



Proje Başlığı: Kontrollü Antibiyotik Salımı Yapan Kitosan/Silika Bazlı Kompozit Doku İskelelerinin Geliştirilmesi ve Sert Doku Mühendisliği İçin Kullanım Potansiyelinin Araştırılması

Program Kodu: 1001

Proje No: 116M096

Proje Yürütücüsü:

Prof. Dr. Funda TIHMINLIOĞLU

Danışman(lar):

Prof.Dr. Didem LEYLA KOZACI

Prof.Dr. Bekir ERGÜR

Bursiyer(ler):

Dr. Sedef TAMBURACI

Ceren KIMNA

Sibel DEĞER

Ece Zeynep TÜZÜN

MAYIS 2019

ANKARA



Önsöz

Bu proje hücre proliferasyonuna uygun, uzun dönem inflamasyon tedavisi sağlayan kompozit temelli kemik greftlerinin hazırlanması ve bu greftin sert doku onarımına yönelik potansiyelinin incelenmesini hedeflemiştir. Bu amaçla yönelik olarak, POSS katkılı kitosan temelli kompozit doku iskelelerinin geliştirilmesi, karakterize edilmesi ve in vitro kemik-kıkırdak hücre kültürü test aşamaları gerçekleştirilmiştir.

Proje TÜBİTAK 1001 # 116M096 proje desteği ile yürütülmüştür.

İçindekiler

Tablo Listesi	iv
Şekil Listesi	vi
Özet	1
Abstract	3
1. GİRİŞ	5
2. LİTERATÜR ÖZETİ	8
2.1. Kemik Doku Mühendisliği	8
2.2. Post-İmplantasyon Doneminde Kemik Enfeksiyonları	9
2.3. Kontrollü İlaç Salım Sistemleri	10
2.3.1. Kontrollü İlaç Salım Sistemlerinde Kullanılan Kinetik Modeller	12
2.4. Kemik Doku Mühendisliği Uygulamalarında Kitosan Temelli Nanokompozit Malzemeler	13
2.4.1. Kitosan/Kil Nanokompozit Malzemeler	15
2.4.2. Mikroakışkanlaştırıcı Tekniği ile Nanokompozit Malzeme Üretimi	17
2.4.3. Nanosilika Katkılı Kitosan Doku İskeleleri	18
3. MALZEME&YÖNTEM	20
3.1. Malzeme	20
3.2. Antibiyotik Yüklü Kitosan/Kil Nanokürelerin Üretimi	20
3.2.1. Mikroakışkanlaştırıcı parametrelerinin optimizasyonu	20
3.2.2. Reolojik Özellikler	22
3.2.3. Viskozite Ölçümü ve Moleküler Ağırlık Belirlenmesi	22
3.2.4. Elektropüskürtme Parametrelerinin Belirlenmesi	23
3.2.5. Çözünürlük çalışmaları	24
3.2.6. Nanoküre Üretiminde Kullanılan Kitosan/Kil/İlaç Çözeltisinin Hazırlanması	24
3.3. Antibiyotik Yüklü Kitosan/Kil Nanokürelerin Karakterizasyonu	24
3.3.1. Nanokürelerin Morfolojisinin SEM ve DLS Analizleri ile İncelenmesi	25
3.3.2. Zeta Potansiyelinin Ölçülmesi	25
3.3.3. Fourier Transform Infrared Spektroskopisi (FT-IR) Analizi	25
3.3.4. Nanokürelerin Enkapsülasyon Verimi ve <i>In vitro</i> Salım Profilinin İncelenmesi	26
3.3.5. Nanokürelerde Antimikrobiyal Aktivitenin İncelenmesi	26
3.4. Kitosan/POSS Nanokompozit Doku İskelelerinin Üretimi	27
3.4.1. Doku İskelelerinin Üretim Parametrelerinin Optimizasyonu	27
3.5. Doku İskelelerinin Karakterizasyonu	27



TÜBİTAK

3.5.1. Doku iskelelerinin Morfolojilerinin SEM Analizi ile İncelenmesi	27
3.5.2. Doku İskelelerinin Sıvı Değişim Yöntemi ve Bilgisayarlı Mikro Tomografi (Mikro CT) Analizi ile Gözeneklilik Ölçümü.....	28
3.5.3. Doku İskelelerinin Mekanik Özelliklerinin Belirlenmesi	28
3.5.4. Doku İskelelerinin Sıvı Absorpsiyon Kapasitelerinin Belirlenmesi (Şişme Testi)	29
3.5.5. Fourier Transform Infrared Spektroskopi (FT-IR) Analizi	29
3.5.6. Doku İskelelerinin Biyobozunum Davranışının İncelenmesi	29
3.5.7. Biyomineralizasyon Testi	30
3.5.8. Antibiyotik Yüklü Kitosan/Kil Nanoküre Kaplı Doku İskelelerinden <i>In Vitro</i> Salım Profilinin İncelenmesi.....	30
3.5.9. Antibiyotik Yüklü Kitosan/Kil Nanoküre Kaplı Doku İskelelerinin Antimikrobiyal Aktivitelerinin Belirlenmesi	30
3.5.10. Antibiyotik Yüklü Kitosan/Kil Nanoküre Kaplı Doku İskelelerinin Biyobozunumu	31
3.6. <i>In vitro</i> Hücre Kültürü Çalışmaları	31
3.6.1 Hücre kültürasyonu.....	31
3.6.2 <i>In vitro</i> Sitotoksitenin Belirlenmesi.....	31
3.6.3 Saos-2 ve SW1353 Hücrelerinin Doku İskelesi Üzerinde Tutunumu	32
3.6.4 Doku İskelelerinde Saos-2 ve SW1353 Hücrelerinin Proliferasyonu	32
3.6.5 Doku İskelelerinde Saos-2 ve SW 1353 Hücrelerinin Farklılaşma Düzeylerinin İncelenmesi	32
3.6.6 Doku iskelelerinin Histolojik Analizleri.....	33
4.SONUÇLAR	35
4.1 Antibiyotik Yüklü Kitosan/Kil Nanokürelerin Üretimi.....	35
4.1.1 Mikroakışkanlaştırıcı Çalışma Parametrelerinin Optimizasyonu ...	35
4.1.2 Kitosan Çözeltilerinin Reolojik Özelliklerinin Belirlenmesi	35
4.1.3 Kitosan Çözeltilerinin Viskozite Ölçümü ve Moleküler Ağırlıklarının Belirlenmesi.....	37
4.1.4 Nanoküre Üretiminde Kullanılan Elektrosprey Parametrelerinin Belirlenmesi.....	41
4.1.5 Nanokürelere Yüklenen Antibiyotiklerin Çözünürlük Çalışmaları ..	42
4.2. Antibiyotik Yüklü Kitosan/Kil Nanokürelerin Karakterizasyonu	43
4.2.1 Nanoküre Morfolojisinin İncelenmesi	43
4.2.2 Nanokürelerin Zeta Potansiyelinin Ölçülmesi	47
4.2.3 Fourier Transform Infrared Spektroskopi (FT-IR) Analizi	49
4.2.4 Antibiyotik Yüklü Nanokürelerin Enkapsülasyon Verimi ve <i>In Vitro</i> Salım Profili	54



4.2.5 Antibiyotik Yüklü Nanokürelerin Antimikrobiyal Aktivitesi	59
4.3 Kitosan/POSS Nanokompozit Doku İskelelerinin Üretimi	64
4.3.1 Doku İskelelerinin Üretim Parametrelerinin Optimizasyonu	64
4.4 Doku İskelelerinin Karakterizasyonu	70
4.4.1 Morfoloji	70
4.4.2 Toplam Gözeneklilik ve Mikro Yapı	77
4.4.3 Mekanik Özellikler	82
4.4.4 Fiziksel ve Kimyasal Özellikler	83
4.4.5 Kitosan/POSS Doku İskelelerinin ve Antibiyotik Yüklü Nanoküre Kaplı Kitosan/POSS Doku İskelelerinin Biyobozunum Davranışı	86
4.4.6 Kitosan/POSS Doku İskeleleri Yüzeyinde Biyomineralizasyon	87
4.4.7 Nanoküre Kaplı Doku İskelelerinde Antimikrobiyal Aktivitenin Belirlenmesi.....	88
4.4.8 Antibiyotik Yüklü Kitosan/Kil Nanoküre Kaplı Doku İskelelerinden <i>In Vitro</i> Salım Profilinin İncelenmesi	92
4.5 <i>In Vitro</i> Hücre Kültürü Çalışmaları	101
4.5.1 Saos-2 ve SW 1353 Hücrelerinin Kültivasyonu.....	101
4.5.2 Kitosan/kil Nanoküre Kaplı Doku İskelelerinin <i>In vitro</i> Sitotoksitesinin Belirlenmesi.....	101
4.5.3 Saos-2 ve SW 1353 Hücrelerinin Kitosan/kil Nanoküre Kaplı Doku İskelelerinde Tutunumu	103
4.5.4 Saos-2 ve SW 1353 Hücrelerinin Kitosan/kil Nanoküre Kaplı Doku İskelelerinde Proliferasyonu	109
4.5.5 Doku İskelelerinde Saos-2 hücrelerinin farklılaşması: ALP Aktivitesi, Osteokalsin Sekresyonu ve Biyomineralizasyon	110
4.5.6 Doku İskelelerinde SW 1353 hücrelerinin farklılaşması: Hidroksiprolin ve GAG Sekresyonu.....	114
4.5.7 Histoloji Boyamaları	115
REFERANSLAR	121

