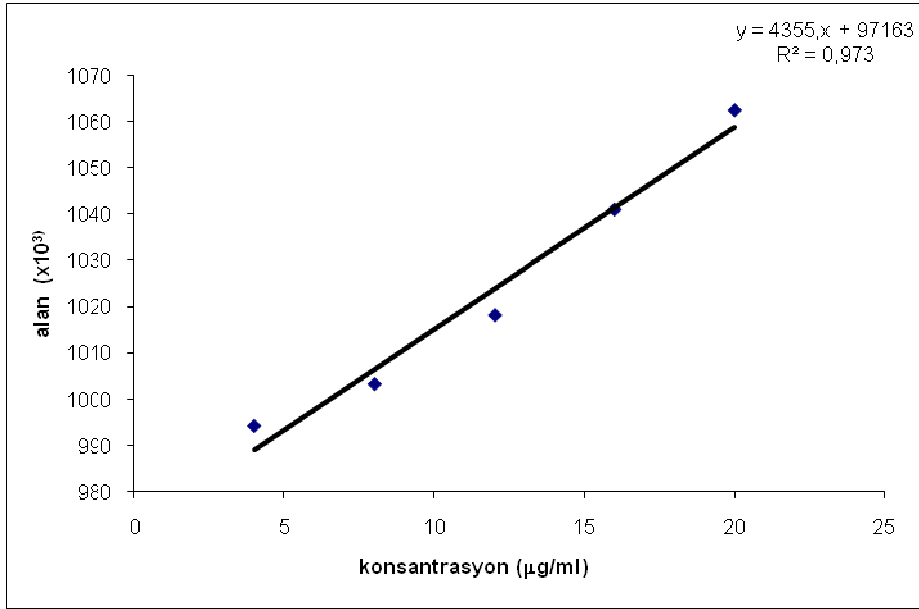
3.1.3. Kondroitin Sülfat-Doksisiklin Kombinasyonu Yüklü Mikrokürelere Hapsolan İlaç Miktarının Belirlenmesi

D-CS kombinasyonu yüklü PCL mikrokürelere hapsolan ilaç miktarının belirlenmesi için HPLC yöntemi kullanılmıştır. Mikrokürelere ait ekstrakte edildikleri tetrahidrofuran-metanol çözeltisinden alınan örnekler HPLC sistemine enjekte edilmiştir. Aynı şekilde biinen ilaç konsantrasyonundaki standartlar da HPLC sistemine enjekte edilmişlerdir. Şekil 14'de

doksisikline ait standart tepe noktasının gösterildiği kromatogram verilmektedir. Eğri altında kalan alan daha sonra hazırlanan kalibrasyon eğrisine göre ilaç konsantrasyonuna, oradan da toplam ilaç miktarına dönüştürülmüştür (Şekil 15).



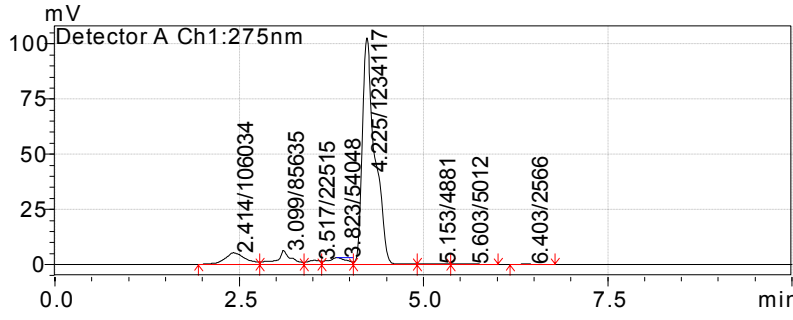
Şekil 14. Doksisikline ait standart tepe noktası (5 µg/ml)



Şekil 15. Doksisiklin miktarlarının belirlenmesi için HPLC analizlerinde kullanılan kalibrasyon eğrisi

Şekil 16'da hapsedilen ilaç miktarını gösteren tepe noktası bulunmaktadır. Eğri altında kalan alan ile tepe noktasının geliş zamanı grafikte görülmektedir.

Hapsedilen ilaç yüzdesi ve hapsolma verimi de yüklenen ilaç miktarından yola çıkılarak metodlar kısmında verilen denklem (1) ve (2) kullanılarak hesaplanmıştır. Buna göre yüklenen ilaç miktarı, % 10.1 iken, hapsolma verimi % 30.4 olarak hesaplanmıştır.

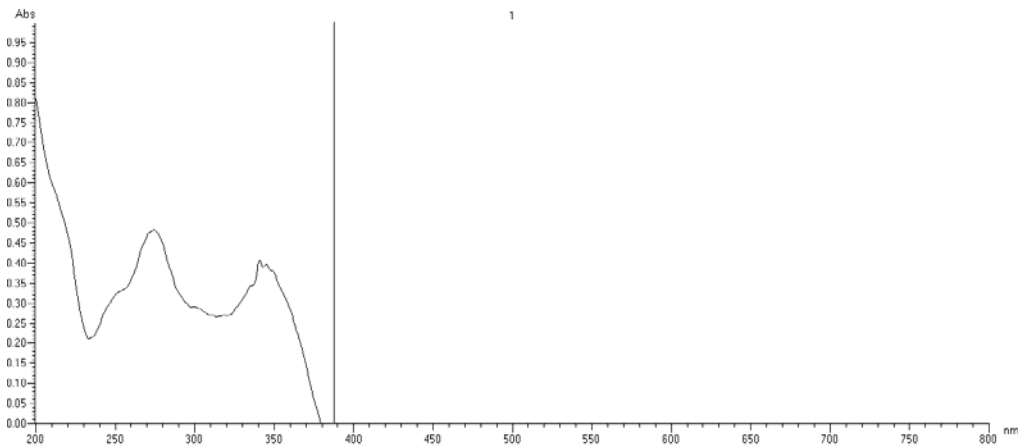


Şekil 16. D-CS kombinasyonu yüklü PCL mikrokürelere ait ilaç miktarını gösteren tepe noktası

3.1.4. Kondroitin Sülfat-Doksisisiklin Kombinasyonu Yüklü Mikrokürelere Salım Profillerinin İncelenmesi

Projede OA hastalığının uzun süreçte tedavi gerektirmesi nedeniyle intraartiküler enjekte edilecek salım sisteminin iki ajanı da kontrollü ve uzun süreçte salması hedeflenmiştir. Bu sayede tek seferde kolaylıkla uygulanabilecek ve etkin tedavi yapabilecek bir sistem geliştirilmesi sağlanabilecektir. Bu nedenle hazırlanan D-CS mikrokürelere fosfat tamponu içinde 37°C’de salım çalışmaları gerçekleştirilmiştir.

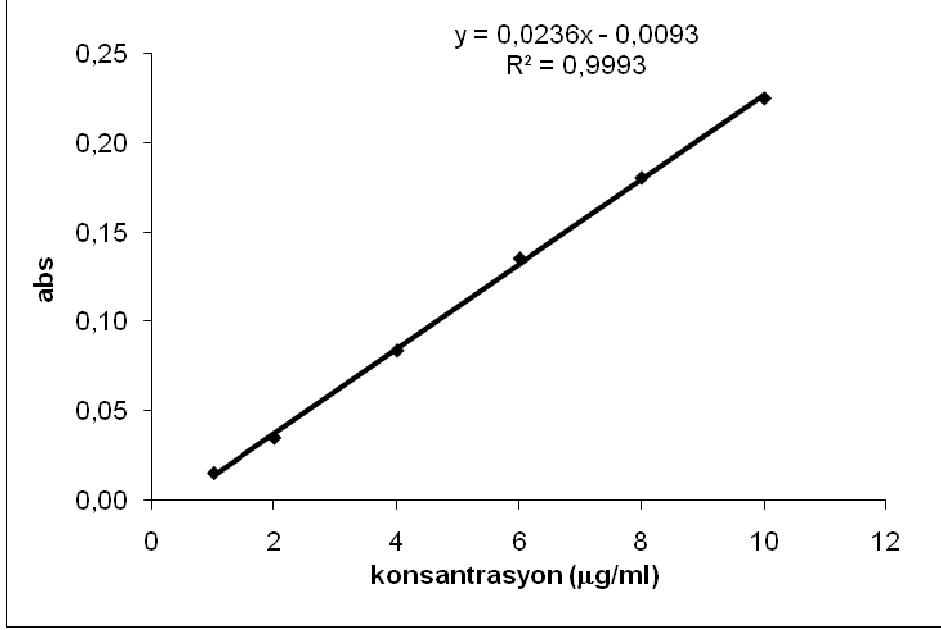
Bunun için öncelikle doksisisiklinin hangi dalga boylarında absorptans verdiği spektrofotometrik belirlenmiştir. Bunun için öncelikle doksisisiklin en iyi çözündüğü sıvı olan suda çözdürülmüş ve spektrofotometre ile dalga boyu taraması yapılmıştır. Şekil 17’de bu taramanın sonucu elde edilen spektrum görülmektedir. Bu spektruma göre doksisisiklin 274 ve 341 nm’de absorptans vermektedir. Literatürde yapılan araştırmalar da doksisisiklinin 267 ve 351 nm’de absorptans verdiğini göstermiştir (SCHOLAR, 2007).



Şekil 17. Doksisisiklinin sudaki çözeltisine ait değişik dalgaboylarında ışık absorptans spektrumu

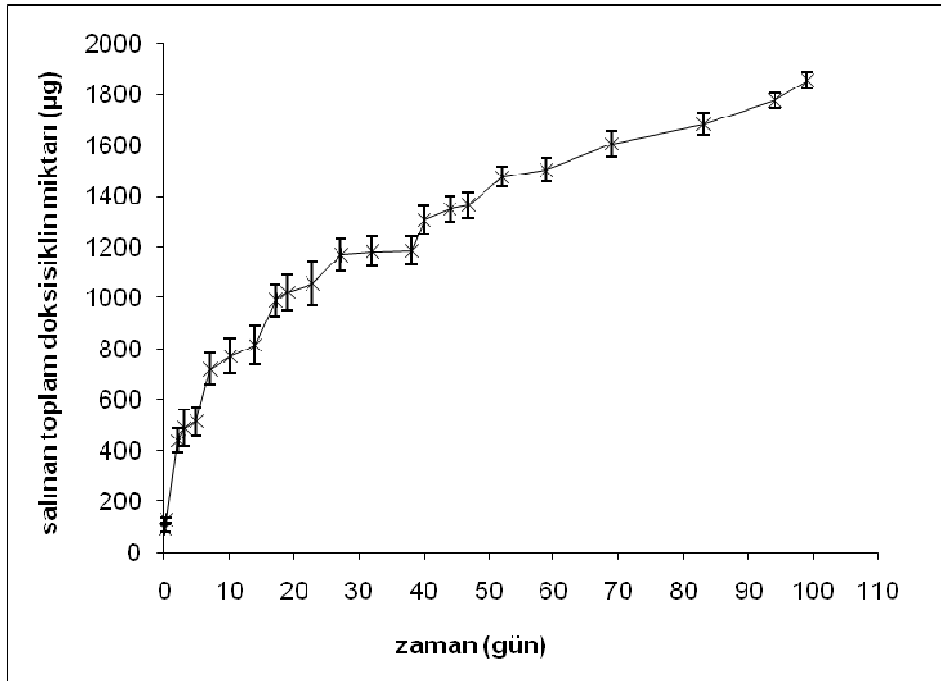
Bu spektruma göre ilaç salımının 274 nm’de absorptans ölçümleri ile yapılmasına karar verilmiştir. Doksisisiklin miktarlarını belirlemek amacıyla kalibrasyon eğrisi hazırlanmıştır (Şekil

18). Bunun için fosfat tampon çözeltisinde belli konsantrasyona sahip standartlar hazırlanmış ve spektrofotometrede absorban ölçümü yapılmıştır. Daha sonra kalibrasyon eğrisi için elde edilen denklem kullanılarak ortama salınan ilaç miktarları belirlenmiştir.

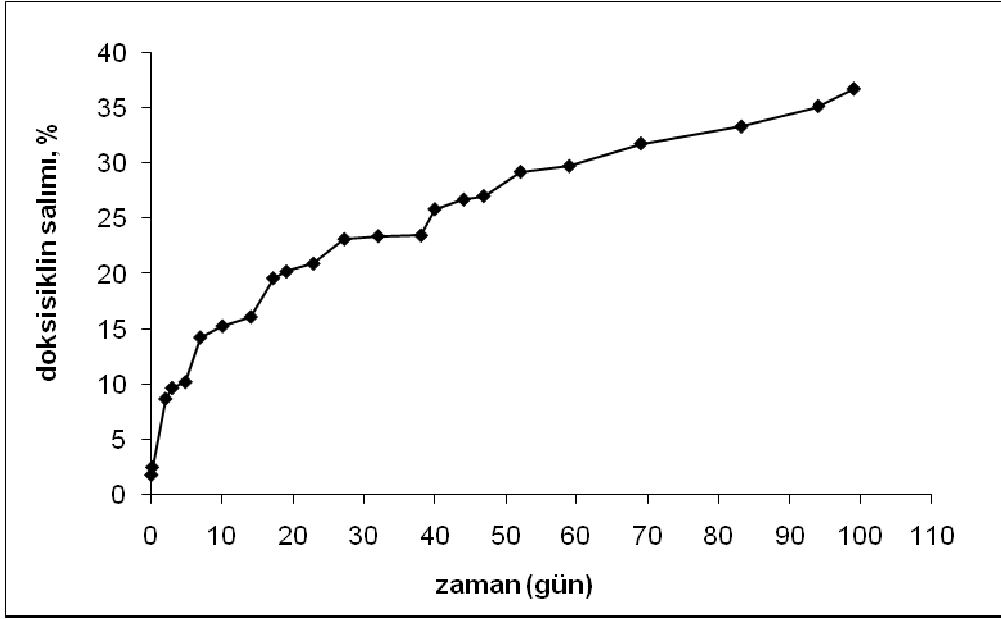


Şekil 18. Doksisisiklinin fosfat tampon çözeltisindeki kalibrasyon eğrisi

Kalibrasyon denklemine göre belli zamanlarda okunan absorbanlar ilaç miktarına dönüştürüldükten sonra toplam salınan ilaç miktarı ve bunların standart sapması belirlenmiştir. Salım profili Şekil 19'da görülmektedir.



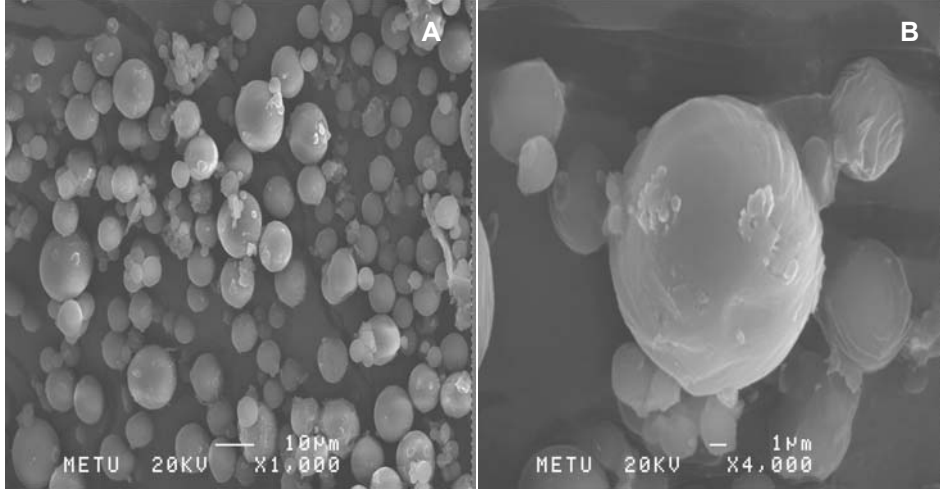
Şekil 19. D-CS yüklü PCL mikrokürelerinin fosfat tamponu içinde salım profilleri (n=3)



Şekil 20. D-CS kombinasyonu içeren mikrokürelerin kümülatif yüzde (%) doksisisiklin salım profili (n=3)

Salım profili incelendiğinde hızlı salımın (burst) ilk 5.-8. günler arasında olduğu gözlenmiştir. 3. gün sonunda ortama salınan toplam ilaç yüzdesi % 9.69 olarak bulunmuştur (Şekil 20). Gözlenen hızlı salımın mikroküre yüzeyine tutunmuş ilaç kristallerinin fosfat tamponu içine hızla salımı sonucunda gerçekleştiği düşünülmektedir (HUANG, 2009). Daha sonraki zamanlarda salım profilinde benzer miktarlarda ilaç çıkışının olduğu gözlenmiştir. Gözlemlenen salım profilinin literatürde örneklerinde olduğu gibi (CHANG, 2006) karakteristik ilk hızlı salım aşamasından sonra kümülatif salımın zamana bağlı artış eğiliminde olduğu ama zaman aralıklarında çıkışın sabit olduğu (sıfırıncı derece kinetikle salındığı) bulunmuştur. Bir ay sonunda hapsedilen ilacın % 20'si ve 3 ay sonunda ise % 36.65'i salım ortamına salınmıştır. Bu süre zarfında salınan toplam ilaç miktarı 1.85 mg'dır. Gözlemlenen salım profili geliştirilen PCL mikrokürelerinin doksisisiklin salımını en az 6 boyunca kontrollü sağlama potansiyeli olduğunu doğrulamaktadır. Elde edilen salım sonuçları kondroitin sülfatın doksisisiklin ile birlikte yüklenmesinin ilacın salım profili ve salınan miktarı üzerinde bir değişikliğe neden olmadığını göstermektedir. Bu sonucun eklenen kondroitin sülfat miktarının az olması ve/veya elde edilen mikrokürelerin doksisisiklin yüklü mikrokürelerden daha küçük boyutta olmalarına bağlı olduğu düşünülmektedir. Tüm elde edilen sonuçlar değerlendirildiğinde D-CS yüklü mikrokürelerinin in vitro ve in vivo uygulamalarda kullanılabileceğine karar verilmiştir. Mikrokürelerin 3 aylık salım çalışmaları sonucunda yapısal ve yüzey özellikleri yönünden değişimleri SEM yöntemiyle incelenmiş ve bu özelliklerin salım öncesi özelliklerinden farklı olmadığı görülmüştür (Şekil 21). Bunun başlıca nedeninin PCL

bazlı ilaç salım sistemlerinde salımın difüzyona bağlı olarak mevcut küçük gözeneklerden ve polimer matriksinde zamanla açılan yollardan olduğu düşünülmektedir.

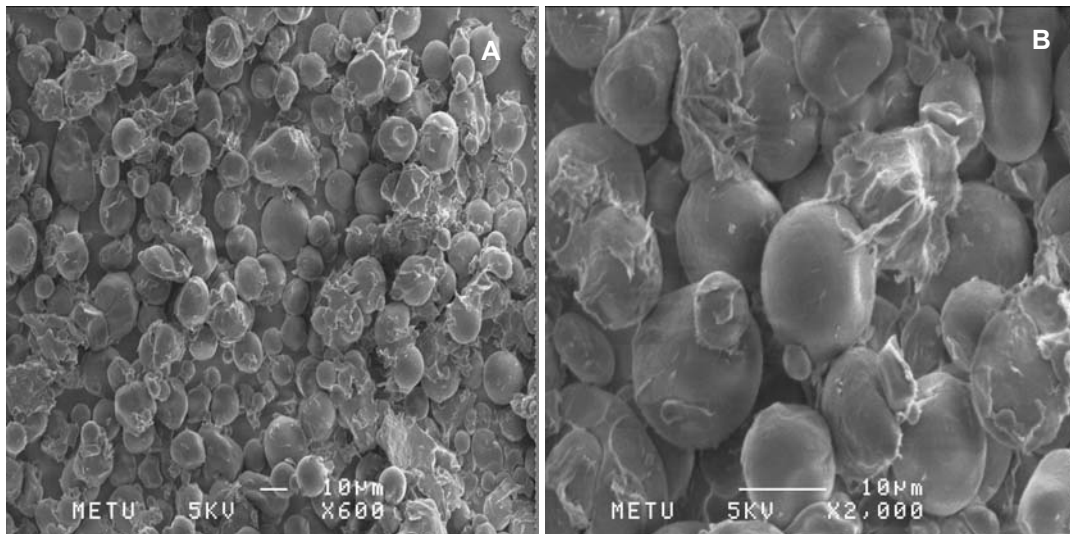


Şekil 21. D-CS yüklü PCL mikrokürelerinin 3 aylık salım sonunda elde edilen SEM görüntüleri.

3.1.5. Mikrokürelerin Gama Işınlarıyla Sterilize Edilmesi

In vitro ve in vivo deneyler için D ve D-CS kombinasyonu yüklü mikrokürelerin gama ışınıyla sterilizasyonları yapılmış ve örnekler diğer deneyler yapılana kadar 4°C'de desikatörde saklanmıştır.

Işınlama sonrası D-CS kombinasyonu yüklü mikrokürelerin taramalı elektron mikroskopisi ile elde edilen görüntüleri Şekil 22'de sunulmaktadır. Gama ışınması sonrası, D-CS yüklü mikrokürelerin yüzeylerinin ışınma öncesine göre (Şekil 13) az miktarda değişikliğe uğradığı gözlenmiştir.