Tablo Listesi

Tablo 1. İlaç salım profilini etkileyen temel faktörler (Kaynak: Langer ve Chasin, 1990).....	11
Tablo 2. Kontrollü salım sistemlerinde kullanılan kinetik modeller (Kaynak: Paarakh ve ark., 2018).....	12
Tablo 3. Kitosanın fiziksel, kimyasal ve biyolojik özellikleri	13
Tablo 4. Kitosan temelli kemik doku mühendisliğine yönelik biyomalzemeler	14
Tablo 5. Kemik enfeksiyonu tedavisinde kullanılan ilaç taşıyıcı kitosan-temelli sistemler	15
Tablo 6. Nanoküre üretiminde kullanılan mikrofluidizer (mikroakışkanlaştırıcı) çalışma grupları	21
Tablo 7. Doku iskelesi üretiminde kullanılan çalışma grupları	21
Tablo 8. Elektropüskürtme çalışma parametrelerinin belirlenmesinde kullanılan minimum ve maksimum değerler.....	24
Tablo 9. Kitosan çözeltilerinin üstel kural parametreleri ($\tau = K \cdot \eta$)	36
Tablo 10. Yüksek moleküler ağırlıklı kitosan için gerçek viskozite ve moleküler ağırlık değerleri	38
Tablo 11. Düşük moleküler ağırlıklı kitosanın farklı homojenizasyon yöntemleri sonrası gerçek viskozite ve moleküler ağırlık değerleri.....	39
Tablo 12. Düşük moleküler ağırlıklı kitosanın mikrofluidize ile homojenizasyon sonrası gerçek viskozite ve moleküler ağırlık değerleri	39
Tablo 13. Kitosan, kitosan-kil ve ilaç katkılı kitosan-kil gruplarının hidrodinamik çap dağılımı ve polidispersite indeksleri	47
Tablo 14. Kitosan, kitosan-kil ve ilaç katkılı kitosan-kil gruplarının zeta potansiyelleri	49
Tablo 15. Homojenizasyon koşullarının yüksek molekül ağırlıklı kitosanın deasetilasyon derecesi üzerindeki etkisi	51
Tablo 16. Homojenizasyon koşullarının düşük molekül ağırlıklı kitosanın deasetilasyon derecesi üzerindeki etkisi	51
Tablo 17. Grupların karakteristik pikleri.....	52
Tablo 18. Farklı oranlarda gentamisin ve vankomisin yüklü kitosan nanokürelerin enkapsülasyon oranları.....	55
Tablo 19. Vankomisin ve gentamisin yüklü kitosan/montmorillonit nanokompozit kürelerin salım ve korelasyon katsayıları	58
Tablo 20. İlaç yüklü kompozit nanokürelerin Kopcha modeline göre A, B ve korelasyon katsayıları.....	59
Tablo 21. 6 saat, 24 saat ve 25. günde alınan salım sıvılarının E.coli mikroorganizması üzerinde etkisinin karşılaştırılması.....	62
Tablo 22. 6 saat, 24 saat ve 25 günde alınan salım sıvılarının S.aureus mikroorganizması üzerinde etkisi	64
Tablo 23. Farklı konsantrasyonlarda POSS katkılı kitosan doku iskelelerinin mekanik özellikleri	65
Tablo 24. Farklı homojenizasyon teknikleri ile üretilen doku iskelesi grupları.....	69
Tablo 25. Farklı homojenizasyon teknikleri ile üretilmiş kitosan ve kitosan/POSS nanokompozit doku iskelelerinin ortalama gözenek çapı	71
Tablo 26. Farklı homojenizasyon teknikleri kullanılarak hazırlanan kitosan ve kitosan/POSS doku iskelelerinin açık gözeneklilik yüzdeleri	78
Tablo 27. Farklı homojenizasyon teknikleri hazırlanan kitosan doku iskelelerinin Micro CT analizi ile ölçülen gözeneklilik yüzdeleri	80



Tablo 28. Vankomisin ve gentamisin yüklü kitosan/kil nanokompozit küre kaplı kitosan ve kitosan/POSS doku iskelelerinin E. coli mikroorganizması üzerindeki etkisi	89
Tablo 29. Vankomisin ve gentamisin yüklü kitosan/kil nanoküre kaplı kitosan ve kitosan/POSS doku iskelelerinin S. aureus mikroorganizması üzerindeki etkisi	91
Tablo 30. Salım profili incelenen, farklı hacimlerde antibiyotik yüklü kitosan/kil nanoküre kaplanan doku iskelesi grupları.....	93
Tablo 31. Farklı hacimlerde vankomisin içeren kitosan/kil nanoküre ile kaplı doku iskelelerinin Higuchi Salım Katsayıları	95
Tablo 32. Farklı hacimlerde gentamisin içeren kitosan/kil nanoküre kaplı doku iskelelerinin Higuchi Salım Katsayıları.....	100

Şekil Listesi

Şekil 1. Kitosan/MMT Nanobiyokompozit oluşumunun şematik gösterimi	16
Şekil 2. Mikroakışkanlaştırıcının Şematik Gösterimi	18
Şekil 3. Kitosan çözeltilerinin akış (a) ve viskozite (b) eğrileri.	36
Şekil 4. Yüksek moleküler ağırlıklı kitosanın homojenizasyon sonrası konsantrasyona bağlı viskozite değişimi	38
Şekil 5. Düşük moleküler ağırlıklı kitosanın farklı homojenizasyon yöntemleri sonrası konsantrasyona bağlı viskozite değişimi	40
Şekil 6. Düşük moleküler ağırlıklı kitosanın mikrofluidizer ile homojenizasyon sonrası konsantrasyona bağlı viskozite değişimi	40
Şekil 7. Kanül çapının malzeme morfolojisine etkisi: 18G (a) ; 25G (b).....	41
Şekil 8. Nanoküre boyutları için ana etken grafikleri	42
Şekil 9. 20 kV ve 5ml/s çalışma koşulları ile üretilen kürelerde mesafenin boyut dağılımı üzerindeki etkisi: 10 cm (a), 5 cm (b).....	42
Şekil 10. Kürelerin SEM görüntüleri: kitosan(a); kitosan-kil 10000 psi 3 döngü (b); kitosan-kil 10000 psi 5 döngü (c); kitosan-kil 10000 psi 10 döngü (d); kitosan-kil 20000 psi 5 döngü (e); kitosan-kil 20000 psi 10 döngü (f).	44
Şekil 11. Vankomisin yüklü kitosan-kil kompozit nanoküreler, polimer:ilaç oranı 4:1 (a,b); 8:1 (c,d).	44
Şekil 12. Gentamisin yüklü kitosan-kil kompozit nanoküreler, polimer:ilaç oranı 10:1 (a,b); 20:1 (c,d).....	45
Şekil 13. DLS analizinde tarama esnasında parçalanarak aglomere olan kitosan küreler	45
Şekil 14. Gentamisin katkılı kürelerin DLS ile belirlenen hidrodinamik çap dağılımları (a) polimer ilaç 20:1; (b) polimer ilaç 10:1.	46
Şekil 15. Vankomisin katkılı kürelerin DLS ile belirlenen hidrodinamik çap dağılımları (a) polimer ilaç 8:1; (b) polimer ilaç 4:1.	47
Şekil 16. MMT nanokil katkısının değişen pH ortamında yüzey yükünün belirlenmesi	48
Şekil 17. Farklı homojenizasyon koşullarına tabi tutulan kitosan gruplarının FT-IR spektrumu	50
Şekil 18. Deasetilasyon derecelerinin hesaplanmasında kullanılan referans hatları	50
Şekil 19. Kil, kitosan ve kitosan/kil IR spektrumu (CS: kitosan, Clay: MMT nanokil, CS/Clay: kitosan/nanokil kompozit).....	52
Şekil 20. Gentamisin yüklü nanoküre gruplarının FT-IR analizi	53
Şekil 21. Vankomisin yüklü nanoküre gruplarına ait FT-IR grafiği	54
Şekil 22. Vankomisin kalibrasyon grafiği	54
Şekil 23. Gentamisin kalibrasyon grafiği	55
Şekil 24. Kitosan/kil nanokompozit kürelerin vankomisin salım profili.....	56
Şekil 25. Kitosan/kil nanokompozit kürelerin gentamisin salım profili	56
Şekil 26. CS/MMT Nanokürelerin farklı polimer:ilaç oranlarında gentamisin ve vankomisin salım kinetiği modelleri	58
Şekil 27. Küre hazırlanmasında kullanılan ilaç katkılı kitosan/kil çözeltilerinin 24 saat inkübasyon sonunda S.aureus mikroorganizması üzerindeki etkisi. 60	
Şekil 28. Küre hazırlanmasında kullanılan ilaç katkılı kitosan/kil çözeltilerinin 24 saat inkübasyon sonunda E.coli mikroorganizması üzerindeki etkisi.	60
Şekil 29. 6 Saatte toplanan antibiyotik salım sıvılarının E. coli mikroorganizması üzerindeki etkisi	61

Şekil 30. 24. Saatte toplanan antibiyotik salım sıvılarının E. coli mikroorganizması üzerindeki etkisi	61
Şekil 31. 25. Günde toplanan antibiyotik salım sıvılarının E.coli mikroorganizması üzerindeki etkisi	62
Şekil 32. 6. Saatte toplanan antibiyotik salım sıvılarının S.aureus mikroorganizması üzerindeki etkisi	63
Şekil 33. 24. Saatte toplanan antibiyotik salım sıvılarının S.aureus mikroorganizması üzerindeki etkisi	63
Şekil 34. 25. Günde toplanan antibiyotik salım sıvılarının S.aureus mikroorganizması üzerindeki etkisi	64
Şekil 35. Farklı konsantrasyonlarda POSS katkısı içeren kitosan doku iskelelerinin mikro ct analizi ile elde edilen üç boyutlu görüntüleri: kitosan-%5 POSS (a,b) ; kitosan-%20 POSS (c,d).	66
Şekil 36. Farklı konsantrasyonlarda POSS katkılı kitosan doku iskelelerinin 100X, 250X ve 500X büyütmelede SEM görüntüleri: %1POSS (a); %3POSS (b); %5POSS (c); %10POSS	67
Şekil 37. Yüksek oranlarda POSS katkılı kitosan doku iskelelerinin 100X, 250X ve 500X büyütmelede SEM görüntüleri: %20POSS (a); %40POSS (b)	68
Şekil 38. Farklı konsantrasyonlarda POSS katkısının kitosan yüzeyinde pürüzlülüğe etkisini gösteren üç boyutlu yüzey AFM görüntüleri: %1 POSS (a); %3 POSS(b); %5 POSS (c); %10 POSS(d)	68
Şekil 39. AFM analizi ile elde edilen %20 POSS katkılı kitosan yüzeyinin yüzey (a) ve üç boyutlu yüzey (b) görüntüleri.....	69
Şekil 40. Dondurarak kurutma yöntemi ile üretim	70
Şekil 41. Ultrasonik banyo ve ultrasonik homojenizatör ile hazırlanmış kitosan doku iskelelerinin 100X,250X ve 500X büyütmelede SEM görüntüleri: İşlem görmemiş kitosan (a,b,c); ultrasonik banyo (d,e,f); Sonikatör-15Amp. (g,h,i); Sonikatör-35Amp. (j,k,l).....	72
Şekil 42. Mikroakışkanlaştırıcı yöntemi ile homojenize edilmiş kitosan doku iskelelerinin 100X, 250X ve 500X büyütmelede SEM görüntüleri: 5000psi 3döngü (a,b,c); 5000psi 5döngü (d,e,f); 10000psi 3döngü (g,h,i); 10000psi 5döngü (j,k,l).	73
Şekil 43. Ultrasonik banyo ve ultrasonik homojenizatör ile hazırlanmış kitosan/POSS nanokompozit doku iskelelerinin 100X,250X ve 500X büyütmelede SEM görüntüleri: Ultrasonik banyo (a,b,c); Sonikatör-15Amp. (d,e,f); Sonikatör-35Amp. (g,h,i).	74
Şekil 44. Mikroakışkanlaştırıcı yöntemi ile homojenize edilmiş kitosan/POSS nanokompozit doku iskelelerinin 100X, 250X ve 500X büyütmelede SEM görüntüleri: 5000psi 3döngü (a,b,c); 5000psi 5döngü (d,e,f); 10000psi 3döngü (g,h,i); 10000psi 5döngü (j,k,l).....	75
Şekil 45. İlaç yüklü kitosan/kil (MMT) nanoküre kaplı kitosan/POSS doku iskelelerinin farklı büyütmelede SEM görüntüleri: 100X (a); 250X (b); 500X (c); 1000X (d).	76
Şekil 46. Vankomisin yüklü kitosan/MMT nanoküre kaplı doku iskelesi (2ml kaplama).....	76
Şekil 47. Gentamisin yüklü kitosan/kil nanoküre kaplı doku iskelesi (2ml kaplama).....	76
Şekil 48. Vankomisin yüklü kitosan/kil nanoküre kaplı doku iskelesi (5ml kaplama).....	77

Şekil 49. Gentamisin yüklü kitosan/kil nanoküre kaplı doku iskelesi (5ml kaplama).....	77
Şekil 50. Vankomisin yüklü kitosan/kil nanoküre kaplı doku iskelesi (7ml kaplama).....	77
Şekil 51. Gentamisin yüklü kitosan/kil nanoküre kaplı doku iskelesi (7ml kaplama).....	77
Şekil 52. İşlem görmemiş kitosan doku iskelelerinin mikro tomografi analizi ile elde edilen üç boyutlu yapılarının görüntüleri ve kesit alanları	80
Şekil 53. Kitosan doku iskelelerinin mikro tomografi analizi ile elde edilen üç boyutlu yapılarının görüntüleri ve kesit alanları: kitosan ultrasonik banyo (a); sonikasyon-15Amp. (b)	81
Şekil 54. Kitosan doku iskelelerinin mikro tomografi analizi ile elde edilen üç boyutlu yapılarının görüntüleri ve kesit alanları: 10000psi 3döngü (a); 5000psi 3döngü (b); 5000psi 5döngü (c).....	81
Şekil 55. Farklı homojenizasyon teknikleri ile üretilen doku iskelelerinin basma modülü ve mekanik dayanım değerleri: kitosan grupların mekanik özellikleri (a,c); POSS katkılı nanokompozit grupların mekanik özellikleri (b,d).....	83
Şekil 56. Kitosan (a) ve kitosan/POSS nanokompozit (b) doku iskelelerinin 24 ve 48 saat inkübasyon sonrasında şişme oranları.	84
Şekil 57. Okta-TMA POSS nanokafes yapıların FT-IR analizi sonucu elde edilen spesifik pikleri.....	85
Şekil 58. Farklı homojenizasyon teknikleri ile hazırlanan doku iskelelerinin FT-IR analizi.....	85
Şekil 59. Doku iskelelerinin zamana karşı biyobozunum testi	86
Şekil 60. Çift tabakalı doku iskelelerinin zamana karşı biyobozunum testi; a)vankomisin yüklü nanokompozit küre kaplı doku iskelesi, b) gentamisin yüklü nanokompozit küre kaplı doku iskelesi.....	86
Şekil 61. Kitosan ve kitosan/POSS kompozit doku iskeleleri üzerinde 7. ve 21. günlerde gözlemlenen mineralizasyon oluşumu ve XRD pikleri.	88
Şekil 62. Kitosan ve kitosan/POSS kompozit doku iskeleleri üzerinde 10x SBF inkübasyonu ile 14. günde gözlemlenen mineralizasyon oluşumu ve XRD pikleri.	88
Şekil 63. Vankomisin yüklü kitosan/kil nanokompozit küre kaplı doku iskelelerinin E. coli mikroorganizması üzerindeki etkisi	90
Şekil 64. Gentamisin yüklü kitosan/kil nanokompozit küre kaplı doku iskelelerinin E. coli mikroorganizması üzerindeki etkisi	90
Şekil 65. Vankomisin yüklü kitosan/kil nanoküre kaplı doku iskelelerinin S.aureus mikroorganizması üzerindeki etkisi	91
Şekil 66. Gentamisin yüklü kitosan/kil nanoküre kaplı doku iskelelerinin S.aureus mikroorganizması üzerindeki etkisi	92
Şekil 67. Farklı hacimlerde vankomisin içeren kitosan/kil nanokürelerin doku iskelesinden salım profillerinin incelenmesi	95
Şekil 68. Farklı hacimlerde vankomisin içeren kitosan/kil nanokompozit çözeltisi ile kaplanan doku iskelelerinin Higuchi Salım Modeli	96
Şekil 69. Farklı hacimlerde gentamisin içeren kitosan/kil nanoküre kaplı doku iskelelerinin salım profillerinin incelenmesi	98
Şekil 70. Farklı hacimlerde gentamisin içeren kitosan/kil nanoküre kaplı doku iskelelerinin Higuchi Salım Modeli.....	99
Şekil 71. Farklı hacimlerde gentamisin içeren kitosan/kil nanoküre kaplı doku iskelelerinin Zero order Salım Modeli.....	100