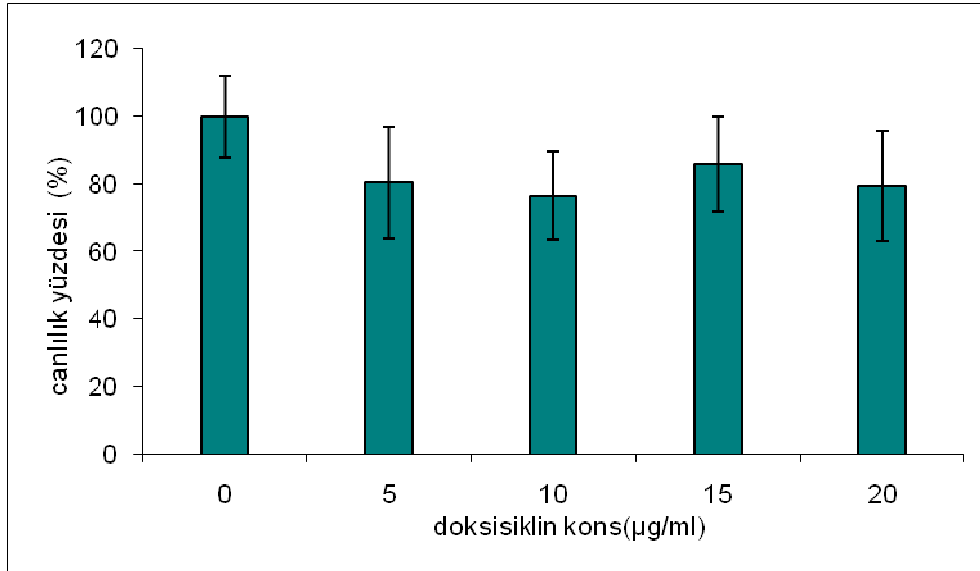


Şekil 22. D-CS kombinasyonu yüklü PCL mikrokürelere ait gama ışınması sonrası taramalı elektron mikroskopisi görüntüleri

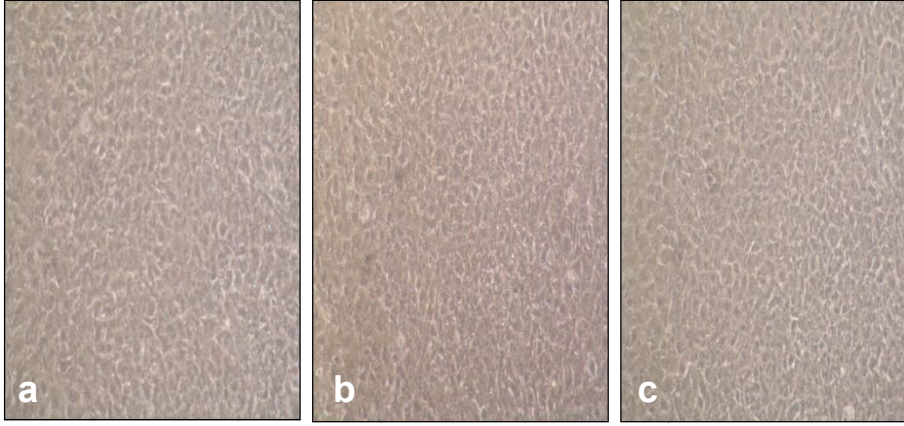
3.2. İn Vitro Hücre Kültürü Deneylerinin Sonuçları

3.2.1. İn Vitro Biyoyumluluk Sonuçları

Doksisiklinin doza bağlı toksisitesi ve hazırlanan ilaç yüklü ve boş PCL mikrokürelerin biyoyumlukları 3T3 hücre hattı ile test edilmiştir. Kullanılacak doksisiklin konsantrasyonlarına salım çalışmalarından ortama salınan miktarlara göre karar verilmiştir. Doksisiklin bakteriyel enfeksiyonların tedavisinde antibiyotik olarak klinikte kullanılan bir ilaçtır. Hücre canlılığında, artan ilaç dozunda, ilaç eklenmemiş hücrelerinkinden farklılık gözlenmemiştir (Şekil 23). Bütün dozlarda hücreler canlılıklarının %80'i korudukları, bu nedenle bu ilacın salım sisteminden çıkan miktarlarıyla oluşan lokal konsantrasyonlarının toksik etkisinin olmadığına karar verilmiştir. Ayrıca MTT sonuçları ile uyumlu olarak bu deneylerde hücrelerin morfolojisinde de herhangi bir değişiklik gözlenmemiştir (Şekil 24). Literatürde yapılan bir çalışmada 20 µM Doksisiklin'in insan polimorfonükleer lökosit (PMN) kollajenaz aktivitesinin %78'ini inhibe ettiği gösterilmiştir (GOLUB, 1991). Bu bilgi ve salım sonuçları gözönünde bulundurularak hazırlanan salım sisteminin toksisite yönünden in vitro ve in vivo uygulamalar için uygun olduğu sonucuna varılmıştır.

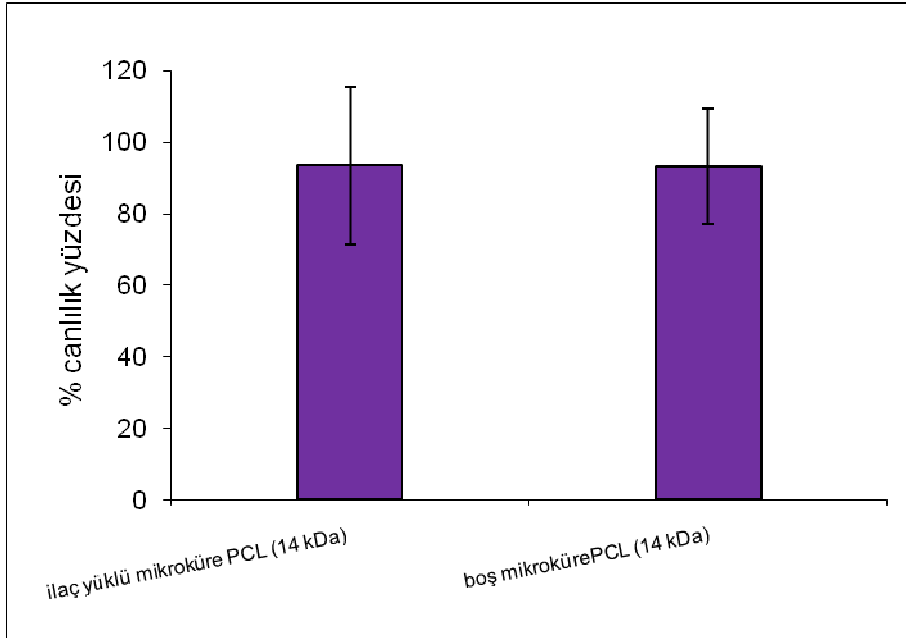


Şekil 23. 3T3 hücrelerinin 48 saatlik inkübasyon sonunda canlılık yüzdeleri



Şekil 24. Farklı doksisisiklin konsantrasyonu ile inkübe edilen 3T3 hücrelerinin 48 saatlik inkübasyon sonunda faz kontrast mikroskopisi ile alınan fotoğrafları.

İlaç yüklü ve boş PCL (14 kDa ve 65 kDa) mikroküreleri 3T3 hücreleri ile birlikte inkübe edildiklerinde hücrelerin canlılıklarının %85'ini korudukları gözlenmiştir (Şekil 25). Bu da mikrokürelerin hazırlama aşamalarından veya taşıyıcıdan kaynaklanan herhangi toksik bir madde içermediğini göstermektedir.



Şekil 25. Doksisisiklin yüklü ve boş PCL mikroküreler ile inkübe edilmiş hücrelerin canlılık yüzdeleri

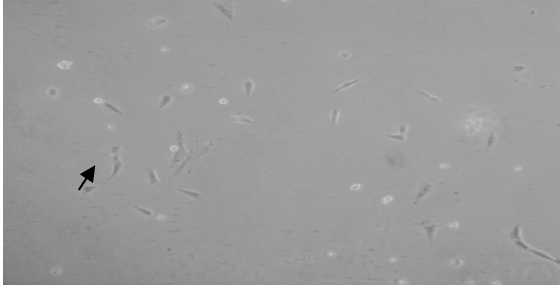
3.2.2. İn Vitro Osteoartrit Modelinin Analiz Sonuçları

Hazırlanan D ve D-CS yüklü mikrokürelerin salınan osteoartritik hücrelerinin matriks sentezi ve MMP-13 seviyeleri üzerindeki etkileri incelenerek geliştirilen tedavinin etkinliği araştırılmıştır.

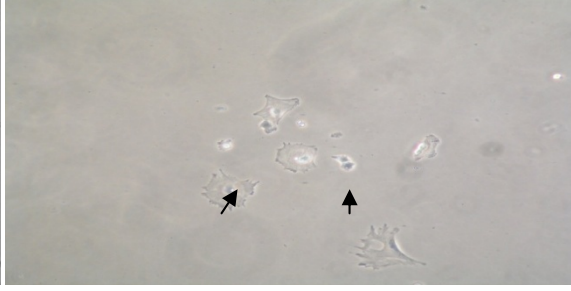
3.2.2.1. Primer Osteoartritik Kıkırdak Hücre Kültürü

Kıkırdak hücreleri (kondroistler), osteoartrit geliştirilmiş ve sağlıklı tavşan diz eklemlerinden alınan doku örneklerinden enzimatik yöntemle izole edilmiş ve daha sonra kültive edilmişlerdir. Şekil 3.26'da primer hücre kültür sırasında farklı kültürasyon aşamalarında hücrelerin faz kontrast mikroskobu mikrografileri verilmektedir. Eklem bölgesindeki kıkırdak dokusundan elde edilen hücreleri hücre kültür ortamında çoğaltılmış ve mikrokürelerin uygulandığı tüm deneylerde 2. pasaja kadar çoğaltılan hücreler kullanılmıştır.

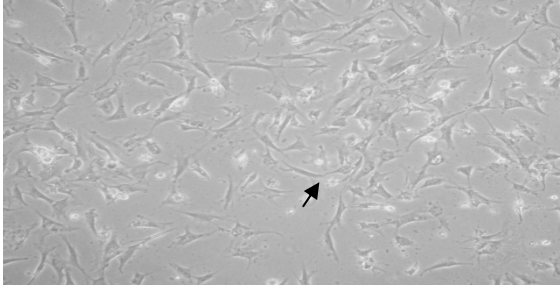
Şekil 26'da sağlıklı yavru tavşandan elde edilen kıkırdak hücreleri ile osteoartritli tavşandan alınmış kıkırdak hücrelerin morfolojileri ve çoğalma özellikleri karşılaştırılmıştır. Sağlıklı kıkırdak hücrelerinin çekirdeği yapışıp uzama özelliği göstermişken, hasta kıkırdak hücresi çekirdeği etrafında halkalar oluşturarak yapışmıştır (Şekil 26a ve b). Oklar bu yapışma şeklinin farklılaştığı noktaları işaret etmektedir. Bu görüntüye 'fried egg' yani sahanda yumurta tanımlaması yapılmaktadır (OMELCHENKO, 2002). Yapışma şekilleri kadar yapışma süreleri de farklılık göstermektedir. Primer sağlıklı hücre 3 günde yapışırken osteoartritli kıkırdaktan oluşan primer hasta hücrenin yapışması için 1 hafta beklenmiştir. Aynı şekilde, yapıştıktan sonra çoğalma aşamasında da farklılık göze çarpmaktadır (Şekil 26c ve d). Yapışma süresi gelişimi olumsuz yönde etkilediğinden, hasta hücre sağlıklı hücreye göre daha düzensiz ve yavaş gelişmektedir. Burada da Şekil 26'daki oklar bu yapışma şeklinin farklılaştığı noktaları işaret etmektedir. Sağlıklı ve OA hücreler % 85 konfluenseye ulaştığında hücrelerin morfolojileri Şekil 26e-f'de verilmektedir. Şekil 26f'de yapı bozukluğunun başgösterdiği noktalar işaret edilmiştir. Şekil 26g ve h'de ise sağlıklı ve hasta hücrelerin çoğaldıktan sonra yapıları arasındaki fark görülmektedir. Sağlıklı ve OA hücrelerin konfluenside kıkırdak hücrelerinin karakteristik poligonal morfolojisine sahip oldukları gözlenmiştir. Ancak OA hücrelerinin sağlıklı hücrelere göre daha küçük olduğu ve okla işaret edilen bölgelerde bu hastalıkla ilgili yukarıda belirtilen "sahanda yumurta" görünümüne sahip olduğu gözlenmiştir.



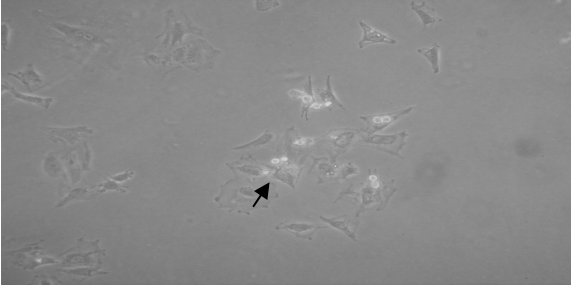
a) Ekimden 3 gün sonra sağlıklı kıkırdak



b) Ekimden 1 hafta sonra hasta kıkırdak hücreleri

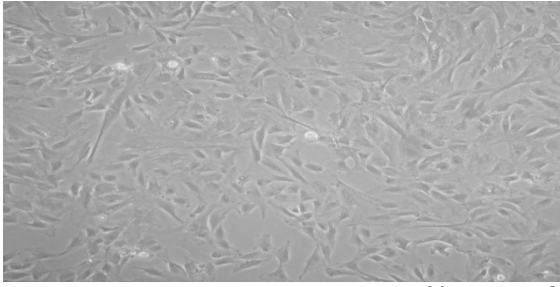


c) sağlıklı kıkırdak gelişim

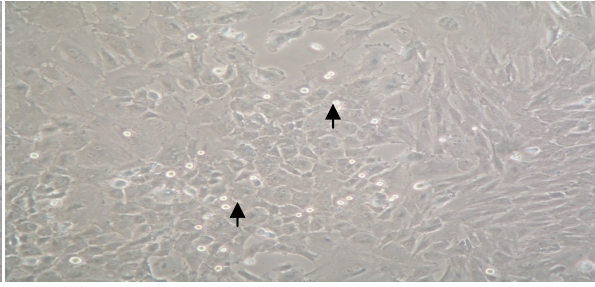


d) hasta kıkırdak gelişim

Ekimden 10 gün sonra kıkırdak hücreleri

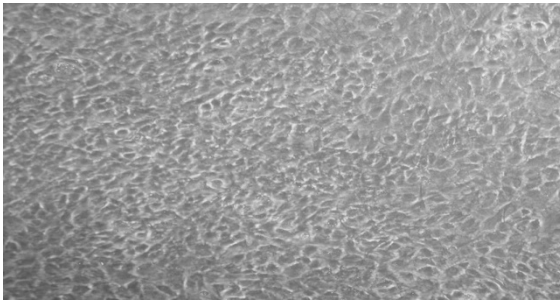


e) sağlıklı kıkırdak hücreleri

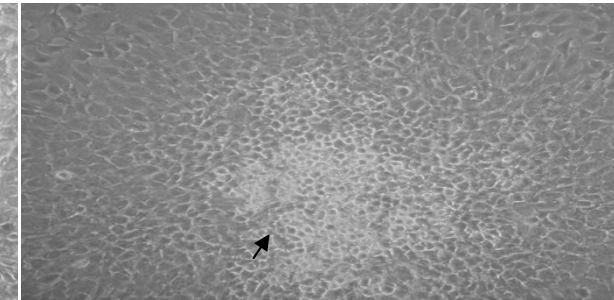


f) hasta kıkırdak hücreleri

% 85 konfluenside



g) sağlıklı kıkırdak hücreleri



h) hasta kıkırdak hücreleri

100% konfluenside

Şekil 26. Sağlıklı ve osteoartiritik primer kıkırdak hücrelerin kültivasyonun farklı evrelerindeki faz kontrast mikroskobu mikrografileri. (Oklar hücrelerin sağlıklı ve OA gruplar arasındaki farklı noktalarını işaret etmektedir (10X).

3.2.2.2. In Vitro Osteoartrit Modelinin Oluşturulması

Literatürde in vitro hastalık modellerinin oluşturulması için genelde insan kaynaklı osteoartritik ve ön-enflamatuar sitokinler kullanılarak osteoartritik yapılan kıkırdak hücreleri kullanılmaktadır. Hayvan hücreleri kullanıldığında rat, tavşan, v.b. ile izolasyon gerçekleştirilmektedir (KAVAS, 2010; CHOI, 2002; KUROKI, 2002). Bu projede, 3 boyutlu model olarak agaroz içine hapsedilmiş osteoartritik tavşan kıkırdak hücreleri kullanılmıştır. Agaroz, kıkırdak hücrelerinin karakteristik yuvarlak morfojisini korumasına uygun ve hücrelerin rahat beslenebilmesi için metabolitlerin ve gazların kolaylıkla difüzyonla geçebileceği bir ortam sağlamaktadır (KAVAS, 2010). Şekil 27’de görüldüğü gibi hücreler agaroz içinde homojen dağılmış ve yuvarlak hücre morfolojisine sahiptirler.



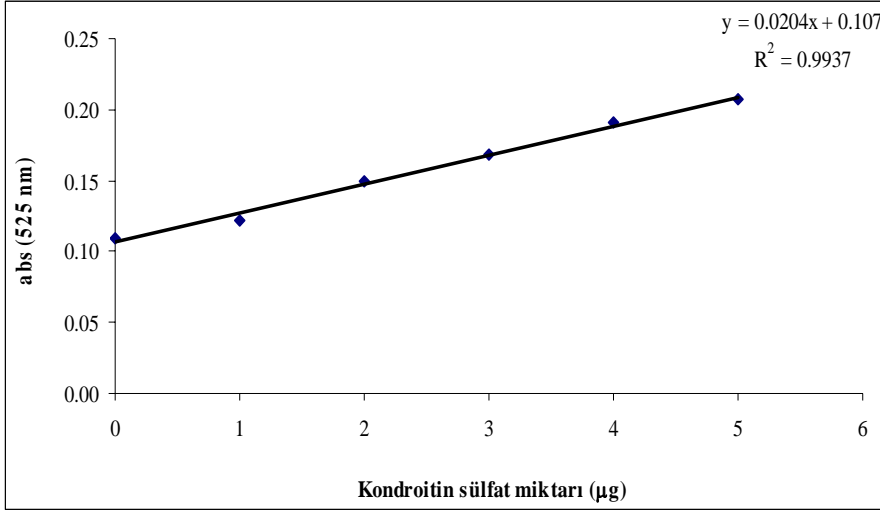
Şekil 27. 3 günlük inkübasyon sonunda agaroz içerisine hapsedilmiş osteoartritik kıkırdak hücrelerinin faz kontrast mikroskobu mikrografileri (10X büyütme)

3.2.2.3. Glikozaminoglikan (GAG) Miktarları ile İlgili Sonuçlar

Projenin ilk aşamalarında agaroz ve kıkırdak hücreleri 1:1 oranında karıştırıldıktan sonra iki cam arasına dökülmüş ve jelleşme gerçekleşikten sonra biyopsi puncher ile diskler kesilmiştir. Ancak dökme sırasında oluşan baloncuklar ve hızlı jelleşme nedeniyle homojen agaroz diskleri elde edilemediği için hücre-agaroz karışımının belirli miktarlarda doğrudan hücre kültür kabı kuyucuklarına eklenmesine karar verilmiştir. Bu sayede daha yüksek konsantrasyonda hücre ile deneyler başlatılabilmektedir.

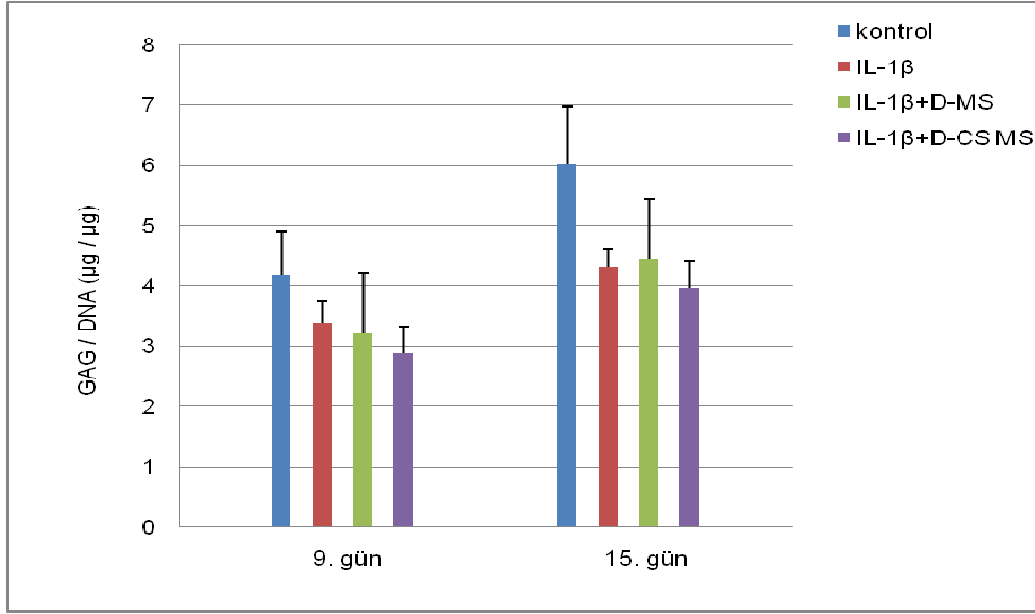
Oluşturulan üç boyutlu yapıda in vitro osteoartrit modeli için hücreler iki hafta boyunca IL1- β (20 ng/ml) varlığında inkübe edilmiştir (COOK, 1999). Raporun yöntemler kısmında Şekil 4’de verilen düzenek ile 1 μ m gözenekliliğe sahip insertler üzerine konan mikroküreler bu sisteme eklenmiş ve aynı ortamda salım yapması sağlanmıştır. Böylece, vasat değişimi sırasında insertlerin alınması, dolayısıyla mikroküre kaybı önlenmiştir.