Şekil 72. Saos-2 hücrelerinin 2. pasajda inverted ışık mikroskobu görüntüsü	101
Şekil 73. SW 1353 hücrelerinin 2. pasajda inverted ışık mikroskobu görüntüsü.....	101
Şekil 74. In vitro sitotoksisite testlerinde Saos-2 hücreleri ile elde edilen % canlılık sonuçları: Vankomisin yüklü kitosan/MMT nanoküre kaplı doku iskeleleri (a); gentamisin yüklü kitosan/MMT nanoküre kaplı doku iskeleleri (b)	102
Şekil 75. In vitro sitotoksisite testlerinde SW 1353 hücreleri ile elde edilen % canlılık sonuçları: Vankomisin yüklü kitosan/MMT nanoküre kaplı doku iskeleleri (a); gentamisin yüklü kitosan/MMT nanoküre kaplı doku iskeleleri (b).....	103
Şekil 76. Vankomisin yüklü nanoküre kaplı doku iskelelerinde Saos-2 hücrelerinin 7 gün sonunda tutunumu ve yayılması	104
Şekil 77. Gentamisin yüklü nanoküre kaplı doku iskelelerinde Saos-2 hücrelerinin 7.gün sonunda tutunumu ve yayılması	105
Şekil 78. Vankomisin yüklü nanoküre kaplı Kitosan-%20POSS doku iskelelerinde Saos-2 hücrelerinin 7. gün sonunda farklı büyütmede (5x, 10x ve 20x) floresans mikroskop görüntüleri.....	105
Şekil 79. Gentamisin yüklü nanoküre kaplı Kitosan-%20POSS doku iskelelerinde Saos-2 hücrelerinin 7.gün sonunda farklı büyütmede (5x,10x, ve 20x) floresans mikroskop görüntüleri	106
Şekil 80. Vankomisin yüklü nanoküre kaplı doku iskelelerinde SW 1353 hücrelerinin 7 gün sonunda tutunumu ve yayılması	107
Şekil 81. Gentamisin yüklü nanoküre kaplı doku iskelelerinde SW 1353 hücrelerinin 7 gün sonunda tutunumu ve yayılması	107
Şekil 82. Vankomisin yüklü nanoküre kaplı Kitosan/%20POSS doku iskelelerinde SW 1353 hücrelerinin 7. gün sonunda farklı büyütmede (10x ve 20x) floresans mikroskop görüntüleri	108
Şekil 83. Gentamisin yüklü nanoküre kaplı Kitosan-%20POSS doku iskelelerinde Saos-2 hücrelerinin 7. gün sonunda farklı büyütmede (10x ve 20x) floresans mikroskop görüntüleri	108
Şekil 84. Vankomisin (a) ve Gentamisin (b) yüklü kitosan/kil nanoküre kaplı doku iskelelerinde kültive edilen Saos-2 hücrelerinin proliferasyonu	109
Şekil 85. Vankomisin (a) ve Gentamisin (b) yüklü kitosan/kil nanoküre kaplı doku iskelelerinde kültive edilen SW 1353 hücrelerinin proliferasyonu.....	110
Şekil 86. Vankomisin (a) ve Gentamisin (b) yüklü kitosan/kil nanoküre kaplı doku iskelelerinde kültive edilen Saos-2 hücrelerinin ALP aktiviteleri.....	111
Şekil 87. Vankomisin (a) ve Gentamisin (b) yüklü kitosan/kil nanoküre kaplı doku iskelelerinde kültive edilen Saos-2 hücrelerinin osteokalsin sekresyonu	112
Şekil 88. Vankomisin (a) ve Gentamisin (b) yüklü kitosan/kil nanoküre kaplı doku iskelelerinde kültive edilen Saos-2 hücrelerinin biyomineralizasyonu: ARS boyama sonrasında görüntülenmiş doku iskeleleri	113
Şekil 89. Vankomisin (a) ve Gentamisin (b) yüklü kitosan/kil nanoküre kaplı doku iskelelerinde kültive edilen Saos-2 hücrelerinin biyomineralizasyonu: ARS boyama sonrasında görüntülenmiş doku iskeleleri	113
Şekil 90. Doku iskelelerindeki kalsiyum birikiminin ARS ekstraksiyon yöntemi ile semi-kantitatif ölçümü: Vankomisin yüklü nanoküre kaplı doku iskeleleri (a), Gentamisin yüklü nanoküre kaplı doku iskeleleri (b).....	113



Şekil 91. Vankomisin ve Gentamisin Yüklü Nanoküre Kaplı Doku İskeleleri üzerinde İnkübe Edilmiş SW1353 Hücrelerinin Hidroksiprolin Sekresyonu	115
Şekil 92. Vankomisin ve Gentamisin Yüklü Nanoküre Kaplı Doku İskeleleri üzerinde İnkübe Edilmiş SW1353 Hücrelerinin GAG Sekresyonu.....	115
Şekil 93. Vankomisin yüklü nanoküre kaplı doku iskelelerinde inkübe edilen Saos-2 hücrelerinin histolojik analizleri.....	117
Şekil 94. Gentamisin yüklü nanoküre kaplı doku iskelelerinde inkübe edilen Saos-2 hücrelerinin histolojik analizleri.....	117
Şekil 95. Vankomisin yüklü nanoküre kaplı doku iskelelerinde inkübe edilen SW 1353 hücrelerinin histolojik analizleri.....	118
Şekil 96. Gentamisin yüklü nanoküre kaplı doku iskelelerinde inkübe edilen SW 1353 hücrelerinin histolojik analizleri.....	118

Özet

Son yıllarda yaşanan dünya nüfusu ve kazalara bağlı kas-iskelet sistemi hastalık ve yaralanmalarında önemli derecede artış gözlenmektedir. Malzeme bilimindeki gelişmeler ile vücutta kemik doku ile uyumlu, polimerik yapıda sentetik greftlerin kullanımına ilgi artmıştır. Bu malzemeler, ikincil operasyonlara gerek kalmadan, immun reaksiyon geliştirmeyen canlı ve fonksiyonel yapay kemik dokusu geliştirilmesini, kemik onarımını gerektiren durumlarda, kemik iyileşmesini hızlandıracak ve desteklemek üzere kullanılmaktadır. Elde edilen biyomalzemenin mekanik gücünün hedef bölgeye uygun olması, kemik iyileşme sürecinde yapısal bütünlüğü koruması ve osteokondüktif özellikte olması gerekmektedir. Bu özelliklere sahip doku iskelelerinin eldesinde kullanılan biyobozunur ve biyoyumlu yapıda doğal ve sentetik polimerler arasından kitosan porozlu yapısı, jel oluşturma özellikleri, kimyasal modifikasyonlarının kolay olması, antibakteriyel özellikleri ve in vivo makromoleküllere yüksek affinite göstermesi nedeniyle özellikle dikkat çekmektedir. Son dönemde, kemik greftleri olarak birçok polimer mikro ve nanokompozit sistemler üzerine çalışılmaktadır. Silika nanopartiküller, yapıda modulus ve mukavemette önemli ölçüde iyileşme sağlamakta ve mineralizasyonu tetikleyerek kemik doku rejenerasyonunu desteklemektedir. Bu nedenle, proje kapsamında geliştirilecek biyomalzemedeki kemik oluşumunu indükleyebilecek, hibrid nanokafes yapısı ile fonksiyonel özellikler kazandırılacak polihedral oligomerik silseskioksan (POSS) nanosilika parçacıklar kullanılmıştır.

Önerilen projede; POSS katkılı kitosan temelli kompozit doku iskelelerinin geliştirilmesi ve sert doku mühendisliğine yönelik olarak potansiyelinin araştırılması hedeflenmiştir. Projede geliştirilen kemik doku oluşumunu tetikleyen, gözenekli biyobozunur kompozit doku iskelesi; istenilen mekanik ve yapısal özellikleri sağlamanın yanısıra, hedef bölgede uzun dönemde antibiyotik salımı gerçekleştiren ve enfeksiyonu engelleyen özelliği ile fonksiyonel özellik kazandırılmış bir biyomalzemedir. Bu amaçla, kemik enfeksiyonlarında yaygın olarak ağız yolu ile kullanılan antibiyotiklerden olan gentamisin ve vankomisin seçilmiş ve mikrofluidizer yöntemi ile monodisperse yapıda antibiyotik yüklenmiş uniform kitosan nanokürelerin elde edilmesi, bu mikro/nanokürelerin kitosan/POSS kompozit doku iskelesine püskürtme yöntemi ile başarılı bir şekilde kaplanarak entegre edilmesi, nihai üründe ilaç salınımı ve *in vitro* hücre kültür çalışmaları projede gerçekleştirilmiştir. Nanoküre ve doku iskelesi üretiminde kullanılan kitosan/kil ve kitosan/POSS çözeltilerinin homojenizasyonu mikrofluidizer sistemi ile optimize edilmiş, elde edilen yapıların karakterizasyon çalışmaları sonucunda kil katkısının nanokürelerin stabilite ve in vitro



salım profilini olumlu yönde etkilediği, POSS nanopartiküllerin de doku iskelesinin mekanik dayanım, şişme özellikleri ve biyomineralizasyon kapasitesini arttırdığı görülmüştür. Nanoküre kaplı doku iskelelerinden uzun dönemde kontrollü antibiyotik salımı gerçekleştirilmiş; antimikrobiyal aktiviteleri ise disk difüzyon yöntemi ile belirlenmiştir. *In vitro* çalışmalarda antibiyotik yüklü nanoküre kaplı doku iskelelerinde istenen hücre tutunumu, proliferasyonu ve farklılaşması sağlanmıştır. Kemik-kıkırdak hücre farklılaşması özel işaretleyicilerle belirlenmiştir. Doku iskelelerinde kemik hücrelerinin üreme ve biyoaktivitesinde artış gözlenirken, kıkırdak hücrelerinde sınırlı büyüme ve metabolik aktivite gözlenmiştir. Bunun yanısıra, vankomisin salımı yapan doku iskelelerinde gentamisinli gruplara kıyasla, kemik hücrelerinin daha yüksek aktivite gösterdiği görülmüştür.

Anahtar Kelimeler: Doku mühendisliği, polimer, silika, kompozit, antibiyotik salımı, kemik rejenerasyonu, kıkırdak

Abstract

In recent years, there is a significant increase in aging of World population and muscle-skeleton system diseases and injuries related with accidents. Recently there has been an interest on the use of synthetic grafts composed of polymers with the developments on material science. These materials have been used to support and accelerate bone healing when bone repair needed, to develop non-immunogenic, living and functional artificial bone tissue without any need for secondary surgery.

It is required that biomaterial for bone TE is suitable for target site, maintenance the structural integrity during the healing process and osteoconductive effect. Among several scaffolds which have these properties, chitosan takes attention due to its porous structure, gel forming property, easily handling and antibacterial property. Recently, several micro and nanocomposite polymer systems as bone grafts have been studied. Silica nanoparticles improve modulus and strength and promotes bone tissue regeneration by inducing biomineralization. Thus, in this project, polyhedral oligomeric silsesquioxanes (POSS) nanocages were used to promote osteogenesis and gain functional properties due to its hybrid structure.

In this proposed project, development of chitosan based POSS reinforced composite scaffolds and investigation of the potential of these composites for hard tissue engineering is aimed. In this study, porous biodegradable composite scaffold which induce osteogenesis, provides controlled antibiotic release and prevent infection at target site as well as providing desired mechanical and structural property, was developed. For this purpose, gentamycin and vancomycin which are orally administrated for bone infection were loaded to obtain uniform chitosan nanospheres by microfluidics method. Chitosan/MMT and chitosan/POSS solutions used in fabrication were homogenized with microfluidization technique. The results obtained from characterization tests showed that MMT incorporation provided positive effects as stabilizing nanosphere structure and in vitro release profile and POSS incorporation improved mechanical properties and biomineralization of the scaffold. Nanosphere coated scaffolds provided controlled release profile in long term incubation and antimicrobial activity tests were performed with disc diffusion method.

In vitro studies showed that optimum cell attachment, proliferation and differentiation were achieved with nanosphere coated scaffolds. Bone and cartilage cell differentiation were investigated with specific markers. It was observed that scaffolds induced bone cell proliferation and differentiation whereas, limited proliferation and bioactivity was observed with cartilage cells. In addition, higher bone cell bioactivity was observed with vancomycin releasing scaffolds compared to gentamicin loaded groups.



Keywords: tissue engineering, silica, polymer, composites, antibiotic delivery, bone and cartilage

1.GİRİŞ

Son yıllarda yaslanan dünya nüfusuna ve hareketsizliğe bağlı olarak gelişen kas-iskelet sistemi hastalıklarında gözlenen artış, kemik greftlerine duyulan ihtiyacı arttırmaktadır. Günümüzde kemik doku mühendisliği uygulamaları, iyileşme sürecine destek olabilen, aynı zamanda da doku rejenerasyonunu arttıran akıllı malzemelerin geliştirilmesine olanak sağlamaktadır. Bu malzemeler, ikincil operasyonlara gerek kalmadan, immün reaksiyon geliştirmeyen, fonksiyonel yapay kemik dokusu geliştirilmesini sağlamak; kemik onarımını gerektiren durumlarda ise iyileşmeyi hızlandırmak ve desteklemek üzere kullanılmaktadır. Malzeme tasarımlarındaki gelişmelere rağmen, post-implantasyon döneminde yaşanan inflamasyon sorunu, insan sağlığını tehdit eden ciddi bir problem olarak karşımıza çıkmaktadır. Klinik çalışmalarda olası inflamasyon problemlerinin üstesinden gelebilmek için genellikle hastalara antibiyotik tedavisi uygulanmaktadır. Geleneksel tedavi yöntemlerinde implantasyon sonrası defekt bölgede lokal depo antibiyotik uygulamaları veya oral yolla düzenli kullanılan tabletler tercih edilmektedir. Oral yolla alınan antibiyotikler, ilacın hasarlı bölgede etkin miktarda iletimini kısıtlamaktadır. Aynı zamanda depo antibiyotik tedavisi, özellikle yüksek dozda uygulandığında, ototoksisite ve nefrotoksisite gibi ciddi yan etkilere yol açmaktadır. Bu nedenle, kemik implantasyonlarında geleneksel yöntemlerin dezavantajlarını giderecek, bölgede lokal olarak kontrollü ilaç salımı yapabilecek akıllı malzemelere ihtiyaç duyulmaktadır.

Bölgeye özgü ilaç salım sistemleri etkili bir salım sağlayarak yüksek dozajdan dolayı oluşabilecek yan etkileri engelleyebilmektedir. Bu nedenle, kontrollü ilaç salımında kullanılacak taşıyıcı malzemenin dikkatlice seçilmesi gerekmektedir. Taşıyıcı malzeme vücutta toksik etki göstermemeli, etken maddeyi salım süresince korumalı ve kontrollü salım profiline yardımcı olmalıdır. Bu nedenle, biyopolimer bazlı malzemeler ilaç salım çalışmalarında biyouyumluk, biyobozunurluk ve işlenebilirlik kolaylığı nedeniyle ön plana çıkmaktadır. Biyopolimer yapıları malzemeler, farklı morfolojilerde işlenerek ilacın terapi süresince istenilen bölgede kontrollü salımını sağlayabilir, sonrasında vücutta toksik etki göstermeyen monomerlere dönüşebilirler. Kolajen, albümin, jelatin, aljinat, kitosan, siklodekstrinler ilaç dağıtımında en çok kullanılan doğal polimerlerdir (Pillai ve Panchagnula, 2001).