GAG miktarları kolorimetrik bir yöntem olan DMMB yöntemiyle incelenmiştir. Hücrelerin salgıladıkları toplam GAG miktarı hücre vasatına salınan ve hücre tarafından hücre dışı matriksi olarak depolanmış GAG miktarları olarak ayrı ayrı hesaplanmıştır. GAG tayini için 4-kondroitin sülfat standartları kullanılarak kalibrasyon eğrisi elde edilmiştir (Şekil 28).



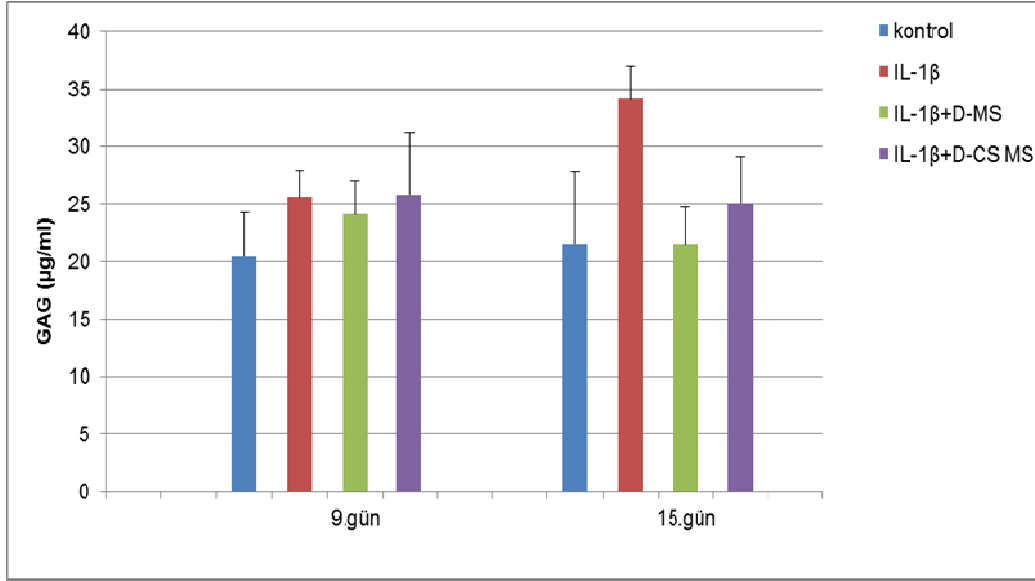
Şekil 28. GAG miktarının belirlenmesinde kullanılan kalibrasyon eğrisi

Şekil 29'da agaroz matriksine hücreler tarafından depolanan GAG miktarları 9 ve 15 günlük inkübasyonlar sonunda ölçülmüştür. D MS ve D-CS MS'den 5 mg alınmış ve yaklaşık 200 µl vasat ile karıştırılıp disklerin üzerine konulduktan sonra salımı yapması ve böylece tedavi etkinliğinin incelenmesi sağlanmıştır. Doksisisiklin, matriks metalloproteinazları (MMP) ve kıkırdak yapısındaki temel proteinlerden kollajenin yıkımını engellediği in vitro koşullarda gösterilmiş bir antibiyotiktir (NORDSTROM, 1998; SIEMONSMA, 2003, PATEL, 1999). Doksisisiklinin MMP aktivitesini artiritte, periodonditiste (GAPSKI, 2004) ve aortik anevrizmada (MANNING, 2003) azalttığı görülmüştür (SHANMUGANATHAN, 2008).



Şekil 29. Kondrosit-Agaroz disklerde 9 ve 15. günün sonunda toplam GAG miktarı (n=4)

Şekil 29'da 9. ve 15. günlerde negatif kontrol grupları (IL-1β içeren) arasındaki farklılık istatistiksel olarak anlamlı bulunmamıştır. Ayrıca 9. günün sonunda kontrol grubu ile IL 1β ile IL 1β+D MS ve IL 1β+D-CS MS salımları yapılan hücrelerin bulunduğu disklerde GAG miktarlarında gruplar arası farklılık bulunmamıştır. Aynı şekilde, 15. gün sonundaki GAG miktarları, negatif kontrol ile IL 1β+D MS ve IL 1β+D-CS MS salımı olan disklerde kontrole göre istatistiksel olarak düşük olduğu gözlemlenmiştir ($p < 0.05$). Kontrol grubu ile karşılaştırıldığında IL-1β eklenen hücrelerin (negatif kontrol) sentezlediği ve diskler içinde depoladığı GAG miktarları düşüktür. Bu sonuç, hazırlanan salım sistemlerinin GAG sentezine yönelik pozitif bir etkisinin olmadığını göstermektedir. Hücre kültürü çalışmaları, MMP'lerin kollajen yıkımını önlemek üzere inhibitör (engelleyici) potansiyelleri olan doksisisiklin türü ilaçların terapötik kullanımını gerekli göstermektedir ancak literatürde bu ilacın GAG sentezine yönelik olumlu etkisi beklenmediğinden sonuçlar literatürle uyumludur. Bununla birlikte, osteoartrit oluşumu sırasında ortaya çıkan sitokinlerden olan IL-1β'nin kıkırdak matriks üretimini olumsuz etkilediği ve MMP'leri arttırdığı, bu etkileri ortadan kaldıracak bir ajana ihtiyaç duyulduğu bilinmektedir (SMITH, 1999; BLUMBERG, 2008). Doksisisiklin tedavisinin antimikrobiyel dozun altında, periodontal hastalıkların ilerlemesinde rol alan MMP'leri ve ön-inflamasyon sitokinlerini azaltarak düşürdüğü bulunmuştur (CHOI, 2004). Projedeki kullanım amacıyla doksisisiklinin bu potansiyeline dayanmaktadır.



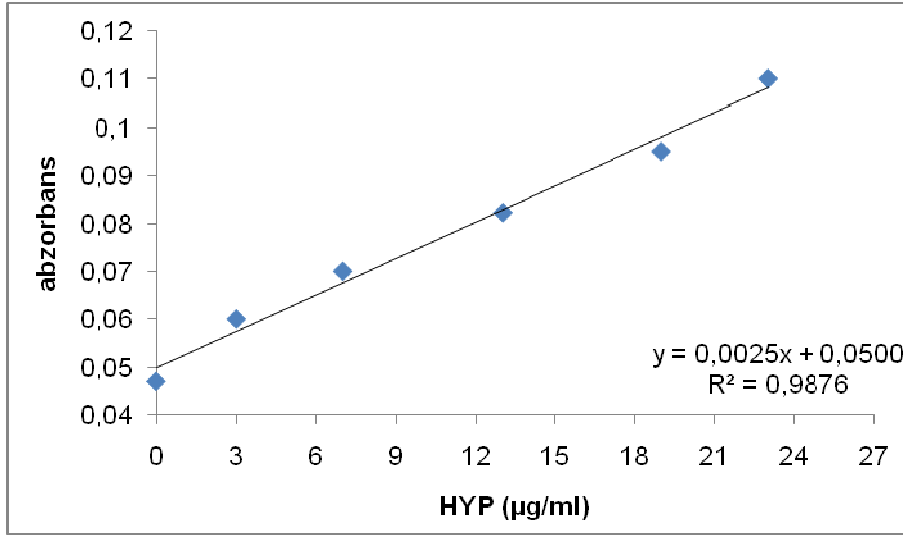
Şekil 30. Vasata salınan toplam GAG miktarı (n=4)

OA hastalığında görülen önemli bir parametre de hücreler bulunduğu ortama salınan GAG miktarıdır. Bu miktarın artması GAG moleküllerinin hücre dışı matriks oluşturmak üzere tutunmasını sağlayacak kollajen iskeletin olmaması veya parçalanması ile ilgilidir. Dolayısıyla vasata salınan GAG miktarı artışı hücre kültürü çalışmalarında bir hastalık semptomudur. Şekil 30'da in vitro deneylerde ölçülen vasata salınan toplam GAG miktarları verilmiştir. Vasata salınan GAG miktarları (9. günün sonunda) kontrol grubunda, IL-1β eklenen gruplara göre daha düşüktür. Kontrol grubu ile IL-1β eklenen gruplar arası fark istatistiksel olarak anlamlıdır. 15. Günün sonunda ise, mikroküre eklenmemiş IL-1β grubu, kontrol (IL-1β eklenmemiş) ve IL-1β+ D MS ile IL-1β+ D-CS MS gruplarından daha fazla miktarda GAG salmıştır. Mikroküre tedavisi ile vasata salınan ortalama GAG değerlerinde bir miktar azalma görülmüş ve de anlamlı bir azalmaya rastlanmıştır. Kontrol ve IL-1β+D MS ve IL-1β+D-CS MS değerleri arasındaki farklar istatistiksel olarak anlamlı değildir ($p < 0.05$). Bu sonucun matriks içerisinde bulunan GAG'ların parçalanmasına neden olan agrekanaz enzimlerinin de doksisisiklin tarafından bir miktar engellenmesi ile oluşmuş olabileceği düşünülmektedir. Ayrıca GAG miktarlarının azalmasının, kollajen iskeletin korunması ile de ilgili olabileceği düşünülmektedir. Literatürde TIMP 1 ve TIMP 2 ile yapılan çalışmada da benzer sonuçlar görülmüştür (KUROKI, 2003).

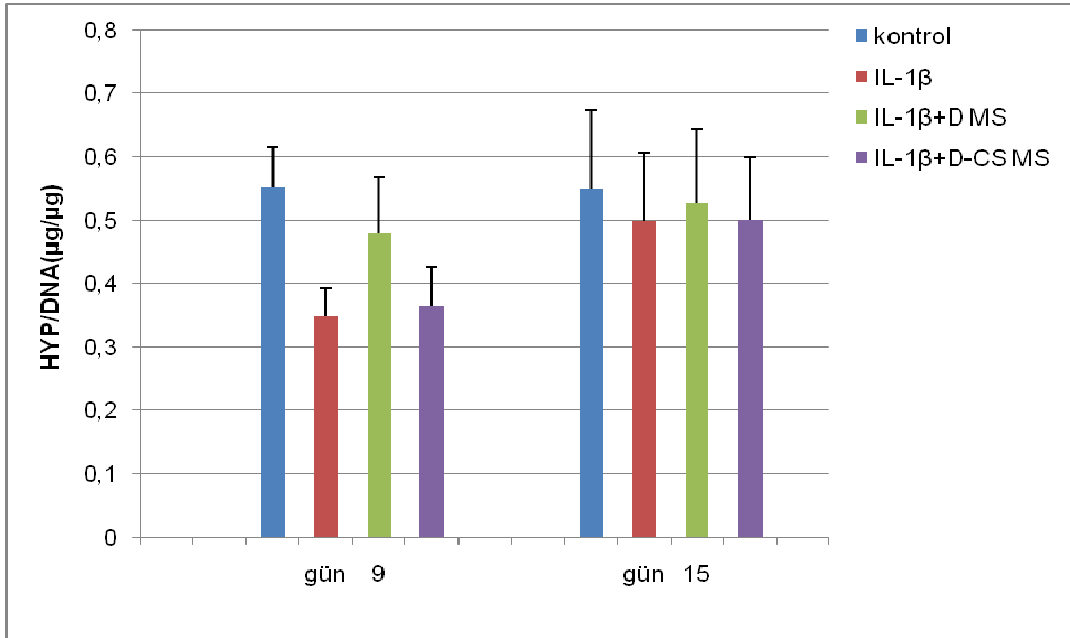
3.2.2.4. Kollajen Miktarları ile İlgili Sonuçlar

Kollajen, kondrosit hücreleri tarafından sentezlenen kıkırdak dokusunun mekanik özelliklerini etkileyen hücre dışı matriksin önemli bileşenlerinden birisidir. Literatürde osteoartritlik kıkırdak hücrelerinin vasata kollajen salımının normal şartlara göre daha yüksek olduğu gösterilmiştir (LITTLE, 2005; PALMER, 2009; WILSON, 2007; CORTIAL, 2006). Literatürde, kollajen

miktarı sadece vasata salınan total kollajen miktarı ve/veya osteoartrit model oluşumunu kanıtlanmasında önemli bir parametre olan kollajenin parçalanmış formlarının miktarları olarak verilmektedir. Kollajen tayini için, standart olarak kullanılan L-hidroksiprolin ile kalibrasyon eğrisi hazırlanmıştır (Şekil 31). Buna göre in vitro örneklerin kollajen miktarı, kollajenin yapısında olan hidroksiprolin cinsinden bulunmaktadır. Toplam kollajen miktarının elde edilen hidroksiprolin miktarının 8 katı olduğu belirtilmiştir (WILSON, 2007).

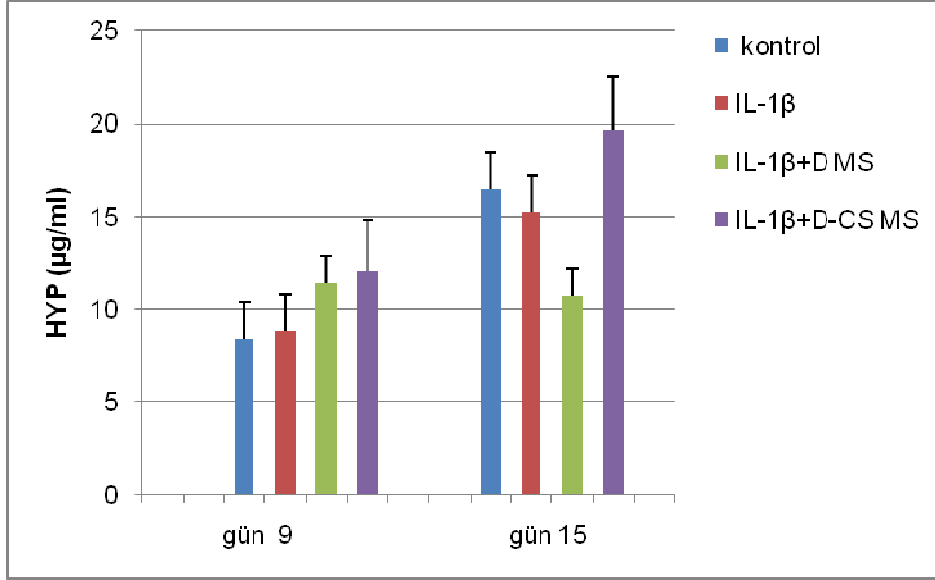


Şekil 31. Kollajen miktarının belirlenmesinde kullanılan hidroksiprolin için kalibrasyon eğrisi



Şekil 32. Kondrosit-Agaroz disklerde 9 ve 15. günün sonunda hidroksiprolin cinsinden toplam kollajen miktarları (n=4)

Şekil 32’de 9. ve 15. günlerde tüm gruplarda agaroz disklerde depolanan hidroksiprolin cinsinden toplam kollajen miktarları görülmektedir. IL1- β ve IL1- β +D-CS grupları için 9. günde ölçülen kollajen miktarları 15. gününde ölçülen miktarlardan istatistiksel anlamlı olarak düşük bulunmuştur ($p<0.05$). Bu deney süreleri içerisinde IL1- β grubu sadece 9. Günde kontrolden anlamlı farklı bulunmuş, gruplar arası diğer farklar istatistiksel olarak anlamlı bulunmamıştır ($p<0.05$).



Şekil 33. Vasata salınan hidroksiprolin cinsinden toplam kollajen miktarı (n=4)

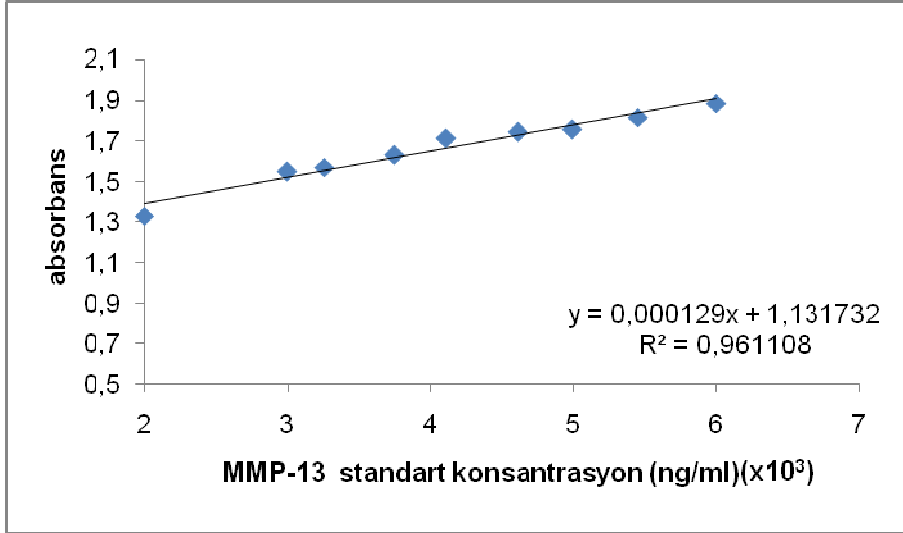
Şekil 33’de ise vasata salınan hidroksiprolin cinsinden toplam kollajen miktarları görülmektedir. Burada, 9. günde yine gruplar arası farklar istatistiksel olarak anlamlı bulunmamıştır. 15. günde ise, IL1 β +D MS grubu diğer gruplarla ile karşılaştırıldığında belirgin azalma gösterirken diğer gruplar arasındaki farklar istatistiksel olarak önemli düzeyde gözlenmemiştir ($p<0.05$).

Şekil 32 ve 33’te görüldüğü üzere, beklenildiği gibi vasata kollajen salımı görülmemiştir. Bunun proteoglikan ve kollajen degradasyonlarının farklı mekanizmalarla düzenlenmesi ile ilgili olabileceği düşünülmektedir. IL1- β özellikle proteoglikanları parçalayan aktif enzimlerden olan “agrekaz” ı ve aktif olmayan ve proMMP adı verilen MMP başlatıcıları indüklemektedir. Ayrıca buna ek olarak da, yapılan çalışmalarda en az dört haftalık ve 50ng/ml’den yüksek konsantrasyonlu IL1- β uygulamalarında kollajen salımı ölçülebilmıştır (KOZACI, 1996; ELLIS, 1994; MITCELL, 1994). Burda 20ng/ml’lik dozun, 15 gün sonunda kontrol grupları arasında dahi farklılık elde edilemeyişinin bir nedeni olduğu düşünülebilir. Ayrıca tüm gruplar için zamana bağlı olarak vasata salınan kollajen miktarı istatistiksel anlamlı arttığı gözlenmiştir. Tüm bu sonuçlar değerlendirildiğinde, kollajen degradasyonun başlangıç aşamasında olduğu düşünülen evrede-15 gün sonunda- IL1 β +D MS grubunun değerlerinin

9. günde ölçülen miktarlarda ve diğer gruplardan istatistiksel olarak düşük olmasının beklenen tedavi etkinliğini ile ilgili olabileceği de düşünülmektedir.

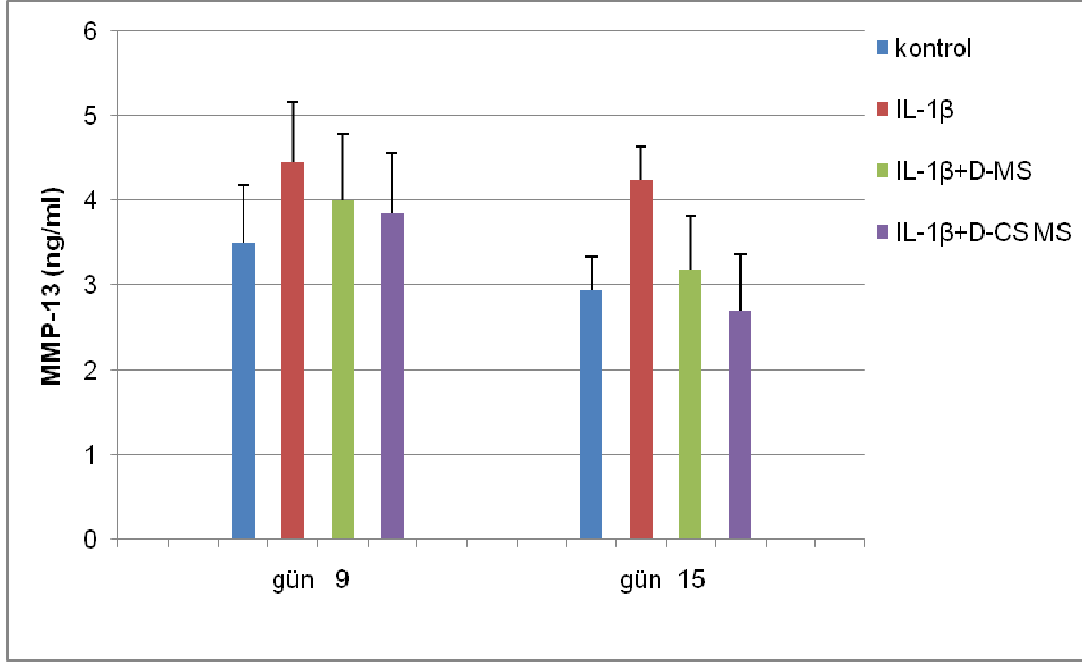
3.2.2.5. In Vitro Osteoartrit Modelinde MMP-13 Düzeylerinin Karşılaştırılması

Matrix metalloproteinaz (MMP) ailesinden bazı enzimlerin, özellikle kollajenaz aktivitesinde olanların (MMP-1, MMP-8 ve MMP-13) kıkırdak matriksindeki tip II kollajeni parçalayarak osteoartrit oluşumunda görev aldıkları bilinmektedir. Bu enzimlerden özellikle MMP-13'ün OA vakalarında yüksek miktarda olduğu görülmüştür. MMP'lerin miktarının kıkırdak dejenerasyonu sırasında artışının interlökin 1 (IL-1) gibi enflamatuar sitokinlerce indüklendiği ve bunun sonucunda kıkırdak hücrelerinin MMP-3 ve 13 salımının arttığı literatürde belirtilmiştir (KIM, 2005). Standard MMP-13 konsantrasyonları için ELIZA testi ile elde edilen ölçüm sonuçları ile örneklerdeki MMP-13 enzim aktivitesinin belirlenmesi için kullanılan denklem Şekil 34'de gösterilmektedir.



Şekil 34. In vitro deneylerde MMP-13 düzeylerinin belirlenmesi için kullanılan kalibrasyon eğrisi ve linear regresyon denklemi

In vitro 3 boyutlu OA modelinde yapılan deneylerle D veya D-CS mikrokürelerin MMP-13 enzim düzeylerine etkisi gruplar arası ve kontrollerle Şekil 35'te karşılaştırılmaktadır. Deneylerin 9. gününde gruplar arasında MMP-13 düzeylerinde anlamlı bir fark görülmemiştir. Ancak IL-1β eklenmiş ve tedavi edilmemiş OA hücrelerindeki MMP-13'ün en yüksek değerde olduğu görülmüştür. D veya D-CS mikroküreler ile tedavi edilmiş gruplardaki MMP-13 değerlerinin tedavi edilmemiş gruba göre sayısal olarak daha düşük olması salınan doksisisiklin ile enzim aktivitesinin bir miktar azaltılabildiğini göstermektedir.



Şekil 35. In vitro deneylerde gruptaki MMP-13 düzeyleri (n=4)

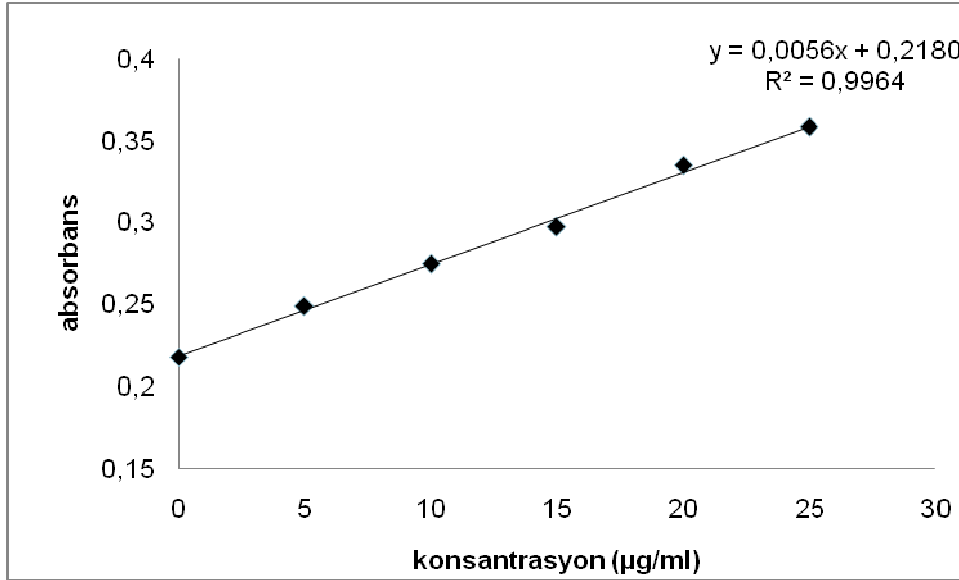
Kontrol (IL-1 β eklenmemiş) ve IL-1 β eklenmiş-tedavi edilmemiş OA gruplarının MMP-13 düzeyleri arasındaki farkın 15. günde arttığı Şekil 35' de görülmektedir. Bu fark istatistiksel olarak da anlamlı bulunmuştur. Bu sürede tedavi gruplarının etkisinin de daha belirginleştiği ve MMP-13 ortalama değerlerinin kontrol düzeyine düşürüldüğü ve CS içeren mikrokürelerin bu anlamda oldukça başarılı sonuç verdiği gözlenmiştir (2.7 ng/ml seviyesine düşürmüştür). Doksisisiklinin deneysel OA için koruyucu etkisi ve MMP-13 seviyesini düşürme özelliği literatürde gösterilmiştir (SMITH, 1999).

Kontrol ve IL1- β uygulanan gruplarda elde edilen MMP-13 seviye farklılıkları, Şekil 33'de verilen ortama salınan parçalanmış kollajen miktarının değişmemesi ile örtüşmemektedir. Çünkü, IL1- β kollajenin parçalanması sonucunu uzun süreçte göstermektedir. MMP-13 miktarları için gruplar arasındaki farklılık 15. güne geldiğinde daha belirgin ortaya çıkmaktadır. IL1- β öncelikle proMMP adı verilen MMP başlatıcı molekülleri açığa çıkarır. Açığa çıkan proMMP ise, aktivite kazanabilmek için IL1- β 'dan başka faktörlere de ihtiyaç duymaktadır (BEEKMAN, 1998). Burada, osteoartritli kıkırdak hücresi kullanılmış olması MMP-13 aktivitesine zaten sahip olan bu hücrelerin bu potansiyele sahip olduklarını da düşündürmektedir. Dolayısıyla proMMP'leri MMP-13'e dönüştürecek doğal yapı zaten osteoartritli kıkırdak hücrelerinde bulunmaktadır. IL1- β sayesinde ortamda proMMP artmış olduğundan, kontrol grubu ile farklılık bu sayede oluşmaktadır. Oluşan değişim zamana bağlı olduğu için 15. günde farklılık netleşmektedir.

15. güne gelindiğinde, artan toplam salım miktarı ile açığa çıkan doksisisiklin, MMP-13 miktarını kontrol seviyesine indirmektedir. Dolayısıyla, 9. günde yeterli inhibisyonun olmamasının, doksisisiklin salımının vasat içerisinde yavaş olmasından ve salınan toplam miktarın az olmasından kaynaklandığı düşünülmektedir. Her ne kadar in situ deneylerde taklit edilmeye çalışılsa da, in vitro ve in vivo salım hızlarının in situdakinden farklı olduğu ilaç salım sistemleri ile yapılan araştırmalar belirtmektedir. İn vivo ortamın daha dinamik olması genellikle daha hızlı ilaç çıkışı beklentisi içermektedir. Bu nedenlerle projede 5mg dozda uygulanan mikrokürelerin in vitro sonuçları 9 günlük tedavide hedeflenen kollajen ve MMP-13 sonuçlarını göstermese de 15. gün sonuçlarının istenilen yönde olması bu dozun in vivo için de denenebilirliğini belirtmektedir. İn vitro sonuçların ışığında in vivo deneylerde (Bölüm 3.3.'de açıklandığı gibi) az miktarda bir doz artışı ile 7.5 mg mikrokürelerin de ayrıca denenmesinin gerektiği düşünülmüştür.

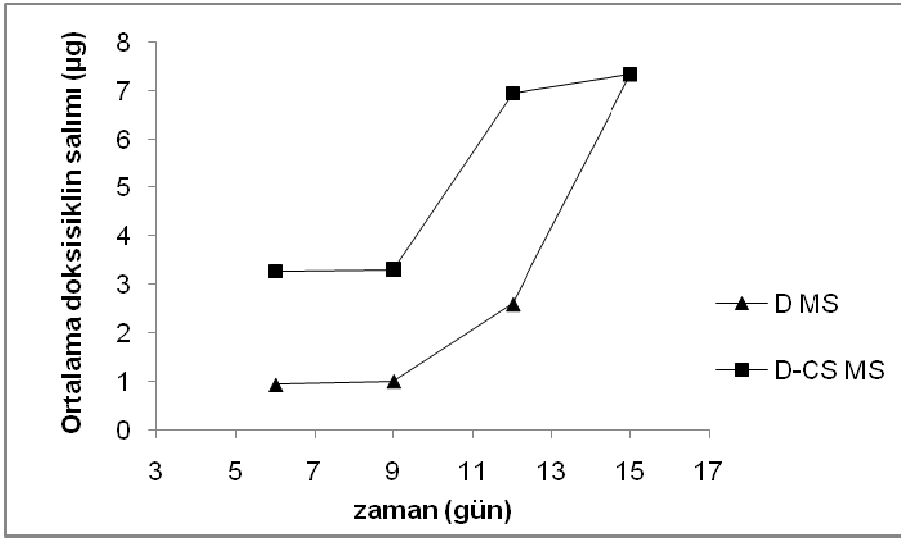
3.2.2.6. In Vitro Deneylerde Doksisisiklin Salım Sonuçları

In vitro artirit modelin oluşturulmasından 3 gün sonra mikroküreler hücre insertleri içinde hücre kültür kuyucuklarına eklenmiştir. Şekil 36'da ortama salınan doksisisiklin miktarının tayin edilmesi için oluşturulan kalibrasyon eğrisi verilmektedir.



Şekil 36. Hücre kültür vasatı için oluşturulan doksisisiklin kalibrasyon eğrisi

D-CS yüklü mikrokürelerden 13 gün sonunda salınan toplam doksisiklin miktarı D- yüklü mikrokürelerden salınan miktara göre yüksek olduğu gözlenmiştir (Şekil 37). Bu farkın, D-CS yüklü mikrokürelerin daha küçük olması ve hidrofilik olan CS'nin ilacın salımını artırması ile ilgili olduğu düşünülmektedir. 15 gün sonunda mikrokürelerden salınan ilaç miktarının 20-30 µM seviyelerine ulaştığı bulunmuştur. Her iki tür mikroküre de 15 gün sonunda aynı miktara ulaşmıştır. Bu da literatürde doksisiklinin anti-kollajenaz aktivitesinin yeterli olduğu gösterildiği aralığa denk gelmektedir. Bir çalışmada 30 µM doksisiklin konsantrasyonunun MMP-13'ün kollajenaz aktivitesini %50-60 oranında azalttığı gösterilmiştir (SMITH, 1999). Başka bir çalışmada ise 30 µM doksisiklinin hücrelerin kollajenaz aktivitesinin %78'ini inhibe edildiği gösterilmiştir (GOLUB, 1991). 15 günlük inkübasyonun sonunda, D-CS yüklü mikrokürelerden D- yüklü kürelerden daha fazla salım olduğu gözlemlendiği halde (Şekil 37) MMP-13 inhibisyonunda (Şekil 35) istatistiksel bir farklılık gözlenmemiştir. Ayrıca hücreler tarafından hücre kültür ortamına salınan kollajen miktarının negatif kontrolden daha düşük olduğu sonucu D yüklü mikrokürelerde gözlenmiştir. Bunun nedeninin, doksisiklinin bu mikrokürelerde 9-15. günler arasında ortama daha hızla salınması olduğu düşünülmüştür.



Şekil 37. Hücre kültür ortamında mikrokürelerin doksisiklin salım profili

3.3. İn Vivo Deney Sonuçları

3.3.1. İn Vivo Deneysel Tavşan Osteoartrit Modeli Oluşturulması

Deneysel osteoartrit (OA) oluşumu için eklem içi kollajenaz enjeksiyonu birinci ve dördüncü gün olacak şekilde iki kez yapılmıştır (KIKUCHI, 1998; CHOI, 2002; HUH, 2008). Şekil 3.38'de enjeksiyondan 14 hafta sonra osteoartrit oluşumu sonucu kıkırdakta oluşmuş lezyonlu bölge okla gösterilmektedir.

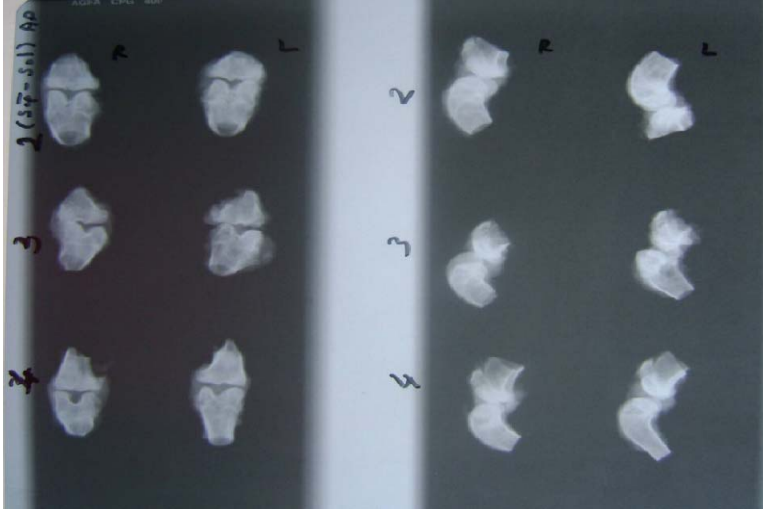


Şekil 38. Osteoartrit oluşturulan eklem kıkırdağında bulunan lezyonlu bölge. Ok lezyonlu bölgeyi göstermektedir.

Şekil 39'da tavşanların kollajenaz enjeksiyonundan 3 hafta sonraki radyografileri görülmektedir. Bu deneklerin radyolojik skoru önden 2, yandan ise 1 olarak tespit edilmiştir. Deneysel osteoartrit oluşum süresi enjeksiyonları takiben 6 haftadır (KIKUCHI, 1998). Enjeksiyondan 6 hafta sonra eklem radyografilerinde 3 numaralı örnekte sağ (R) ve sol (L) eklemlerin önden ve yandan görünüşlerinin radyolojik skorları 2 olarak belirlenmiştir (Şekil 40). 2 numaralı ve 4 numaralı örneklerin sırasıyla sağ (R) önden ve sol (R) önden görünüşün radyolojik skor dereceleri 0 (sıfır) bulunmuştur. Diğer tüm eklemlerin skor derecesi 1'dir. Elde edilen ön radyolojik bulgular yapılan iki kollejenaz enjeksiyonları ile eklem kıkırdaklarında osteoartrit oluşumu sağlandığı sonucuna varılmıştır. Ancak radyolojik incelemelerin deneysel osteoartrit modelinde iyileşmenin takibi için tek başına yeterli bir kriter olmadığı sonucuna varılmıştır.



Şekil 39. Eklemlerin kollajenaz enjeksiyonundan 3 hafta sonraki radyografileri a) önden b) yandan görünüş

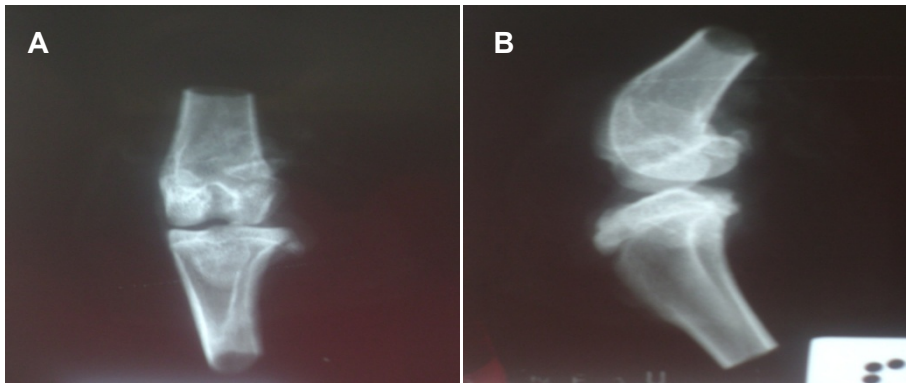


Şekil 40. Kollajenaz enjeksiyonundan 6 hafta sonra eklem radyografileri

3.3.2. Mikroküre Uygulanmış Osteoartritli Eklemelerde İyileşmenin Değerlendirilmesi

3.3.2.1. Radyolojik Değerlendirmeler

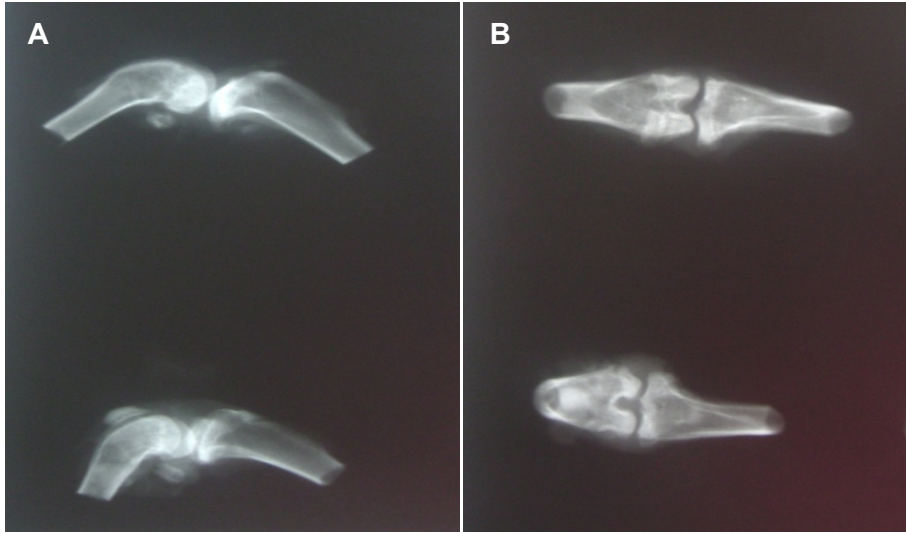
Şekil 41'de 6 haftalık OA oluşumundan sonra tedavi edilmeden geçen 4 haftanın sonundaki eklem radyografileri görülmektedir. Bu eklemlerin radyolojik skorları, yandan 2 iken önden 1'dir.



Şekil 41. OA oluşturulmuş ancak tedavi edilmemiş tavşanların 4 hafta sonundaki radyografileri (kollajenaz enjeksiyonundan 10 hafta sonra) a) önden b) yandan görünüş

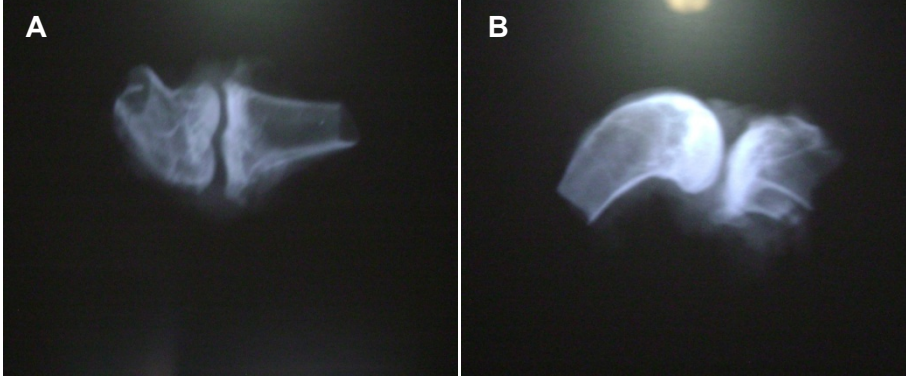
Diğer kontrol grubu hyaluronan grubu olup OA oluşumunun 6. haftası tamamlandıktan sonra eklem içine hyaluronan enjeksiyonu yapılmıştır. Deneklerin bir kısmı hyaluronan enjeksiyonundan sonra 4 hafta, diğer kısmı ise 8 hafta bekletilmiştir. Şekil 3.42'de

hiyaluronan enjeksiyonunun 4 haftalık tedaviden sonraki eklem radyografileri görülmektedir. Radyolojik skor derecesi 1'dir. Hiyaluronan (HA) eklem sıvısı ve kıkırdak matriksinin ana bileşenidir. HYA sayesinde eklem kayganlığı sağlanmış olunur. HYA uygulamasının tedavi etme seviyesi bilinmemesine rağmen, hastaların ağrılarını giderdiği klinik olarak tespit edilmiştir. Kıkırdak yüzeyinde meydana gelen HYA birikmesinin kondrosit parçalanmasını ve MMP-3 salgılanmasını enjeksiyonun ilk haftasında durdurduğu bilinmektedir. İkinci ve üçüncü haftalarda ise MMP-3'ün bloke edilmesi tespit edilmemiştir (JULLOVI, 2004). HYA kıkırdak yüzeyinde engelleyici (bariyer) olarak görev yapar. Bu nedenle, HYA enjeksiyonu OA'yi tedavi etmez, sadece kısa süreliğine enjeksiyonu takip eden zaman içinde OA oluşumunu geciktirir (JULLOVI, 2004; JULLOVI, 2008; HASHIZUME, 2009).