Kitosan, çeşitli özellikleri nedeniyle ilaç salım sistemlerinde yaygın olarak kullanılan doğal bir aminoglikozidik polimerdir. Porlu yapısı, jel oluşturabilme özelliği,

kimyasal modifikasyona uygun olması, anti bakteriyel özellikleri ve makro molekülere yüksek affinite göstermesi nedeniyle, kemik doku iskelesi uygulamalarında özellikle dikkat çekmektedir. Aynı zamanda, pozitif yüklü aktif amino grupları, anyonik etken maddeleri taşımak için ideal reaktif alanlar sağlar. Literatürde kitosan bazlı taşıyıcı sistemler hidrojel, partikül ya da film formlarında lokal antibiyotik salım sistemleri olarak umut verici sonuçlar göstermiştir (Patel ve Amiji, 1996; Anal ve Stevens, 2005; Noel ve ark., 2008). Çeşitli avantajlarının yanı sıra, kitosan biyopolimer hızlı bir bozulma profili ve yüksek şişme derecesi gösterir. Bu nedenle kitosan bazlı materyaller, uzun dönemde kontrollü bir ilaç salım sistemi tasarlamak için, stabiliteyi arttıracak şekilde modifiye edilmelidir. Bu dezavantajların üstesinden gelmek için, anyonik yapılar polimer matrisinde polielektrolit alanlar sağlayacak ve yapıyı güçlendirecek şekilde değerlendirilebilir.

Kitosanin kemik greft malzemesi olarak yaygın olarak tercih edilmesine rağmen, mekanik ve biyobozunum özellikleri bakımından geliştirilmesine ihtiyaç duymaktadır. Silika nanopartiküller, yapıda basma modülü ve mukavemette önemli ölçüde iyileşme sağlayarak sentetik ve doğal polimerlerin mekanik özelliklerini arttırmaktadır. Bunun yanı sıra silika katkısı kemik doku rejenerasyonunu desteklemektedir. Silika yapıdaki polihedral oligomerik silseskioksan (POSS) nanosilika parçacıkların polimer kompozit sistemlerinde kullanımı giderek artan öneme sahiptir. POSS molekülleri olası en küçük silika partiküllerinin analogları olarak görülmekte, ana iskelet nanoyapının dışında bulunan reaktif ve reaktif olmayan organik fonksiyonel gruplar biyolojik dokularla ve polimerlerle uyumluluğu arttırmakta, yapının modifiye edilmesi ile özelliklerin istenildiği gibi ayarlanmasını sağlamaktadır. POSS katkılı polimer kompozit çalışmalarında; geliştirilmiş biyouyumluk ve fizikokimyasal özellikleri sayesinde POSS içeren polimer kompozitlerin biyomedikal uygulamalara yönelik olarak kardiyovasküler implant malzemesi (POSS-PCU(polikarbonat-uretan) (Kannan ve ark., 2006; Motwani ve ark., 2011), dental uygulamalarda dolgu malzemesi (Acrylic polymer-POSS (Dodiuk-Kenig ve ark. 2006), ve yumuşak doku mühendisliği uygulamalarında biyomalzeme olarak (karaciğer, bağırsak ve karaciğer) (Gupta ve ark. 2007) potansiyel vadettiği gözlenmiştir.

Günümüzde nano dolgu katkılı kompozit malzemeler, saf polimerik malzemelerle karşılaştırıldığında üstün özellikler göstermeleri nedeniyle birçok alanda tercih edilmektedir. Polimer-kil nanokompozitler, organik polimer matrisinin ve nano ölçekli organofilik kil dolgu maddelerinin sinerjik etkisinden oluşan hibrit malzemelerdir. Son dönemde yapılan çalışmalar, kitosan/kil nanokompozit malzemelerin anyonik/katyonik ilaçların kontrollü salımını sağlayan ideal bir sistem olduğunu göstermektedir (Depan ve ark., 2009; Yuan ve ark., 2010). Montmorillonit (MMT),



kompozit sistemlerde en sık kullanılan nano dolgu maddelerinden biridir. Smektit grubu killerden olan MMT, katmanlı yapısı nedeni ile taşıyıcı polimer matrisi içinde dağılarak ilacın difüzyon hızını azaltır, böylece ilaç taşıyıcı sistemlerin en önemli problemi olan hızlı salımı önleyebilir.

Projenin genel amacı, hücre proliferasyonuna uygun, uzun dönem inflamasyon tedavisi sağlayan kemik greftlerinin hazırlanması ve bu greftin sert doku onarımına yönelik potansiyelinin incelenmesidir. Bu nedenle, projenin ilk basamağında kemik enfeksiyonlarında yaygın olarak kullanılan gentamisin ve vankomisin antibiyotikleri, kitosan/montmorillonit kompozit matrisinde disperse edilerek elektrospreyleme yöntemiyle enkapsüle edilmiş, yapılan ayrıntılı karakterizasyon testleri sonrasında kitosan/polihedral oligomerik silseskioksan (POSS) tabanlı kompozit kemik greftleri üzerine entegre edilmiştir.

Projenin ön çalışmalarında, elektrosprey işlem değişkenleri küresel, homojen bir şekilde dağılmış nanopartiküller elde etmek için optimize edilmiştir. Ayrıca, homojenizasyon parametreleri, kitosanın molekül ağırlığı, deasetilasyon derecesi ve reolojik özellikleri dikkate alınarak değerlendirilmiştir. Optimum parametrelerde hazırlanan Kitosan / kil nanokompozit küreleri, morfolojileri, boyut dağılımları, yüzey yükleri, kimyasal etkileşimleri ve ilaç enkapsülasyon verimi açısından incelenmiş, sonrasında *in vitro* ilaç salım profilleri kinetik modeller ile değerlendirilmiştir. İlaç yüklü kompozit nanokürelerin *E. coli* ve *S. aureus* bakterilerine karşı antimikrobiyal aktiviteleri belirlenmiştir. Son olarak, *in vitro* sitotoksitesite analizi, NIH / 3T3 fibroblast ve SaOS-2 kemik osteosarkom hücre hatlarında yapılmıştır.

Projenin ikinci basamağında POSS katkılı kitosan temelli kompozit doku iskelelerinin sert doku mühendisliğine yönelik olarak potansiyeli araştırılmıştır. İlaç yüklü CS/MMT nanoküreler doku iskeleleri üzerine elektrospreyleme yöntemi ile püskürtülerek immobilize edilmiş, çok katmanlı kontrollü antibiyotik salımı yapan ve kemik doku rejenerasyonunu tetikleyen bir doku iskelesi üretilmiştir. Üretilen çok katmanlı doku iskeleleri fiziksel, mekanik ve kimyasal olarak karakterize edilmiş ve *in vitro* ortamda kemik, kırık model hücreler kullanılarak biyoaktiviteleri incelenmiştir.

2. LİTERATÜR ÖZETİ

2.1. Kemik Doku Mühendisliği

Kemik dokusu, organizmadaki herhangi bir hasar sonucu kendini yenileyebilme kapasitesi yüksek bir dokudur. Buna rağmen, özellikle yaşlılık evresinde kemik rejenerasyonundaki azalma ile birlikte, kemik defektleri için cerrahi işlemler gereklidir. Osteoporoz (kemik kütlesinin azalması), osteoartrit, osteomalazi (kemik mineralizasyon defektleri) ve skolyoz, genellikle cerrahi müdahale gerektiren temel kas-iskelet problemlerindedir. Ayrıca, nüfusun yaşlanmasına ve fiziksel aktivitede azalmaya göre kemik bozukluklarında artış gözlemlenmekte ve yaşam kalitesi düşmektedir.

Otograft, allograft ve ksenograft kemik greftlerinde kullanılan üç ana yaklaşımdır. Rekonstrüktif cerrahinin altın standardı olarak adlandırılan otolog greft, dokuyu vücudun başka bir bölgesinden kusurlu bölgeyi doldurmak için aşılır. Bu operasyonlar genel olarak immünolojik komplikasyonlarla sonuçlanmaz, ancak ek cerrahi ihtiyacı veya yetersiz kaynak gibi çeşitli dezavantajlar içerir (Wagh, 2004). Allograft, aynı türün farklı üyeleri arasındaki aşılama değildir. Bu teknikte genel olarak kadavra kemikleri kullanılmaktadır. Allograftlar bulaşıcı hastalıklar ve immünojenik olma riskini beraberinde getirir. Ksenograft, farklı türlerin üyeleri arasında doku aşılama yöntemidir. Bununla birlikte, donör bölgesi ağrısı riski, ek bir operasyon ihtiyacı ve sınırlı donör gibi ana dezavantajları vardır.