Şekil 42. OA oluşturulmuş ve hiyaluronan enjekte edildikten 4 hafta sonraki eklem radyografileri a) yandan b) önden görünüş

Şekil 43'de ise ikinci grup hiyaluronan enjekte edilmiş ve 8 hafta sonunda termine edilmiş tavşanların radyografileri görülmektedir. Bu uygulamanın radyolojik skor değerleri 2 ve 4 arasında değişmektedir. Buradan açıkça görülmektedir ki HYA uygulamasının olumlu sonuç vermesi 4 haftalık tedavi sürecinde görülmektedir. Ancak, süre uzadıkça tedaviden olumlu sonuç alınamamaktadır. Mikrokürelerin tek başına ekleme uygulanamaması ve HYA ile birlikte verilemsi gerekliliği bu uygulamaların 4 haftalık sadece HYA kontrol grubu ile elde edilen bu bulgulardan farklı sonuç alınmayacağını belirtmektedir. Bu sonuçlara dayanarak HYA ile birlikte enjekte edilecek olan mikrokürelerin 4 haftalık denemelerinin yerine 8 haftalık tedavilerde mikroküreler için 2 doz grubu oluşturulması uygun bulunmuştur. İn vivo HYA kontrol grubu sonucuna dayanarak yapılan bu uygulama projenin başlangıcında hedeflenen uzun süreli tedavi için geliştirilen ilaç salım sisteminin etkinliğinin incelenmesi amacına yöneliktir.

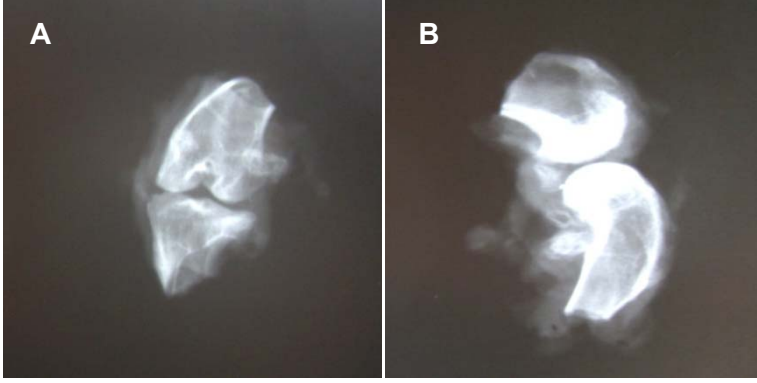


Şekil 43. OA oluşturulmuş ve hiyaluronan enjekte edildikten 8 hafta sonraki eklem radyografileri a) önden b) yandan görünüş

Tedavi grupları D MS-doksisiklin ve D-CS MS-doksisiklin+kondroitin sulfat (D-CS) yüklü mikrokürelerdir. Bu mikroküreler yukarıda belirtilen sonuçlara ve eklem sıvısının-hacminin özellikleri dikkate alınmak suretiyle iki farklı doz (5mg and 7.5mg) olacak şekilde eklem içine uygulanmıştır. Şekil 44 ve 45’de ise, 8 hafta sonundaki sırasıyla hiyaluronan ile birlikte 5 ve 7.5 mg D MS enjekte edilmiş eklemlere ait radyografiler görülmektedir. Şekil 44’de radyolojik skor değeri önden 3 iken yandan 4’tür. 7.5 mg D MS enjekte edilmiş eklemlere ait radyografilerin önden ve yandan radyolojik skor değeri 3 olduğu belirlenmiştir (Şekil 45).

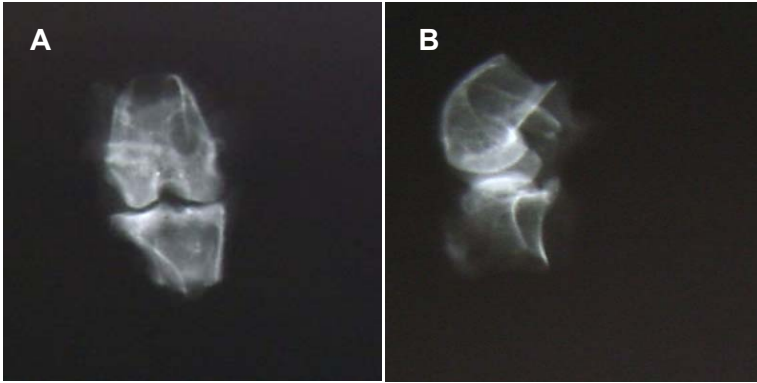


Şekil 44. OA oluşturulmuş ve 5 mg D MS enjekte edildikten 8 hafta sonraki eklem radyografileri a)önden b)yandan görünüş



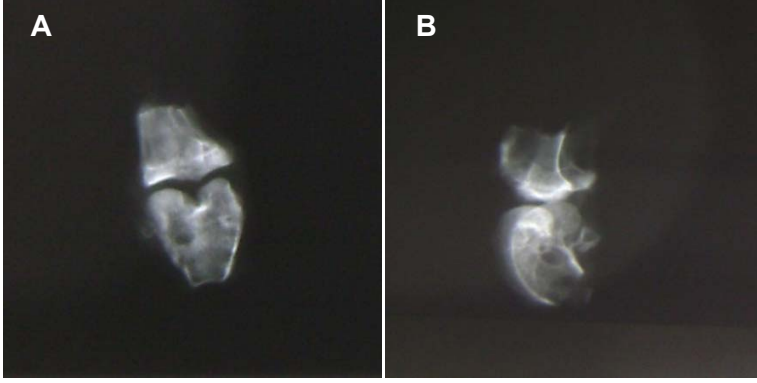
Şekil 45. OA oluşturulmuş ve 7.5 mg D MS enjekte edildikten 8 hafta sonraki eklem radyografileri a)önden b)yandan görünüş

Şekil 46 ve 47'de ise sırasıyla 5 ve 7.5 mg D-CS MS enjekte edilmiş eklemlere ait radyografiler görülmektedir. Eklemlere mikroküreler önceki grupta olduğu gibi hyaluronan ile enjekte edilmiş ve 8 haftalık tedavi süresi sonunda radyografileri çekilmiştir.



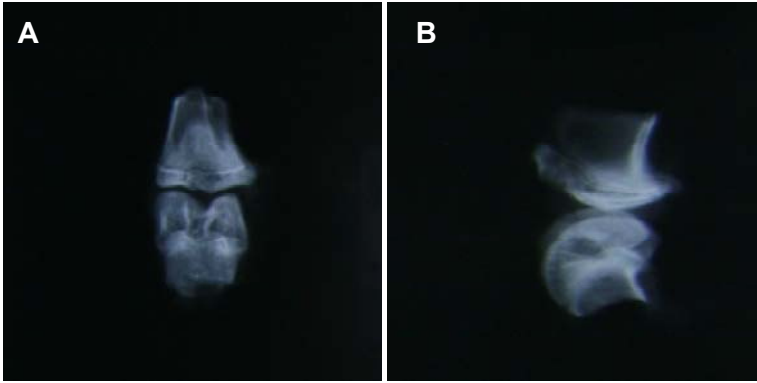
Şekil 46. OA oluşturulmuş ve 5 mg D-CS MS enjekte edildikten 8 hafta sonraki eklem radyografileri a)önden b)yandan görünüş

5 mg D-CS MS enjekte edilmiş eklemlerin skor derecesi önden 2 iken, yandan 3 bulunmuştur. 7.5 mg D-CS MS enjekte edilmiş eklemlerin ise önden 1 iken yandan 2 bulunmuştur. Buradan anlaşıldığı kondroitin sülfat ile birlikte doksisisiklin uygulanması ile osteoartrit gelişimi gerilemektedir.



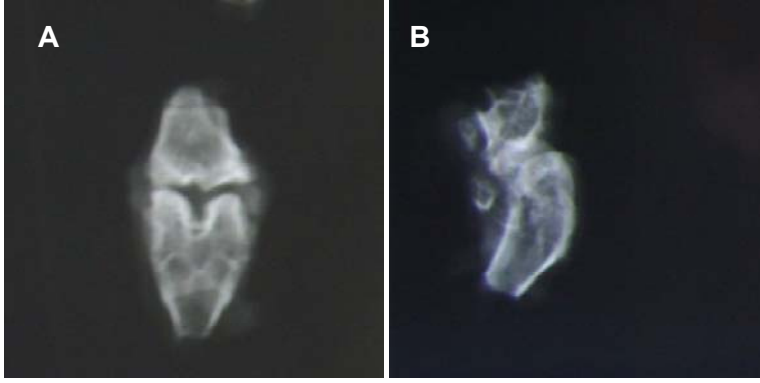
Şekil 47. OA oluşturulmuş ve 7.5 mg D-CS MS enjekte edildikten 8 hafta sonraki eklem radyografileri a)önden b)yandan görünüş

Şekil 48'de ise önden ve yandan radyografileri çekilmiş olan sağlıklı eklemler görülmektedir.



Şekil 48. Sağlıklı tavşan eklemi a)önden b)yandan görünüş

Şekil 49'da ise OA oluşturulmuş ancak 6. haftadan sonra 8 hafta tedavi edilmeksizin bekletildikten sonra sonlandırılmıştır. Bu eklemlerin radyolojik skor derecesi her iki yönden görünüş için 4'tür. Burada osteofit oluşumu belirginleşmiş ve ciddi oranda eklem boşluğu daralması ile kırıkta altı dokusunda sertleşme olduğu radyolojik gözlemlerde tespit edilmiştir.

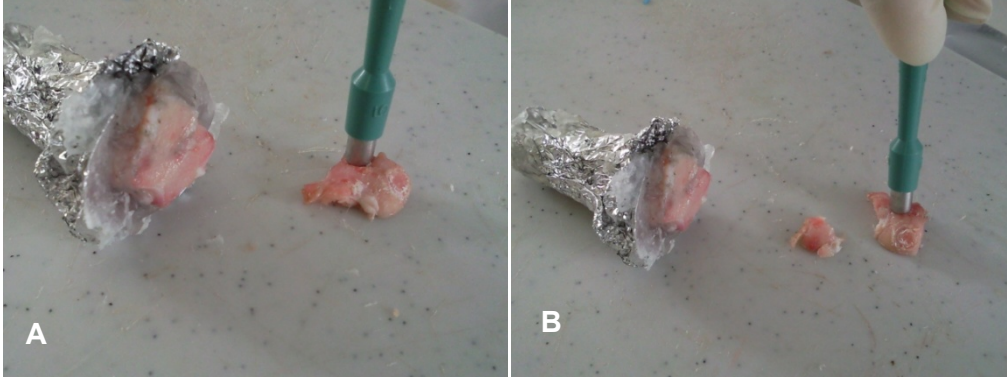


Şekil 49. OA oluşturulmuş ancak tedavi edilmemiş tavşanların 8 hafta sonundaki radyografileri (kollajenaz enjeksiyonundan 14 hafta sonra) a) önden b) yandan görünüş

Radyolojik değerlendirmeler eklemlerin histolojik ve mekanik analizlerini desteklemek amacıyla yapılmaktadır. Ancak bunlar in vivo OA modelin değerlendirilmesinde yeterli oranda kanıtlayıcı unsur oluşturamamaktadır. Bunun nedeninin eklemlerin küçüklüğünden kaynaklanan skorlama zorluklarıdır. Bununla birlikte radyolojik skorlama da elde edilen ortalama sonuçlar 7.5 mg D-CS MS tedavi grubunun OA tedavisi için diğer gruplara nazaran daha iyi olduğunu göstermektedir.

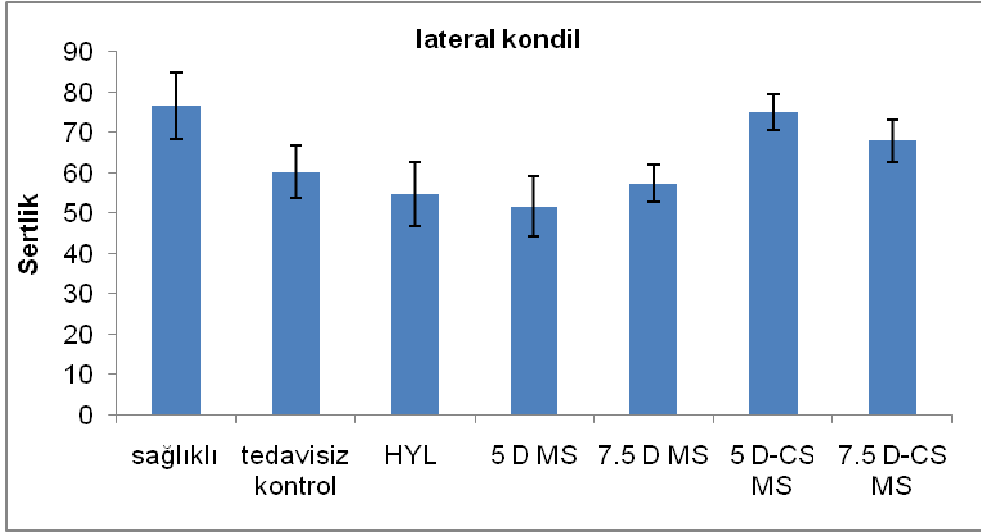
3.3.2.2. Biyomekanik Değerlendirmeler

Kıkırdak mekanik özelliklerinin belirlenmesi için sınırsız gerilme boşalma (stress-relaxation) testi yapılmak istenmiştir. Bu amaçla kalınlığı ve çapı eşit olacak şekilde parçalar kesilmesi gerekmektedir. Eklem yüzeyindeki kıkırdak dokusunun bistiiri ile kesilerek belirli boyutta parçalar alınması denenmiştir. Ancak tavşan eklemine çok küçük ve girintili yapıda olması ve kıkırdak dokusunun çok ince olması sebepleriyle ancak çok ince (1 mm'den az kalınlıkta) ve farklı boyutlarda kıkırdak parçaları hazırlanabilmiştir. Bu parçalara gerilme boşalma testi denendiğinde testin karakteristik grafikleri alınamamış ve anlamlı sonuçlar elde edilememiştir. Daha kalın örnekler oluşturabilmek amacıyla eklemler, kıkırdak yüzeyi dışarıda kalacak şekilde epoksi resin içerisine gömülmüş ve düşük hızlı testere ile yaklaşık 3 cm kalınlığında Şekil 3.50A'da görülen kıkırdaklı bölge kesilmiştir. Bu kesilen kısımdan biyopsi kalemi aracılığıyla belirli şekilde ve boyutta kıkırdak içeren diskler çıkarılmak istenmiştir. Bu aşamada kesitlerin parçalanması ve her denemede yüzey özellikleri eşit olmayan parçalar elde edilmesi yine gerilme boşalma testlerinin uygulanamamasına neden olmuştur (Şekil 50B).



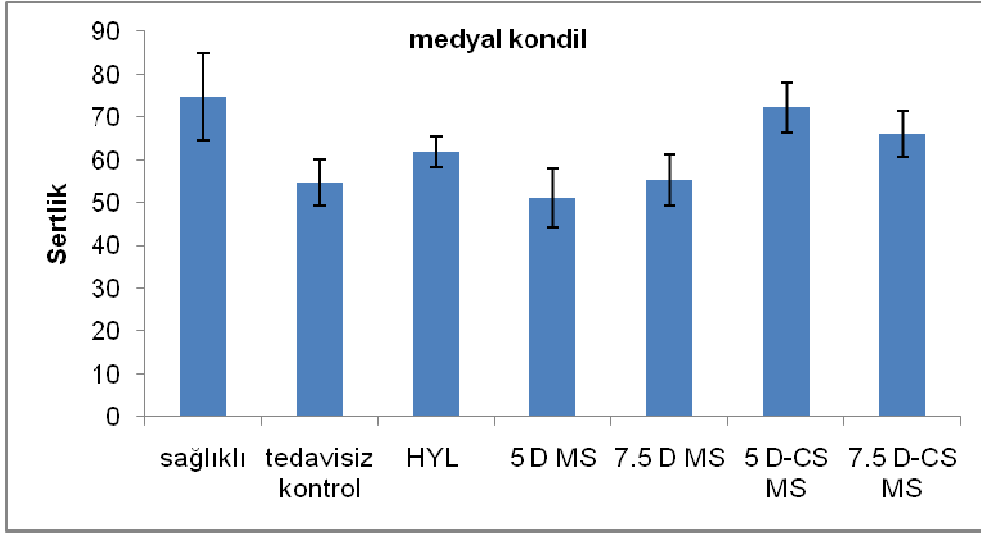
Şekil 50. Mekanik testlere hazırlık için epoksiye gömülmüş tavşan eklemi

Bu nedenle biyomekanik testler, tedavi görmüş ve görmemiş tavşanların terminasyonu sonrasında kıkırdak yüzeyine indentasyon ile sertlik değerleri ölçülerek yapılmıştır. Kıkırdak dokusunun biyomekanik özelliklerindeki değişimler, tedavi sonrası sertlik (hardness) değerlerindeki farklılıklarla belirlenmiştir. Özellikle kıkırdak türü viskoelastik malzemeler için kullanılan sertlik test cihazı ile yapılan ölçümlerde düşük değerler doku dayanımının azalmasına yönelik gösterge olarak görülmektedir. Kıkırdak dokusunda OA gelişimi hem lokal hem de alansal olarak yaygın ve değişik kısımlarda görülebilmektedir. Tüm deney ve kontrol gruplarındaki tavşan kıkırdaklarında lateral ve medyal kondil için ayrı ayrı yapılan ölçüm sonuçları Şekil 51 ve Şekil 52’de sunulmaktadır. Bu sonuçlarda herhangi bir tedavi görmemiş OA’lı eklemlerin en düşük sertlik değerinde olduğu görülmüştür. Bu da OA sonucu eklem kıkırdağının indentasyona dayanımının azaldığı ve sertliğini kaybettiğini belirtmektedir. Eklemlerin her iki kısmındaki ölçümlerde de sağlıklı gruptaki sonuçların en yüksek değerlerde ve literatürdeki mekanik test sonuçlarıyla uyumlu olduğu görülmüştür (BAE, 2003; DARMANIS, 2006; NIEDERAUER, 2004). Lateral kondyl mekanik test sonuçlarına göre (Şekil 51) tedavi grupları arasında 5mg D-CS içeren mikroküreler sağlıklı grup ile hemen hemen aynı değerde bulunmuştur. Bunlara en yakın sertlik değeri ise CS içeren diğer grupta (7.5 mg D-CS) görülmüştür. Diğer tedavi grupları (5 ve 7.5 mg D MS), sadece Hyaluronan içeren grup ve tedavi içermeyen gruptaki sertlik değerlerinin sağlıklı kontrolden istatistiksel olarak anlamlı düşük olduğu gözlenmiştir. Tedavi gruplarında ise 5 mg D-CS grubu ile HYL ve 5 mg D mikroküre gruplarının sertlik değerleri arasında anlamlı farklı bulunmuştur.



Şekil 51. Tavşan lateral kondil eklem kıkırdağının sertlik ölçümü sonuçlarının gruplar için karşılaştırılması (n=6)

Eklem kıkırdağının medyal kondyl bölgesi için sertlik değerlerindeki farklılıklar Şekil 52'de sunulmuştur. Lateral bölgedeki mekanik test sonuçlarından farklı olarak sadece hyaluronan eklenen grubun sertlik değerinde tedavi edilmemiş ve 5 mg D içeren mikrokürelerle tedavi edilmiş olan gruplara göre sayısal bir artış görülmüş ancak istatistiksel olarak anlamlı bulunmamıştır. Sağlıklı kıkırdak içeren grubunun ortalama sertlik değeri, tedavi görmemiş ve sadece D içeren mikrokürelerle tedavi görmüş hastalıklı kıkırdak gruplarının sertlik değerlerinden istatistiksel anlamlı olarak farklı düzeyde bulunmuştur. Aynı tip mikrokürelerin farklı dozları arasında anlamlı bir fark olmadığı parametrik olmayan Mann Whitney-U testi ile yapılan ikili analizlerle belirlenmiştir. Ayrıca mikroküre gruplarında doza bağlı olarak sayısal bir artış olmadığı da görülmüştür. Bu da her iki mikroküre tipinin zamana karşı saldığı ilaç yüzdesi birbirine çok yakındır. 3 aylık bir süre sonunda D MS hapsettiğı ilacın % 37.5'ini salarken aynı şekilde D-CS MS hapsettiğı ilacın % 36.5'ini salmaktadır.



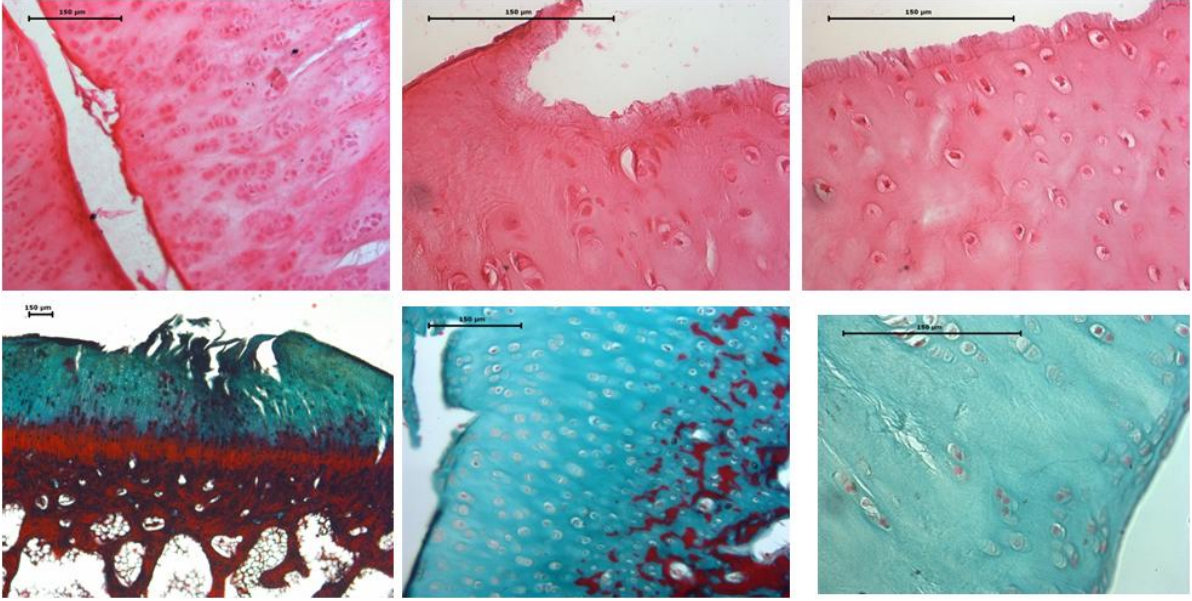
Şekil 52. Tavşan medyal kondil eklem kıkırdağının sertlik ölçümü sonuçlarının gruplar için karşılaştırılması (n=6)

Kıkırdak biyomekanik özelliğinin geri kazanımında, tedavi amacıyla D-CS mikrokürelerin uygulanması ile daha başarılı sonuçların sağlandığı düşünülmektedir.

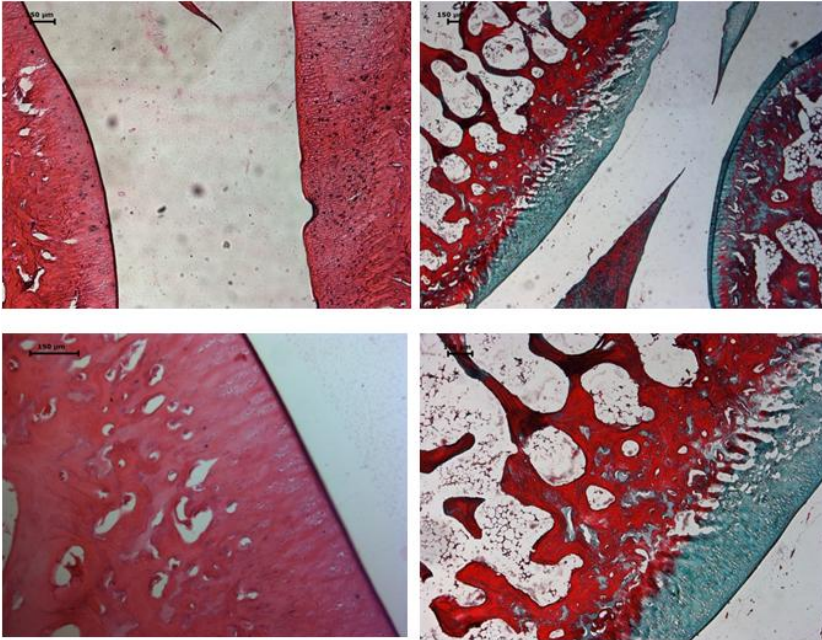
3.3.2.3. Histolojik Değerlendirmeler

In vivo ön deneylerde tek enjeksiyon ile osteoartrit oluşulabilirliği histolojik incelemelerle değerlendirilmiştir. Osteoartrit oluşturulması amacıyla kollajenaz enjekte edilen tavşanlara ait seri kesitler, kontrol grubuna ait seri kesitlerle karşılaştırıldığında modifiye Mankin ve Pritzker skorlama sistemine göre grade 1 ila 3 düzeyde kıkırdak hasarı oluşturulduğu histolojik olarak saptanmıştır. Buna göre osteoartrit oluşturulan hayvanlarda yer yer yüzey devamlılığının bozulduğu, yüzeyel zonda hücrelerin oriyantasyonlarının değişebildiği, bazı alanlarda proliferasyon gösterir biçimde sütun ve yığınlar oluşturabildikleri gözlenmiştir. Kıkırdak hücre dışı matriksinde yer yer ödem ve boyanma zayıflığı izlenmiştir. Şekil 53'de gösterilen histolojik bulgular Şekil 54'de verilen sağlıklı tavşan eklem kıkırdak kesitleri ile karşılaştırıldığında, geri dönüşlü olması hedeflenen kıkırdak hasarı/osteoartrit modelinin başarılı olduğunu göstermektedir.

Ancak bu birinci set (tek enjeksiyonlu) uygulamaların radyolojik sonuçları değerlendirilirken uygulanan canlının (ekleminin) küçük olması ve OA'nin derecesinin düşük olmasının radyolojik skorlamayı zorlaştırdığı görülmüştür. Yapılan araştırmalar 1. ve 4 gün olmak üzere 2 doz enjeksiyonla in vivo deneysel OA modeli oluşturulduğunu göstermektedir (KIKUCHI, 1998). Bu nedenle, bundan sonraki denemede 1. ve 4. günler olacak şekilde iki kez kollajenaz enjeksiyonu yapılmıştır.



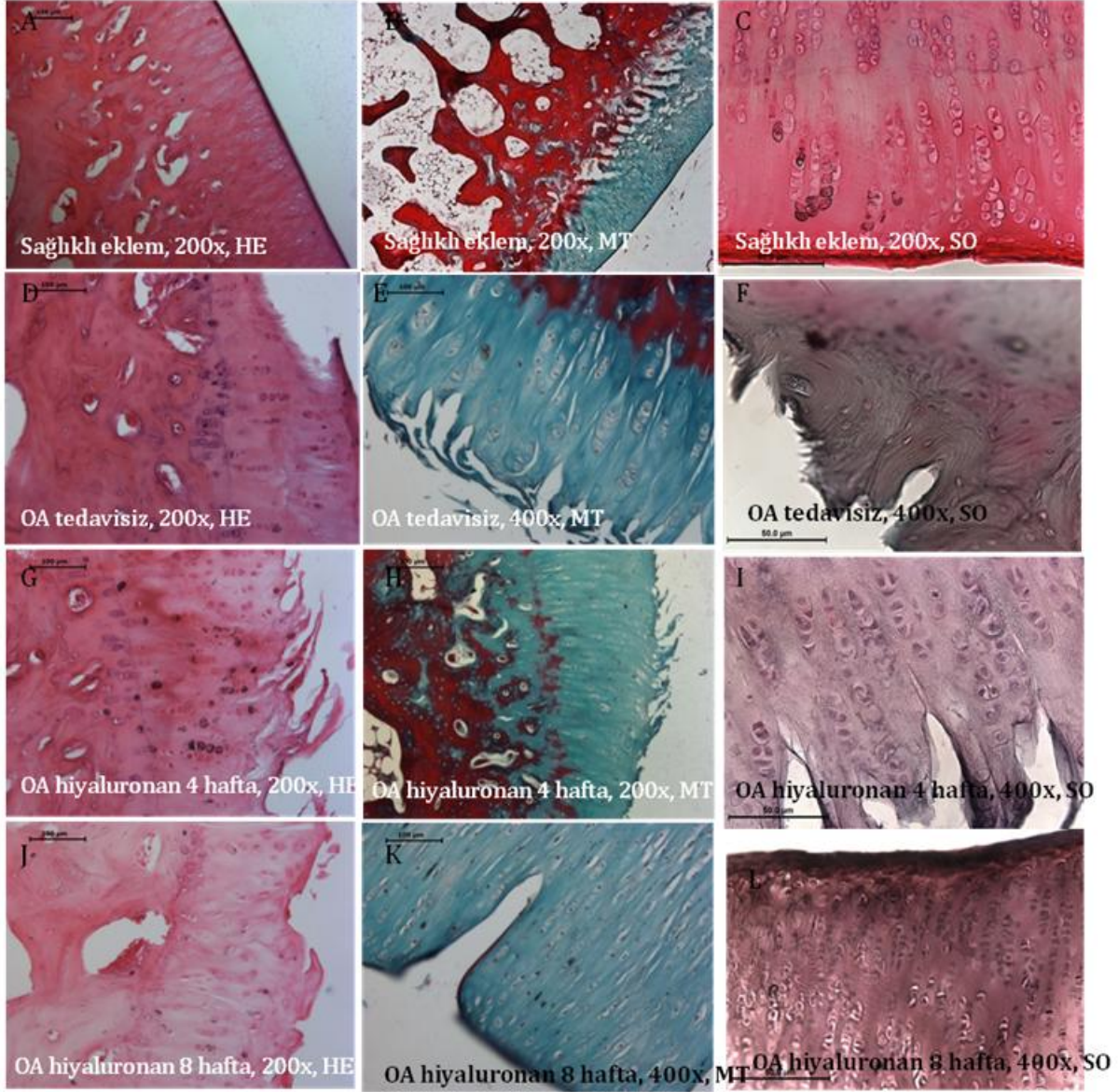
Şekil 53. Üstte hematoksilen eozin, altta Masson trikromla boyalı 1- 3 dile derecelendirilmiş osteoartritli eklem kesitleri görülmektedir. Yüzey devamlılığının değişen derecelerde olduğu ve kondrosit düzeninin yer yer bozulduğu dikkati çekmektedir.



Şekil 54. Solda hematoksilen eozin, sağda Masson trikromla boyalı grade sağlıklı eklem kesitleri görülmektedir. Eklem kıkırdağının yüzeyinin kesintisiz ve düzgün olduğu izlenmektedir.

Mankin ve OARSI (Pritzker) skorları tüm gruplarda birbiriyle istatistiksel olarak anlamlı güçlü olumlu korelasyon göstermiştir. Bu iki skorlamanın tanımlayıcı istatistiksel verileri Tablo 2 ve Tablo 3'de (Bölüm 2) görülmektedir. OA grupları (OA Model grubu ve OA tedavisiz kontrol grubu) sağlıklı kontrol grubu ile karşılaştırıldığında 3'ten 5'e doğru artan istatistiksel olarak

yüksek Mankin/Pritzker skor değerine sahiptir ($p=0.00$). Bu sonuç bize OA modelin başarı ile oluşturulduğunu göstermektedir. Tüm tedavisiz OA gruplarında izlenen orta ile ileri düzeydeki kıkırdak hasarının tedavi gruplarında değişen derecelerde düzelmeye gösterdiği gözlemlenmiştir. Fakat, hiçbir eklem sağlıklı kontrolle aynı skor değerlerini vermemiştir (Şekil 55 ve 56, Tablo 8 ve 9).

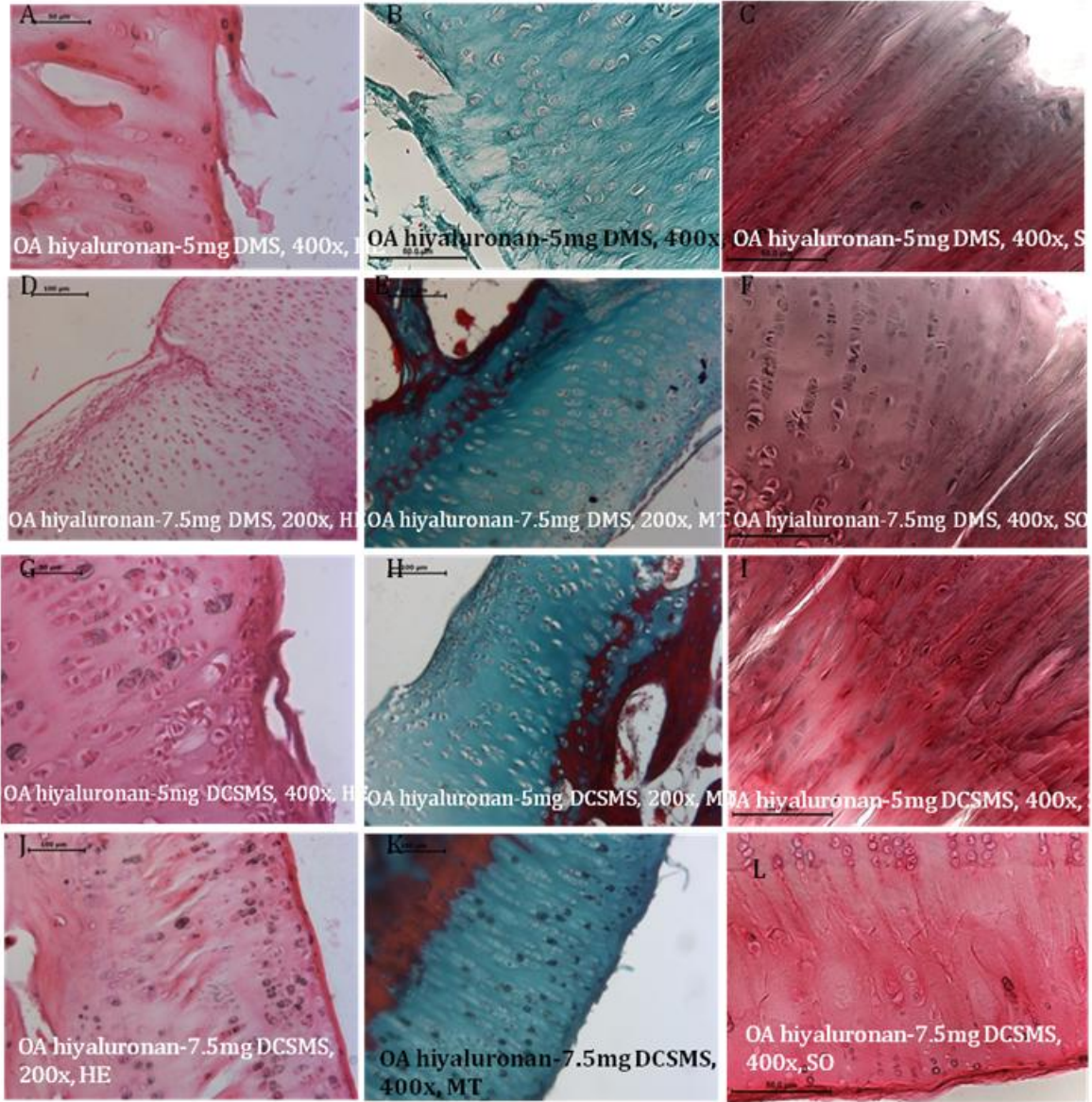


Şekil 55. A-C'de sağlıklı eklem kıkırdığı düz kıkırdak yüzeyi, intact kemik kıkırdak bileşkesi ve sağlıklı kondrosit morfolojisi göstermektedir. D-L, fibrilasyon, yarı oluşumu (K'da) matris dejenerasyonu ile safranin O boyanmasında azalma (F, I ve L) ve hücre içeriğinde değişikliklerle giden farklı derecelerde OA kaynaklı eklem dejenerasyonu göstermektedir. F'de kemik ekspozite olmuştur. Hiyaluronan gruplarındaki eklem dejenerasyonu (G-L) ise tedavisiz OA grubuna göre daha azdır. OA: Osteoarthritis, HE: Haematoksileneozin, MT: Masson trikrom, SO: SafraninO.

Kıkırdak lezyonları farklı dereceli safranin-O boyama kayıpları, yüzey fibrilasyonu, dikey yarıklar ve kondrositlerde sayıca azalma ya da çoğalma, hipertrofi ya da dejenerasyon olarak görülmüştür. 8 haftada kıkırdakta en çok hasar tek başına uygulanan hyaluronan tedavi gruplarında izlenmiştir.

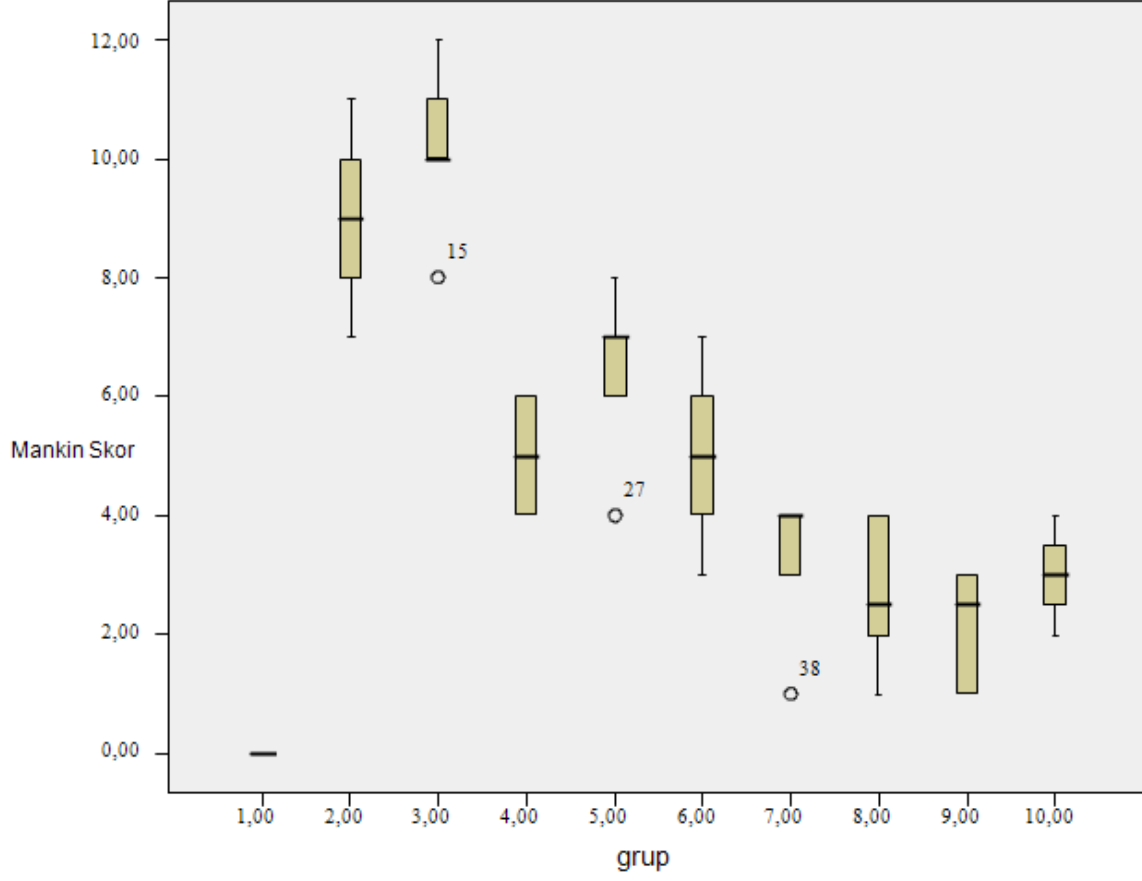
Dört haftalık hyaluronan tedavisi (Mankin $p=0.005$, Pritzker $p=0.018$), hyaluronan –DMS (5mg -Mankin $p=0.017$, Pritzker $p=$ önemsiz -ve 7.5 mg-Mankin $p=0.00$, Pritzker $p=0.006$ -) ve, hyaluronan –D-CSMS (5 mg-Mankin $p=0.00$, Pritzker $p=0.00$ - ve 7.5 mg-Mankin $p=0.00$, Pritzker $p=0.00$) tedavileri tedavisiz OA kontrol grubu ile karşılaştırıldığında Mankin/Pritzker skorları anlamlı biçimde düzelmektedir (Şekil 55 ve 56, Tablo 8 ve 9)

D-CS MS-hyaluronan grupları tek hyaluronan grupları ile karşılaştırıldığında daha iyi skor derecelerine sahip olduğu sonucuna varılmıştır. Fakat farklar sadece 4 haftalık hyaluronan ile 7.5 mg D-CS MS grubu arasında (Mankin $p=0.022$); ve 4 hafta hyaluronan ile 5mg, 7.5 mg D-CSMS grupları arasında (sırasıyla 5mg Mankin $p=0.014$, Pritzker $p=0.011$ için ve, 7.5 mg Mankin $p=0.005$ Pritzker $p=0.003$) istatistiksel olarak anlamlı olduğu bulunmuştur (Şekil 55 ve 56, Tablo 7 ve 8). D-MS-hyaluronan ve D-CSMS-hyaluronan gruplarının histolojik olarak benzer ve istatistiksel olarak anlamlı fark göstermeyen iyileştirici işlevselliğe sahip olduğu görülmüştür. Tek istisna ise istatistiksel olarak yüksek Pritzker skora sahip olan 7.5 mg D-CS MS-hyaluronan grubu ile 5 mg D-MS-hyaluronan grubu olarak bulunmuştur. ($p=0.013$). (Şekil 55 ve 56, Tablo 8 ve 9).