Kritik büyüklükteki defektlerde, osteoblast farklılaşmasını teşvik etmek (osteoinduktif), kemik büyümesini teşvik etmek (osteokondüktif) ve kemik dokusuna entegrasyonuna izin vermek (osseointegrasyon) için doku mühendisliği yaklaşımları tercih edilir (Stevens, 2008). Tasarlanan kemik greftleri; kemiğin fiziksel, kimyasal ve biyolojik gereksinimleri karşılayabilecek şekilde karakterize edilmelidir. Kemik doku mühendisliğinde kullanılacak doku iskeleleri, aşağıdaki temel şartları sağlamalıdır:

Biyouyumluluk: Kemik iskelesi ve bozunma yan ürünleri herhangi bir toksik etkiye neden olmadan biyolojik aktiviteyi desteklemelidir. Çevreleyen dokuya ve vücut sıvısına uygun olmalı, böylelikle immün yanıt, doku reddi veya iltihaplanmaya neden olmamalıdır.

Biyobozunma: İskele bozulma oranı, mümkün olduğu kadar yeni doku oluşum hızı ile aynı olmalıdır. Hücreler kendi doğal matrislerini üretirken, iskele vücutta yapısal bütünlüğü sağlayabilmeli ve yer alacak yeni oluşturulmuş dokuya yer sağlayarak parçalanabilmelidir (Arca ve Şenel, 2008).



Uygun tasarım: İskele yüzeyi, birbirine bağlı gözenekler ile etrafındaki dokudan hücre transferine izin vermelidir. Doku iskelesi, oksijen ve besin difüzyonuna izin verecek ölçüde geniş gozenekliliğe sahip olmalıdır. Aynı zamanda, kemik dokusunun doğal yapısını taklit edecek mekanik dayanıma sahip olmalıdır. Çalışmalar, doku iskelelerinin besin ve oksijen difüzyonu için minimum 100 mm gözenek boyutuna sahip olması gerekmektedir (Hulbert ve ark., 1970). Ayrıca, 200-350 µm gözenek büyüklüğü aralığının kemik doku mühendisliğinde hücre proliferasyonu için optimum olduğu bilinmektedir (Murphy ve ark., 2010).

Mekanik özellikler: Kemik doku iskelesi, rejenerasyon sırasında geçici mekanik destek ve entegrasyona yardım etmelidir. Mekanik gereksinimler sağlıklı kemiğin fiziksel talebini karşılayacak şekilde defekt bölgeye göre değişim göstermektedir.

2.2. Post-İmplantasyon Doneminde Kemik Enfeksiyonları

Enfeksiyon, konak doku ve mikroorganizmalar arası homeostatik dengesizlik olarak tanımlanabilir. Kemik dokusu için 105 organizma/dokuyu aşan mikroorganizma konsantrasyonu veya beta-hemolitik streptokokların varlığı enfeksiyon sorunu olarak bildirilmiştir (Sussman ve Bates-Jensen, 2012).

Post-implantasyon döneminde lokal bakteri adezyonu, tedavi edilmediği durumda implant üzerinde biyofilm oluşumu ile sonuçlanabilecek ciddi bir problemdir. Literatürde, toplam kalça ve eklem implantasyon operasyonlarının %5'inde enfeksiyon problemi bildirilmiştir (Albuharian ve ark., 2008). Enfeksiyon, implante edilen biyomalzemenin uyumluluğunu engelleyerek doku entegrasyonunu azaltır. Uzun dönem enfeksiyon tedavisi için implantasyon sonrası ilk 6 saat hayati önem taşımaktadır. Bakteriler kemiğe hematojen yoldan erişebilir, harici bir kaynaktan veya yumuşak doku enfeksiyonundan yayılabilir ve bu da trabeküler kemiğin nekrozuna neden olacak kadar ciddi sonuçlara yol açabilir (Hogan et al., 2013). Bu gibi durumları önlemek amacıyla, olası kemik enfeksiyonu problemlerinin üstesinden gelmek için post-implantasyon döneminde antibiyotik tedavisi uygulanmaktadır. Enfekte veya nekrotik doku vücuttan alınsa bile, enfeksiyonun yayılmasını önleme için antibiyotik tedavisi gereklidir. Çalışmalar, kan damarlarının rekonstrüksiyonunun 4 hafta sürmesi nedeniyle en az 4-6 hafta antibiyotik tedavisinin gerekli olduğunu iddia etmektedir (Mader ve Adams, 1989; Salvati ve ark. 2003). Post-implantasyon donemi antibiyotik tedavisi genelde oral veya lokal olarak uygulanmaktadır. Oral uygulamalarda; etken maddenin defekt bölgeye iletimi kontrollü olarak sağlanmamaktadır, Ayrıca, tedavi hasta tarafından kontrol edildiği için doz aşımı, ilaç etkileşimi veya tedavinin yarıda bırakılması gibi sorunları da beraberinde getirir. Lokal antibiyotik uygulamaları, antimikrobiyal ajanların uzun süreli elüsyonu nedeniyle tedavi süresini kısaltabilir.



Fakat kısa yarı-ömürlü ilaçlar ile plazmadaki terapötik ilaç konsantrasyonunu uzun dönemde stabil tutmak oldukça zordur. Bu nedenle, antimikrobiyal ajanı uzun süre defekt bölgede tutarak kontrollü bir şekilde salımını gerçekleştirecek lokal uygulamalara ihtiyaç duyulmaktadır.

2.3. Kontrollü İlaç Salım Sistemleri

İlaç vucut içinde absorpsiyon, dağılım veya emilim gibi çeşitli yollar ile farmakolojik olarak etken hale gelebilir. Etken maddenin defekt bölgede istenilen konsantrasyonlarda iletimi ve tedavi boyunca terapötik etki göstermesini sağlayacak şekilde salınması "kontrollü ilaç salım sistemi" olarak adlandırılmaktadır. Kontrollü ilaç salım sistemlerinin temel amacı, tedavi süresi boyunca ilacın toksik olmayacak, aynı zamanda da etkili konsantrasyonlarda tutulacak seviyede sağlanmasıdır. İlaç salım sistemlerinin vücuttaki kimyasal ve biyolojik süreçlerle uyumlu olması gerekmektedir.

Geleneksel ilaç salım sistemlerinde, ilaç konsantrasyonu terapötik seviyede tutulmak istendiği için çoklu dozaj olarak kullanılmaktadır, böylece dalgalı bir konsantrasyon profili elde edilir. Enjekte edilen ilaç, kısa bir sürede tamamen çözünerek hızlı salım (burst release) profili gösterir. Bununla birlikte, kontrollü ilaç salım sistemleri, toksisiteyi azaltarak ve biyoyararlanımı artırarak, uzun süreli salınımıyla birlikte plazma veya lokal konsantrasyonlarda sabit ilaç konsantrasyonları sağlayabilir. Ek olarak; daha iyi hasta uyumu, azaltılmış yan etkiler ve ilaç kullanım maliyetlerini en aza indirirken hücre içi penetrasyonun iyileştirilmesine neden olur (Kumari ve ark., 2010). Geleneksel dağıtım yöntemlerinde görülen düşük ilaç çözünürlüğü, yüksek dozaja bağlı toksisite ve zayıf biyoyararlanımdan kaynaklanan engeller, ancak yüksek terapötik etkiye sahip uygun şekilde kontrol edilen bir ilaç dağıtım sistemi tasarlanılarak çözülebilir.