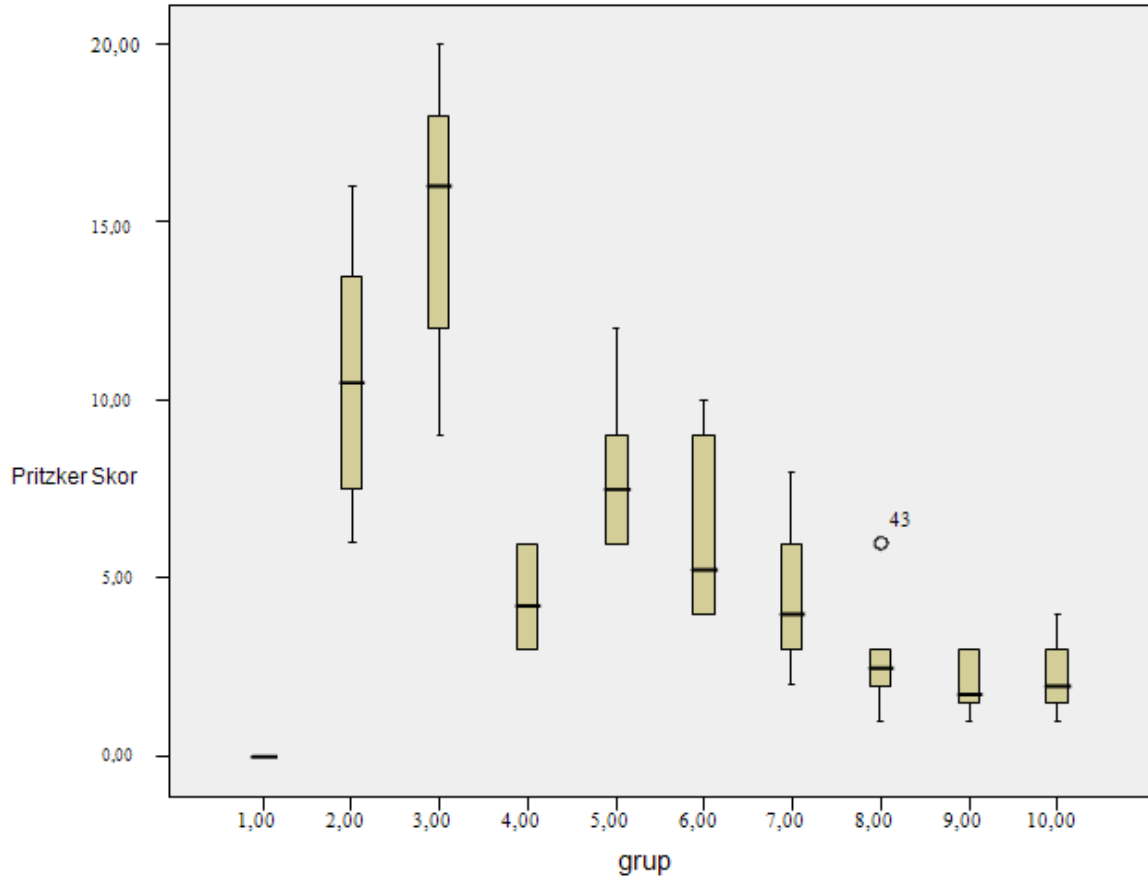


Şekil 56 Farklı tedavi gruplarına ait eklem kıkırdakları hafif ila orta derecede, fibrilasyonu kondrosit dejenerasyonu ve matriks hasarı ile giden OA kaynaklı eklem kıkırdakları değişiklikleri göstermektedir. Tüm gruplarda dejenrasyonun şiddeti tedavisiz OA grubuna göre daha iyidir. Bazı tedavilerle safranin O boyanması geri kazanılmaktadır (C F, I ve L). J ila L'de hafif pürüklü ya da düz eklem yüzeyi görülmektedir. OA: Osteoarthritis, HE: Haematoxylin eozin, MT: Masson trikrom, SO: Safranin O.

Tablo 8. Mankin skorlamasının tanımlayıcı istatistiksel verileri



Tablo 9. OARSI Pritzker skorlamasının tanımlayıcı istatistiksel verileri



4. SONUÇLAR ve ÖNERİLER

Bu projede, doksisisiklin ve doksisisiklin-kondroitin sülfat yüklü mikrokürelerin osteoartrit hastalığını tedavi potansiyeli araştırılmıştır. Polimer olarak molekül ağırlığı 14 kDa olan polikaprolakton (PCL) kullanılmıştır. Konvansiyonel tedavilerde (NSAIDS) ana hedef, ağrının geçirilmesi ve hastanın rahatlatılmasıdır. Ancak bu yaklaşımların hastalığın seyrini değiştirmede için tedavi etkinliği yoktur. Bu projede geliştirilen OA tedavi yaklaşımının konvansiyonel tedavilere alternatif olması hedeflenmiştir. Bu amaçla daha önceden hazırlanmış olan doksisisiklin yüklenmiş PCL(14 kDa) mikroküreler ile proje kapsamında geliştirilen doksisisiklin-kondroitin sülfat yüklü PCL(14 kDa) mikrokürelerin hücre kültürü ve canlı uygulamaları yapılmıştır. Eklem içine enjeksiyon için en önemli faktörlerden biri olan mikroküre boyutu, hazırlanan doksisisiklin-kondroitin sülfat yüklü mikroküreler için ortalama 12 µm'dir. Bu boyutcanlı çalışmaları için oldukça uygundur. Yapılan ilaç salım profili araştırmaları üç ay sonunda yüklenen ilacın yaklaşık % 37'sini saldıgını göstermiştir. Toplam salınan ilaç miktarı ise 1.85 mg kadar bulunmuştur. Uygulanan dozlarda doksisisiklinin ve mikrokürelerin biyouyumluluğu 3T3 hücreleri ile görüldükten sonra hücre ve canlılarda biyoetkinlik deneylerinde kullanılmışlardır.

Hücre kültüründe osteoartritli tavşandan alınan kırıkardan hücre izolasyonu yapılmıştır. Kırıkardak ortamını canlandırmak amacıyla hücreler agaroz gömülmüş ve üç boyutlu olmaları sağlanmıştır. Aynı şekilde, hücre kültür vasatına ilave edilen iltihaplanmayı sağlayan sitokinlerden olan interlökin 1-beta ile de hastalıklı eklem sıvısı ortamı oluşturulmuştur. Hücre ve vasat ayrı ayrı toplanıp değerlendirilmiş ve 9 ve 15 günlerin sonunda GAG, kollajen ve MMP-13 tayinleri yapılmıştır. Buna göre, disklerdeki GAG miktarları beklenenlerden yüksektir ve gruplar arasında anlamlı değişiklik göstermemektedir. Bu da uygulamaların GAG sentezi üzerinde moleküler düzeyde bir etkisi olmadığını göstermektedir. Vasata salınan GAG miktarlarında ise ancak 15. güne geldiğinde farklılıklar belirginleşmiştir. Tek başına IL-1β eklenen kontrol grubunun vasata salmış olduğu GAG miktarı, IL-1β eklenen tedavi gruplarından yüksektir. Bu sonuç doksisisiklinin OA ile ilgili enzimler üzerindeki engelleyici etkisinin zamanla ortaya çıktığını göstermektedir. GAG miktarlarında tedavi gruplarında görülen tutarlılık kollajen miktarlarında gözlenmemiştir. Bunun sebebinin ise uygulanan IL-1β'nin kollajen parçalanması için yeterli doz ve sürede olmamasından dolayı, GAG için görülen parçalanma etkilerini gösterememesi olabileceği düşünülmektedir. Yapılan çalışmalarda doksisisiklinin MMP-13 ortalama değerlerini kontrol düzeyine düşürüldüğü ve sadece doksisisiklin içeren mikrokürelerin bu anlamda daha oldukça başarılı sonuç verdiği gözlenmiştir. Bu bulgular, in vivo deneylerin daha uzun sürelerde değerlendirilmesi gerekliliğini desteklemiştir.

Canlı ile yapılan çalışmalarda ise, doksisisiklin (D MS) ve doksisisiklin-kondroitin sülfat (D-CS MS) yüklü mikroküreler, 5 mg ve 7.5 mg olacak şekilde iki doz olacak şekilde hyaluronan ile karıştırılmak suretiyle eklem içine enjekte edilmiştir. D MS-hyaluronan ve D-CSMS-hyaluronan grupları histolojik olarak benzer ve istatistiksel olarak anlamlı fark göstermeyen iyileştirici işlevselliğe sahip olduğu görülmüştür. İstatistiksel olarak, 7.5 mg D-CSMS-hyaluronan ile 5 mg DMS-hyaluronan gruplarının yüksek Pritzker skora sahip olduğu görülmüştür. Bununla birlikte biyomekanik ve radyolojik değerlendirmelerde salım sistemine CS eklenmesiyle sadece Doksisisiklin taşıyan mikrokürelere göre daha iyi sonuçlar alınmıştır. Sonuç olarak, doksisisiklin-kondroitin sülfat birlikte yüklenmiş olmasının beklenen düzeyde olmasa da tedaviye olumlu kazanım sağladığı görülmüştür. D ve D-CS yüklü mikrokürelerin enjekte edildiği grupların HYA enjekte edilmiş ve tedavi görmemiş gruplarla karşılaştırıldığında genel olarak tedavi potansiyellerinin değerlendirmelerinin daha iyi olduğu gözlenmiştir. Kondroitin sülfat, kırık dokusu için oldukça önemli bir bileşendir. Bu nedenle bu ajanın tedavi için önemli bir avantaj sağlaması beklenmiştir. Ancak, kondroitin sülfatın sudaki çözünürlüğünün yüksek olması, bu ajanın PCL'e yüklenmesinin yeterli düzeyde sağlanamaması ile ilgili olabileceğini düşündürmektedir.

Bu projedeki amaca yönelik ileride yapılacak araştırmalarda kondroitin sülfatın yükleme verimini arttıracak yaklaşımlarla mikroküre oluşturulmasının daha etkin sonuçlar sağlayacağı düşünülmektedir. Kollajenin in vitro parçalanmasını gözlemleyebilmek için hücre kültürü deney süresinin daha uzun (bir aylık yapılması) veya uygulanan IL-1 β konsantrasyonunun artırılması da önerilmektedir. Ayrıca bu araştırmalarda OA oluşumu ve ilerlemesi hakkında daha ayrıntılı yorum yapabilmek için MMP-3 seviyesinin de ölçülmesi sonuçları destekleyici olacaktır.

Bunlara ek olarak, canlı deneylerindeki doz çalışmasının 5 ve 7.5 mg ile sınırlı kalmayıp, uygulanabilir daha yüksek dozlara çıkarılmasının tedavi etkinliği-doz ilişkisi oluşturulması yönünden daha fazla bilgi üreteceği düşünülmektedir. Dozla birlikte tedavi süresi de artırılarak, uzun süreli salımın canlı deneylerle ispat edilmesi yoluna gidilmelidir. Bu projede yürütülen in vivo deneylerin bir limitasyonu tavşan denekler kullanılmasıdır. Tavşanların eklem bölgesinin boyutlarının küçük olması, yapılarının çok hassas olup uzun süre takip edilememeleri gibi sorunlar yukarıda belirtilen doz artırılması, süre uzatılması v.b. öneriler için tercih edilmemesini göstermektedir. Bu amaçla koyun v.b. canlıların kullanılması önerilebilir.

KAYNAKLAR

- AIGNER, T., Sto, J., Collagens—major component of the physiological cartilage matrix, major target of cartilage degeneration, major tool in cartilage repair, *Advanced Drug Delivery Reviews*, 55 1569– 1593, (2003).
- AISHWARYA, S., Mahalakshmi, S., and Sehgal, P.K., Collagen-coated polycaprolactone microparticles as a controlled drug delivery system, *Journal of Microencapsulation*, 25(5): 298–306, (2008).
- BAE, W. C., Temple, M.M., Amiel, D., Coutts, R.D., Niederauer, G.G. and Sah, R.L., Indentation Testing of Human Cartilage. Sensitivity to Articular Surface Degeneration, *Arthritis and Rheumatism*, 48(12) :3382–3394,(2003).
- BARKSBY, H.E., Hui,W., Wappler, I., Interleukin-1 in Combination With Oncostatin M Up-Regulates Multiple Genes in Chondrocytes, *Arthritis and Rheumatism*, Vol. 54, (2):540–550, (2006).
- BENOIT MA, Baras B, Gillard J., Preparation and characterization of protein-loaded poly (ϵ -caprolactone) microparticles for oral vaccine delivery, *Int J Pharm* 184:73–84, (1999).
- BLUMBERG, TJ, Natoli, RM, Athanasiou, K.A., Effects of Doxycycline on Articular Cartilage GAG Release and Mechanical Properties *Following Impact. Biotechnology and Bioengineering* 100(3):506-515, (2008).
- CANCEDDA, R., Dozin, B., Tissue Engineering and cell therapy of cartilage and bone, *Matrix Biology*. 22 81-91, (2003).
- CHOI, D. H., Moon, I. S., Choi, B. K., Paik, W., Kim, Y. S., Choi, S. H., Kim, C.K., Effects of sub-antimicrobial dose doxycycline therapy on cervicular fluid MMP-2, and gingival tissue MMP-9, TIMP-1 and IL-6 levels in chronic periodontitis, *Journal of Periodontal Research*, 39, 20–26, (2004).
- CHOI, J.-H., Choi, J.-H, Kim, D.-Y., Yoon, J.-H, Youn, H.-Y., Yi, J.B., Rhee, H.-I, Ryu, K.H., Jung, K., Han, C.-K., Kwak, W.-J. and Cho, Y.-B., Effects of SKI 306X, a new herbal agent, on proteoglycan degradation incartilage explant culture and collagenase-induced rabbit osteoarthritis model, *Osteoarthritis and Cartilage*, 10, 471–478, (2002).
- COOK, J.L., Andersen, C.C., (1999). Effects of human recombinant interleukin1beta on canine chondrocytes in three dimensional culture. *AJVR*, Vol 61:No:7
- CORTIAL, D., Gouttenoire, J., Rousseau, C.F., Ronzie` re, MC., Piccardi,N., Msika, P., Herbage, D., Mallein-Gerin F. and Freyria, A.M., Activation by IL-1 of bovine articular chondrocytes in culture within a 3D collagen-based scaffold. An in vitro model to address the effect of compounds with therapeutic potential in osteoarthritis, *Osteoarthritis and Cartilage* 14, 631-640,(2006).
- DAHAN, A., Hoffman, A., Rationalizing the selection of oral lipid based drug delivery systems by an in vitro dynamic lipolysis model for improved oral bioavailability of poorly water soluble drugs, *Journal of Controlled Release* 129 :1–10, (2008)

DARMANIS, S., Static indentation test for neocartilage surface hardness in repair of periosteal articular cartilage defects, *Acta Orthop. Belg.*, , 72, 621-632, (2006).

DENG, T., Huang, S., Zhou, S., He, L., Jin, Y., Cartilage regeneration using a novel gelatin chondroitin–hyaluronan hybrid scaffold containing bFGF-impregnated microspheres, *Journal of Microencapsulation*, 24(2): 163–174, (2007).

DIEFENBECK, M., Muckley, T., Hofmann, G.O., Prophylaxis and treatment of implant-related infections by local application of antibiotics, *Injury*, 37:65-104, (2006).

DORATI, R., Genta, I., Montanari, L., Cilurzo, F., Buttafava, A., Faucitano, A., Conti, B., Effect of γ -irradiation on PLGA/PEG microspheres containing ovalbumin, *Journal of Controlled Release* 107:78-90, (2005).

DVORAK, L.D., Cook, J.L., Kreeger, J.M., Kuroki, K. and Tomlinson, J.L., Effects of carprofen and dexamethasone on canine chondrocytes in a three-dimensional culture model of osteoarthritis, *AJVR*, 63(10):1363-1369, (2002).

EISENBERG, S.R., Grodzinsky A.J., Electrokinetic micromodel of extracellular-matrix and other poly-electrolyte networks, *Physicochem. Hydrodyn*, 10, 517–39, (1988).

ERDEMLI, O., Çaptuğ, O., Bilgili, H., 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(1):295-308, (2010).

FARNDALE RW, Buttle DJ, Barret AJ., Improved quantitation and discrimination of sulfated glycosaminoglycans by use of dimethylmethylene blue, *Biochim Biophys Acta*, 883:173-7, (1986).

FARSHID M.H., S., Pedersen, D. R., Martin, J.A., Hillis, S. L., Brown, T.D., Automated Objective Scoring of Histologically Apparent Cartilage Degeneration Using a Custom Image Analysis Program, *J Orthop Res*, 27:522–528, (2009).

GAPSKI, R., Barr, J. L., Sarmant, D. P., Layher, M. G., Socransky, S. S., Giannobile, W. V., Effect of systemic matrix metalloproteinase inhibition on periodontal wound repair: A proof of concept trial, *Journal of Periodontology*, 75, 441–452, (2004).

GERWIN, N., Hops, C., Lucke, A., Intraarticular drug delivery in osteoarthritis, *Advanced Drug Delivery Reviews*, 58 :226– 242, (2006).

GOLUB, L.M., Ramamurthy, N.S., McNamara, T.F., Greenwald, R.A., Rifkin, B.R. Tetracyclines inhibit connective tissue breakdown: New therapeutic implications for an old family of drugs. *Critical Reviews in Oral Biology and Medicine*, 2(2):297-322 (1991)

HA J.H., Kim, S.H., Han, S.Y., Albumin release from bioerodible hydrogels based on semi-interpenetrating polymer Networks composed of poly (ϵ -caprolactone) and poly(ethylene glycol) macromer, *J Cont Rel*, 49:253–262, (1997).

HAERDI-LANDERER, M.C., Suter, M.M., Steiner, A., Wittenbrink, M.M., Gander, A.P.B.A., In vitro cell compatibility and antibacterial activity of microencapsulated doxycycline designed for improved localized therapy of septic arthritis, *Journal of antimicrobial chemotherapy*, 61,(2008).

HAERDI-LANDERER M.C., Suter M.M., Steiner A., Intra-articular administration of doxycycline in calves, *Am J Vet Res*, 68: 1324–31, (2007).

HANEMAAIJER, R., Visser, H, Koolwijk, P., Sorsa, T., Salo, T., Golub, L.M., Hinsbergh, V.W.M.V., Inhibition of MMP Synthesis by Doxycycline and Chemically Modified Tetracyclins in Human Endothelial Cells, *Adv Dent Res*, 12:114-118, (1998).

HANSSEN, A.D. Local antibiotic delivery vehicles in treatment of musculoskeletal infection, *Clin. Orthop. Relat. Res.* 437: 91-96, (2005)

HASHIZUME, M. and Mihara, M., Desirable effect of combination therapy with high molecular weight hyaluronate and NSAIDs on MMP production *Osteoarthritis and Cartilage* 17, 1513-1518, (2009).

HEYWOOD H.K., Sembi P.K., Bader D.L., Cellular utilization determines viability and matrix distribution profiles in chondrocyte-seeded alginate constructs, *Tissue Engineering*, 10:1467–1479, (2004).

HOLLAND, T.A., Tabata, Y., Mikos, A.G., In vitro release of transforming growth factor- β 1 from gelatin microparticles encapsulated in biodegradable, injectable oligo(poly(ethylene glycol) fumarate) hydrogels, *Journal of Controlled Release*, 91 299–313, (2003).

HUANG W, Wang Y, Ren L, Du C, S. , A novel PHBV/HA microsphere releasing system loaded with alendronate, *Materials Science and Engineering C* 29:2221–2225, (2009).

INDRAWATTANA N., Chen G, Tadokoro M, Shann LH, Ohgushi H, Tateishi T, Tanaka J, Bunyaratvej, Growth factor combination for chondrogenic induction from human mesenchymal stem cell, *Biochem. Biophys. Res. Commun*, 320: 914-919, (2004).

JIANG, T., Petersen, R.R., Call, G., Ofek, G., Gao, J. and Yao, J.Q. Development of chondroitin sulfate encapsulated PLGA microsphere delivery systems with controllable multiple burst releases for treating osteoarthritis. (2011) *J.Biomed Mater Res. Part B: Appl Biomater* 97B:355-363.

JULOVI, S.M., Yasuda T., Shimizu, M., Hiramitsu, T. and Nakamura, T., Inhibition of Interleukin-1 β -stimulated production of matrix metalloproteinases by hyaluronan via CD44 in human articular cartilage, *Arthritis and Rheumatism*, 50(2): 516-525, (2004).

JULOVI, S.M., Ito, H., Hiramitsu, T., Yasuda, T., Nakamura, T., Hyaluronan inhibits IL-1 β -stimulated production via down-regulation of phosphorylated p38 in SW-1353 human chondrosarcoma cells. *Mod Rheumatol* 18:263-270, (2008).

KALKAN, A., Özden, M., Denk, A., Serhatlıoğlu, S., Demirdağ, K., Kılıç, S.S., Diyabetik Bir Hastada *Brucella* Septik Artriti. Brucellar Septic Arthritis In A Diabetic Patient. *İnfeksiyon Dergisi (Turkish Journal of Infection)*, 20 (1): 61-64, (2006).

KAVAS, A., Özdemir, M., Gürses, S., Keskin, D., Tezcaner, A., In vitro investigation and biomechanical modeling of the effects of PLF-68 on osteoarthritis in a three-dimensional model. *Biomech Model Mechanobiol*, DOI: 10.1007/s10237-010-0262-2, (2010).

KEMALA, T., Budianto, E. and Soegiyono, B. Preparation and characterization of microspheres based on blend of poly(lactic acid) and poly(ϵ -caprolactone) with poly(vinyl alcohol) as emulsifier. *Arabian Journal of Chemistry :Article In Press.*, (2010)

KIJOWSKI, R., Blankenbaker, D., Stanton, P., Fine, J. and De Smet, A., Arthroscopic Validation of Radiographic Grading Scales of Osteoarthritis of Tibiofemoral Joint, *AJR* 187:794-799, (2006).

KIKUCHI, T., Skuta, T. and Yamaguchi, T., Intra-articular injection of collagenase induces experimental osteoarthritis in mature rabbits, *Osteoarthritis and Cartilage* 6, 177–186,(1998).

KIM J.H., Ryu, K.H., Jung, K.W., Han, C.K., Kwak, W.J. and Cho, Y.B., SKI306X Suppresses cartilage destruction and inhibits the production of matrix metalloproteinase in rabbit joint cartilage explant culture, *J. Pharmacol Sci.* 98:298-306, (2005).

KIM, B.K., Hwang, S.J., Park, J.B. and Park, H.J. Characteristics of felodipine-located poly(ϵ -caprolactone) microspheres. *Journal of Microencapsulation* 22(2):193-203, (2005).

KUROKI, K., Cook J.L., Tomlinson, J.L., Kreeger, J.M., In vitro characterization of chondrocytes isolated from naturally occurring osteochondrosis lesions of the humeral head of dogs, *AJVR* 63(2):186-193, (2002).

KUTSAL G.Y. Osteoartrit.Modern Tıp Seminerleri Dizisi, Güneş Kitabevi Ankara, (1999).

KUTSAL G. Y.Geriatri.Modern Tıp Seminerleri Dizisi.Güneş Kitabevi, Ankara, (2003).

LITTLE CB, Meeker CT, Golub SB, Lawlor KE, Farmer PJ, Smith SM, (2007). Blocking aggrecanase cleavage in the aggrecan interglobular domain abrogates cartilage erosion and promotes cartilage repair. *J Clin Invest.*;117(6):1627–36. Epub 2007 May 17.

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).

LUGINBUEHL, V., Meinel, L., Merkle, H.P., Gander, B., Localized delivery of growth factors for bone repair. *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics* 58 197–208, (2004).

MANNING, M. W., Cassis, L. A., Daugherty, A., Differential effects of doxycycline, a broad spectrum matrix metalloproteinase inhibitor, on angiotensin II-induced atherosclerosis and abdominal aortic aneurysms, *Arteriosclerosis, Thrombosis and Vascular Biology*, 23, 483–488, (2003).

MASUOKA, K., Asazuma, T., Ishihara, M., Sato, M., Hattori, H., Ishihara, M., Yoshihara, Y., Matsui, T., Takase, B, Kikuchi, M., Nemoto, K., Tissue Engineering of Articular Cartilage Using an Allograft of Cultured Chondrocytes in a Membrane-Sealed Atelocollagen Honeycomb-Shaped Scaffold (ACHMS Scaffold), *Wiley Periodicals, Inc. J Biomed Mater Res Part B: Appl Biomater*, 75B: 177–184, (2005)

MILNER, J.M. and Cawston, T.E., Matrix metalloproteinase knockout studies and the potential use of matrix metalloproteinase inhibitors in the rheumatic diseases, *Curr. Drug Targets Inflamm. Allergy*, 4(3):363–375, (2005).

MUNDARGI, R.C., Srirangarajan, S., Agnihotri, S.A., Patil, S.A., Ravindra, S., Setty, S.B., Aminabhavi, T.M., Development and evaluation of novel biodegradable microspheres based on poly(D,L-lactide-co-glycolide) and poly(ϵ -caprolactone) for controlled delivery of doxycycline in the treatment of human periodontal pocket: In vitro and in vivo studies, *Journal of Controlled Release*, 119:59–68, (2007).

- NAIR, L.S. and Laurencin, C.T. Biodegradable polymers as biomaterials. *Prog. Polym. Sci.* 32: 762-798, (2007)
- NAGASE, H. and Kashiwagi, M., Aggrecanases and cartilage matrix degradation, *Arthritis Res. Ther.* 5(2):94–103, (2003).
- NERUCCI, F., Fioravanti, A., Cicero, M.R., Collodel G. and R. Marcolongo R., Effects of chondroitin sulfate and interleukin-1 β on human chondrocyte cultures exposed to pressurization: a biochemical and morphological study, *Osteoarthritis and Cartilage* 8, 279–287, (2000)
- NIEDERAUER, G.B. Correlation of Cartilage Stiffness to Thickness and Level of Degeneration Using a Handheld Indentation Probe *Annals of Biomedical Engineering*, Vol. 32 (3) 352–359, (2004).
- NISHIYAMA, N. and Kataoka, K., Current state, achievements, and future prospects of polymeric micelles as nanocarriers for drug and gene delivery, *Pharmacology & Therapeutics*, 112: 630–648, (2006).
- NORDSTROM, D., Lindy, O., Lauhio, A., Sorsa, T., Santavirta, S., Konttinen, Y. T., Anti-collagenolytic mechanism of action of doxycycline treatment in rheumatoid arthritis, *Rheumatology International*, 17, 175–180, (1998).
- O'DONNELL, P.B. and McGinity, J.W., Preparation of microspheres by the solvent evaporation technique, *Advanced Drug Delivery Reviews*, 28:25-42, (1997).
- OMELCHENKO, T., Vasiliev, J. M. . Gelfand, I. M, Feder, H. H. ve Bonder, E. M., Mechanisms of polarization of the shape of fibroblasts and epitheliocytes: Separation of the roles of microtubules and Rhoddependent actin–myosin contractility. *PNAS*, Vol 99, No:16., (2002).
- OSTACOLO, L., Russo, P., Rosa, G. D., Rotonda, M.I.L., Maglio, G., Nese, G., Spagnuolo, G., Sandro Rengo, S., Oliva, A., Quaglia, F. Poly(ether ester amide) Microspheres for Protein Delivery: Influence of Copolymer, *Composition on Technological and Biological Properties, Macromol. Biosci*, 8, 682–689, (2008).
- PALMER, A.W., Wilson, C.G., Baum, E.J., Composition-function relationships during IL-1-induced cartilage degradation and recovery. *OsteoArthritis and Cartilage* 17:1029-1039, (2009).
- PATEL, P., Mundargi, R.C., Babu, V.R., Jain, D., Rangaswamy, V., Aminabhavi, T.M., Microencapsulation of Doxycycline into Poly(lactide-coglycolide) by Spray Drying Technique: Effect of Polymer Molecular Weight on Process Parameters, *Journal of Applied Polymer Science*, 108, 4038–4046, (2008).
- PATEL, R.N., Attur, M.G., Dave, M.N., Patel, I.V., Stuchin, S.A., Abramson, S.B., and Ashok R. Amin, A.R., A Novel Mechanism of Action of Chemically Modified Tetracyclines: Inhibition of COX-2-Mediated Prostaglandin E2 Production, *The Journal of Immunology*, 163: 3459-3467, (1999).
- PRITZKER, K.P.H., Gay, S., Jimenez, S. A., Ostergaard, K., Pelletier, J.-P., Revell, P. A., Salter, D., B. van den Berg, W., Osteoarthritis cartilage histopathology: grading and staging, *OsteoArthritis and Cartilage*, 14, 13-29, (2006).

PURÌ, S., Kallinteri, P., Higgins, S., Hutcheon, G.A., Garnett, M.C., Drug incorporation and release of water soluble drugs from novel functionalised poly(glycerol adipate) nanoparticles, *Journal of Controlled Release*, 125: 59–67, (2008).

RADIN S., Chen, T., Ducheyne, P. The controlled release of drugs from emulsified, sol gel processed silica microspheres, *Biomaterials* 30 850-858, (2009).

RAFFIN, R.P., Colomé, L.M. and Guterres, S.S., Pohlmann, A.R. Enteric Controlled-Release Pantoprazole-Loaded Microparticles Prepared by Using Eudragit S100 and Poly(ϵ -caprolactone) Blend, *Pharmaceutical Development and Technology*, 12:463–471, (2007).

REDDY, G.K. and Enwemeka, CS., A simplified method for the analysis of hydroxyproline in biological tissues. *Clin. Biochem*, 29:225-229, (1996).

SALVAT C., Piganet A., Humbert L., Berenbaum F., Thiron S., Immature murine articular chondrocytes in primary culture: a new tool for investigating cartilage, *Osteoarthritis and Cartilage*, 13, 243-249, (2005).

SARZI-PUTTINI,P., Cimmino, M.A., Scarpa, R., Caporali, R., Parazzini, F., Zaninelli, A. Atzeni, F. Canesi, B., Osteoarthritis: an overview of the disease and its treatment strategies, *Semin. Arthritis Rheum*. 35 :1– 10, (2005).

SCHOLAR, E., Doxycycline; *Elsevier Inc.*, (2007).

SECHRIEST, V.F., Miao, Y.J., Niyibizi, C., Westerhausen-Larson A., Matthew, H.W., Evans, C.H., Fu, F.H., Suh, J.K., GAG-augmented polysaccharide hydrogel: A novel biocompatible and biodegradable material to support chondrogenesis, *Journal of Biomedical Material Research*, 49:534–541, (2000).

SENDİL, D., Gürsel, İ., Wise, D.L., Hasırcı, V., Antibiotic Release From Biodegradable PHBV Microparticles, *Journal of Controlled Release*, 59:207-217, (1999).

SHANMUGANATHAN, S., Shanumugasundaram, N., Adhirajan, N., Lakshmi, T.S.R., Babu, M, Preparation and characterization of chitosan microspheres for doxycycline delivery, *Carbohydrate Polymers*, 73 :201–211, (2008).

SIEMONSMA, M. A., De Hingh, I. H. J. T., De Man, B. M., Lomme, R. M. L. M., Verhofstad, A. A. J., and Hendriks, T., Doxycycline improves wound strength after intestinal anastomosis in the rat, *Surgery*, 133, 268–276, (2003).

SLOTS J, Rams TE., Antibiotics in periodontal therapy: advantages and disadvantages, *J Clin Periodontal*, 17:479-493, (1990).

SMITH, G.N., Mickler, E.A., Hasty, K.A. and Brandt, K.D., Specificity of inhibition of matrix metalloproteinase activity by doxycycline, *Arthritis and Rheumatism* 42(6): 1140-1146, (1999).

SOLCHAGA, L.A., Goldberg, V.M., Caplan, A.I., Experimental models of cartilage repair. Cartilage regeneration using principles of tissue engineering, *Clinical Orthopaedics*, 391S:161–170, (2001).

THIABAULT, M., Poole, A.R., Buschmann, M.D., Cyclic compression of cartilage/ bone explants in vitro leads to physical weakening, mechanical breakdown of collagen and release of matrix fragments, *J. Orthop. Res.*, 20 :1265-1273, (2002).

WANG, Q., Glasson, S., Raut, U., Emerson, J., Blanchet, T., Bridson, G., Sheldon, R., Mollova, N., Morris, E., Xu, X., and Patel, V.S., In Vitro–In Vivo Correlation on Delivery of Drug Candidates to Articular Cartilage, *Pharmaceutical Research*, Vol. 25:No. 7., (2008).

WESTEDT, U., Wittmar, M., Hellwig, M., Hanefeld, P., Greiner, A., Schaper, A.K., Kissel, T. Paclitaxel releasing films consisting of poly(vinyl alcohol)-graft-poly(lactide-co-glycolide) and their potential as biodegradable stent coatings, *Journal of Controlled Release*, 111: 235–246., (2006).

WILSON, C.G., Palmer, A.W., Zuo, F., Eugui, E., Wilson, S., Mackenzie, R., Sandy, J.D., Levenston, M.E., Selective and non-selective metalloproteinase inhibitors reduce IL-1-induced cartilage degradation and loss of mechanical properties, *Matrix Biology*, 26:259–268,(2007).

YOUNG, A.M., Sze Man Ho, S.M., Drug release from injectable biodegradable polymeric adhesives for bone repair, *Journal of Controlled Release*, 127 :162–172, (2008).

ZALFEN, A.M., Nizet, D., Je'rome, C., Je'rome, R., F. Frankenne, F., J.M. Foidart, J.M., Maquet, V., Lecomte, F., Hubert, P., Evrard, B., Controlled release of drugs from multi-component biomaterials, *Acta Biomaterialia*, 4 :1788–1796,(2008).


TÜBİTAK
PROJE ÖZET BİLGİ FORMU

Proje No: 109T098
Proje Başlığı: Matriks Metalloproteinaz İnhibitörü Etkili İlaç Taşıyan Salım Sisteminin Kıkırdak Hastalıkları Tedavisindeki Etkinliğinin İncelenmesi
Proje Yürütücüsü ve Araştırmacılar: Y. Doç. Dr. Dilek Keskin, Doç. Dr. Ayşen Tezcaner
Projenin Yürütüldüğü Kuruluş ve Adresi: Orta Doğu Teknik Üniversitesi, Mühendislik Bilimleri Bölümü, Ankara
Destekleyen Kuruluş(ların) Adı ve Adresi: TÜBİTAK-TBAG
Projenin Başlangıç ve Bitiş Tarihleri: 01/12/2009-01/08/2011
Öz (en çok 70 kelime) Projede, Polikaprolakton (PCL) mikrokürelere Matriks metalloproteinazları (MMP) engelleyici etkisi olan Doksisisiklinin (D) kondroitin sülfat (CS) ile veya tek başına hapsedilmesi ile kontrollü salım sistemleri hazırlanması ve osteoartritte görülen kıkırdak hasarının tedavisine yönelik yeni bir yaklaşım geliştirilmesi amaçlanmıştır. In situ ve in vitro analizler hazırlanan ilaç salım sistemlerinin eklem içi uygulamalar için uygunluğunu ve biyouyumluluğunu göstermiştir. Mikrokürelere tedaviye yönelik biyoetkinliği, tavşan OA modelinde radyolojik, biyomekanik ve histolojik analizlerle incelenmiş ve OA tedavi potansiyellerinin bulunduğu sonucuna varılmıştır.
Anahtar Kelimeler: PCL, doksisisiklin, kondroitin sülfat, mikroküre, ilaç salımı, osteoartrit
Fikri Ürün Bildirim Formu Sunuldu mu? Evet <input checked="" type="checkbox"/> Gerekli Değil <input type="checkbox"/> Fikri Ürün Bildirim Formu'nun tesliminden sonra 3 ay içerisinde patent başvurusu yapılmalıdır.
Projeden Yapılan Yayınlar: Poster sunumu Ö. Aydın, A. Tezcaner, D. Keskin, Effects of doxycycline delivery from PCL microspheres in a three-dimensional culture, in Pharmaceutical Sciences for the Future of Medicines Symposium. Haziran 2011, Prag, Çek Cumhuriyeti.
Ekte Bulunan "ARDEB Başarı Öyküsü Formu", "Kazanımlar" Bölümünde Belirtilen Kriterlere Göre Proje Çıktılarınızın Başarı Öyküsü Niteliği Taşıdığını Düşünüyorsanız "ARDEB Başarı Öyküsü Formu"nu doldurunuz.

Laboratory of Organic Chemistry, Turku, Finland; ⁴University of Helsinki, Faculty of Pharmacy, Division of Biopharmaceutics and Pharmacokinetics, Turku, Finland

There are a limited number of new drug deliver systems that are intended to be consumed as solids. Inkjet printing technology (IPT) is a promising method in the production of solid medicines with controlled characteristics and high dose precision. The main goal of this study was to demonstrate the use of IPT in formulation of highly potent small molecules and complex molecular compounds (e.g. peptides, proteins). The inkjet printing was done by depositing active pharmaceutical ingredients (APIs) into porous substrates (e.g. paper) in a highly-controlled manner. Screening of suitable excipients and type of formulations was first carried out. Then optimization of inkjet parameter with regards to viscosity, volume of the droplets and surface tension of the applying liquid as well as surface properties of substrate materials was performed. HPLC and ELISA tests were carried out to assay and check the physical and chemical stability of the printed dosage forms. Dissolution testing was done to monitor the release profile of the APIs. It was shown that IPT is an applicable method for preparation of low-dose formulations of poorly water soluble drugs as well as biomolecules that show high content uniformity, acceptable stability and dissolution profiles.

P-91

Study of drug prescription pattern in Aizawl Civil Hospital, Mizoram (India)

Lalduhsanga Pachuau ; Lalrinchhani Vanchhawng ; Tale Paul Jamir

Regional Institute of Paramedical & Nursing Sciences, Department of Pharmacy, Aizawl, Mizoram, India

The present research is conducted to study the prescription pattern of the biggest public health centre in Mizoram. No such study has been conducted earlier to review such prescription. It also aimed to see whether the emphasis given in National health policy of India 2002 like basing treatment on essential drugs of generic in nature and prohibition of use of proprietary drugs was given importance and also whether the drugs prescribed were in generic or not. A cross-sectional study was conducted randomly of around 200 patients records (retrospective data) with around 400 prescriptions admitted to the different medical wards of Aizawl Civil Hospital, Mizoram from August 2009 to February 2010. The study sample consisted of 400 prescriptions that met the inclusion criteria collected from 10 different wards. These prescriptions were for a total of 1599 drugs. Evaluation data suggests a high use of antibiotics as well as injections but not generics. About 60 % of the prescription contains one or more antibiotics, and about 80% of the total prescriptions contain at least one injection. Polypharmacy was evident in a majority of the prescriptions, at all the wards with an average of more than 4.036. Prescriptions of drugs by generic names was nil in all the wards. Prescription of drugs from essential list was more than 60% in all the wards.

P-92

Rheological properties of polymer solutions and their correlation to nanofiber formation by electrospinning

R Rosic ; J Pelipenko ; S Baumgartner ; J Kristl
University of Ljubljana, Faculty of Pharmacy, Department of Pharmaceutical Technology, Ljubljana, Slovenia

Nanofibers are promising candidates for tissue regeneration. Electrospinning has attracted attention as an enabling technology for preparation of nanofibrous analogs of native extracellular matrix. Aim of this study was to investigate and define the correlations of diverse rheological parameters with electrospinnability of polymer solutions and morphology of obtained nanofibers. Therefore, solutions of chitosan, alginate, PVA, PEO alone or in combination were studied using Physica MCR 301 rheometer, then nanofibers were electrospun and evaluated by SEM for morphology. Results

showed that rotational and oscillatory rheological parameters strongly depend on the solution composition and affect the nanofiber morphology. The generation of continuous jet with solutions of natural polymers was unsuccessful at any applied voltage or flow rate due to their high viscosities and complex molecular structure; meanwhile synthetic polymers were easy to electrospin. However, blending of natural with synthetic polymer solutions resulted in reduced viscosity and changed viscoelasticity that greatly improved spinnability and cause drastic morphological changes of obtained nanofibers. Increased fiber diameter and elongation of beads were observed by increasing amount of synthetic polymer in blended solutions. Therefore, rheological parameters are playing essential role in effective nanofiber formation.

P-93

Effects of doxycycline delivery from PCL microspheres in a three-dimensional culture

Ozlem Aydin ; Aysen Tezcaner ; Dilek Keskin
Middle East Technical University, Department of Engineering Sciences, Ankara, Turkey

Polycaprolactone (PCL) is used for implantable or injectable delivery devices for long term treatment owing to slow biodegradation rate and non-acidic degradation products. Doxycycline (DOX), one of the most stable tetracyclines, is a good candidate for slow release formulations. This study aimed to analyze the release of DOX from PCL microspheres for controlling the progression of arthritis. DOX loaded PCL microspheres were prepared by emulsion-solvent evaporation technique. Lower diameter of microspheres has the highest release rate than others. According to in situ release profiles, microspheres having the highest release rate were used for in vitro experiments. In vitro cytotoxicity studies showed that microspheres were biocompatible. Chondrocytes were embedded in agarose to mimic their three-dimensional (3D) native environment. Interleukin-1 (IL1) was used in development of the arthritis model. Proteoglycan and collagen contents of IL1 treated groups vs IL1 untreated ones showed that the arthritis model was established. Activity of cartilage-degrading matrix metalloproteinases (MMPs) was also measured to evaluate the effectiveness of therapy. This in vitro 3D disease model seemed well adapted to investigate the anti-inflammatory effects of doxycycline levels. In vitro evaluation of the effectiveness of the delivery system on arthritis chondrocytes are under study.

P-94

Influences of excipients on properties of immunoglobulin G loaded poly(ϵ -caprolactone) microspheres

O Erdemli ; D Keskin ; A Tezcaner
Middle East Technical University, Engineering Sciences, Ankara, Turkey

Protein instability during microencapsulation has been one of the major drawbacks of biodegradable polymeric protein delivery systems. In this study, human immunoglobulin G loaded poly(ϵ -caprolactone) microspheres were prepared by w/o/w solvent evaporation method and the effects of different excipients (0.5 % w/v poly(vinyl alcohol) (PVA) or 2.5 % w/v glucose in inner aqueous phase) on the microsphere characteristics before and after -sterilization were investigated. Besides, effects of other excipients (starch, heparin, etc.) are also under study. Microspheres prepared by addition glucose showed 29.1 ± 2.9 % encapsulation efficiency and this value was improved to 54.0 ± 2.1 % by using PVA instead of glucose. According to the results of BCA and ELISA assays, when glucose was used, 102.9 ± 0.2 % of the bioactivity of the IgG released from non-irradiated microspheres and 78.9 ± 0.02 % of the bioactivity of the IgG released from γ -irradiated microspheres was protected at 7th day of the release. However; when PVA was used, 51.2 ± 0.09 % bioactivity in the release samples from non-irradiated microspheres and 21.4 ± 0.03 % bioactivity in the release samples from γ -irradiated microspheres were protected.

Pharmaceutical Sciences for the Future of Medicines

**Plenary Sessions
& 4-Parallel Programme Days
& Young Scientists Meeting**

June 13-17, 2011, Prague, Czech Republic - the Place where Pharmaceutical Scientists meet



3rd
PHARMSciFAIR

Initiated and organised by:
The European Federation for Pharmaceutical Sciences (EUFEPS),
several member societies and other proactive
scientific organisations

www.pharmscifair.org