Gentamisin, vankomisin, amikasin ve tobramisin, kemik iltihabına karşı klinik uygulamalarda tercih edilen antibiyotiklerdendir. Fakat, nefrotoksisite, norotoksisite, isitsel ve vestibuler ototoksisite gibi yan etkiler dolayısıyla kullanımları sınırlıdır (Song ve ark., 1998; Hidayat ve ark., 2006). Bu nedenle, implantasyon sonrası bölgesel kontrollü dağıtım sistemi, hastanın postoperatif dönemde tedavi kalitesini arttırabilir. Aktif maddenin salım profilini etkileyen ana faktörler, taşıyıcının, aktif ajanın ve çevresel koşulların özellikleri olarak sınıflandırılabilir. Bu özelliklerin sinerjik etkisi, çeşitli salım profillerine neden olabilir. Serbest bırakma profilini etkileyen ana faktörler Tablo 1'de belirtildiği gibi sıralanabilir. Malzeme yapısı, aktif maddenin salım profilini belirleyen temel özelliklerdendir. Taşıyıcı malzeme matrisinin moleküler ağırlığı, viskozitesi, polaritesi, çözünürlüğü ve termal özellikleri, salım mekanizmasını önemli

derecede etkiler. Literatürde, yüksek moleküler ağırlıklı polimerlerin ilaçların salım hızını yavaşlattığı belirtilmektedir (Zambaux ve ark., 1999). İlaç taşıyıcı olarak seçilen malzeme ve bu malzemenin bozunum yan ürünleri salım ortamı ve aktif madde ile uyumlu olmalıdır. Terapötik dönemde salım ortamındaki parçalanmaya karşı direnç gösterirken ilacı başarılı bir şekilde enkapsüle etmelidir. Yüzey yükü ve taşıyıcının hidrofobikliği, hedef bölgenin özelliklerine bağlı kriterlerdir. Ayrıca, morfoloji ve boyut da salım kinetiği üzerinde önem taşımaktadır.

İlaç salım profili, ayrıca ilaç özelliklerine ve ilaç-taşıyıcı madde arasındaki etkileşimlere bağlı olarak değişkenlik göstermektedir. İlacın fizikokimyasal özellikleri, farmakokinetiği ve farmakodinamik özellikleri, ilaç dağıtımının etkinliğini gösterir. Özellikle, ilaç taşıyıcı polimerik sistemlerin tasarlanmasında polimer:ilaç oranı önemli bir parametredir. Polimer konsantrasyonu, toplam ilaç miktarını matrise dahil etmek ve başarılı bir şekilde enkapsüle etmek için yeterli olmalıdır. Ayrıca, molekülün fonksiyonel grupları ilacın taşıyıcı polimere konjugasyonuna izin vermelidir. İlacın çevresel faktörlere direnç göstererek salım süresince defekt bölgede tutulması gerekmektedir. Çalışmalar, salım ortamının sıcaklığı, pH, iyonik kompozisyonunun, polimerik mikro kürelerden ilaç salımı üzerinde önemli bir etkiye sahip olduğunu kanıtlamıştır (Hirota ve ark., 2016; Tomic ve ark., 2016).

Tablo 1. İlaç salım profilini etkileyen temel faktörler (Kaynak: Langer ve Chasin, 1990)

Malzeme	İlaç	Çevre
İlaç ve çevre ile uyumluluk	Taşıyıcı malzeme içindeki pozisyon	pH
Çaprazbağlayıcı ajanlar, fonksiyonel gruplar	Moleküler ağırlık	Sıcaklık
Ölçü ve yoğunluk	Farmakokinetik ve farmakodinamik özellikler	Polarite
Polimerizasyon ve denatürasyon Özellikleri	Hidrofiliklik/yüzey yükü	Enzim ve iyonlar

Son zamanda, ilaç salım çalışmalarının çoğu nanopartikül, lipozom, dendrimer ve lipoproteinler gibi küresel/yarı küresel taşıyıcı ajanları değerlendirmeye odaklanmıştır (Hadjitheodorou & Kalosakas, 2014). Partikül bazlı sistemlerde; doğal ve sentetik polimerler, ferrofluid, kuantum dot, silika-nanopartiküller; ilaç ve gen taşınımı, görüntüleme ve in vitro diagnostik uygulamaları için taşıyıcı materyal olarak kullanılmıştır (De Jong & Borm, 2008). Bu malzemeler arasında biyobozunur polimerik parçacıklar ilaç taşıyıcı olarak umut vaat etmektedir. Biyobozunur

polimerlerin yan ürünleri, vücut üzerinde toksik bir etkiye neden olmadan metabolize edilebilir veya atılabilir. Biyopolimerik partiküllü ilaç taşıyıcı materyaller, kontrollü/sürekli salım davranışı yanı sıra doku ve hücrelerle biyouyumluluk sağlayabilir. İlaç çözünme oranı, geniş yüzey/hacim oranı ile ayarlanabilir. İlaçlar ve biyomakromoleküller, mikro-nano ölçekli partikül sistemleri ile birlikte hedef noktaya taşınabilmektedir.

2.3.1. Kontrollü İlaç Salım Sistemlerinde Kullanılan Kinetik Modeller

Kontrollü ilaç salım sistemlerinde kinetik modeller, ilaç salım davranışını, zamanın fonksiyonu olarak açıklayan ampirik denklemlerdir. Kontrollü salım sistemlerinde, ilaç salım profilinin ampirik denklemlerle açıklanabilmesi, salım mekanizmasının açıklanması ve tahmin edilebilirliği açısından oldukça önemlidir. Mekanizma-temelli sınıflandırmalara göre ilaç salım sistemleri; difüzyon, çözünme, şişme, kimyasal etkileşimler veya harici uyarıcılar ile kontrol edilebilmektedir. Tablo 2'de gösterilen ampirik denklemler, çeşitli varsayımlarda bulunarak, ilaç salım sürecinin altında yatan mekanizmalarını açıklamaktadır.

Tablo 2. Kontrollü salım sistemlerinde kullanılan kinetik modeller (Kaynak: Paarakh ve ark., 2018)

Mekanizma	Model	Denklem
Difüzyon	Zero-order	$M_t = M_0 + K_0 t$
	First-order	$M_t = M_0 e^{-K_1 t}$
	Higuchi	$\frac{M_t}{M_0} = K_H t^{1/2}$
	Baker-Lonsdale	$\frac{3}{2} \left[1 - \left(1 - \frac{M_t}{M_\infty} \right)^{2/3} \right] - \frac{M_t}{M_\infty} = kt$
	Korsmeyer-Peppas	$\frac{M_t}{M_\infty} = K t^n$
Çözünme	Weibull	$\frac{M_t}{M_\infty} = 1 - e^{-\frac{(t-T)^b}{a}}$
Erozyon	Hoxon-Crowell	$M_0^{\frac{1}{3}} - M_t^{\frac{1}{3}} = K_{hc} t$
	Hopfenberg	$\frac{M_t}{M_\infty} = 1 - \left[1 - \frac{k_0 t}{C_0 a_0} \right]^n$
	Kopcha	$M = A\sqrt{t+Bt}$
Şişme	Sequential-layer	$M_t = M_0 + k_{diss} A_t t$

2.4. Kemik Doku Mühendisliği Uygulamalarında Kitosan Temelli Nanokompozit Malzemeler

Kitin, doğada selülozdan sonra en çok bulunan polimerdir. Deniz kabuklularının dış iskeletinin temel bileşenidir. Ayrıca bazı mantar ve bakteri türlerinin hücre duvarlarında da bulunmaktadır. Kitinin saf olarak kullanımı zayıf çözünürlüğü nedeniyle sınırlıdır, bu nedenle kimyasal olarak modifiye edilmesi gerekmektedir. Tekrarlanan N-asetil-2-amino-2-deoksi-D-glikoz birimlerinin kısmi deasetilasyonu, kitosan oluşumu ile sonuçlanır. Kitosan, kitinden daha reaktiftir ve çeşitli morfolojilere göre uyarlanabilir. Diğer biyopolimerlere göre birçok avantaj sağlayan pek çok fiziksel, kimyasal ve biyolojik özelliklere sahiptir (Tablo 3).

Tablo 3. Kitosanın fiziksel, kimyasal ve biyolojik özellikleri

Fiziksel ve Kimyasal Özellikler	Biyolojik Özellikler
Polikatyonik yapı	Biyouyumluluk
Yarı Kristal	Toksik olmaması
Serbest amin grupları	Biyobozunurluk
Hidrofiliklik	Hemostatik
Modifiye edilebilir, çarpaz bağlayıcılara açık yüzey	Antimikrobiyal, Fungistatik

Kitosan, doğadaki tek pozitif yüklü polisakkarit olduğu için birçok biyomedikal uygulamada tercih edilmektedir. Omurgasındaki pozitif yüklü gruplar nedeniyle hemostatik özelliğe sahiptir. Hücre zarının negatif yüklü kısımları ile kolayca etkileşime girerek malzeme-hücre etkileşimini artırır (Kumari ve ark.; Croisier ve Jerome, 2013) Düşük toksisite, anti bakteriyel özellik ve hidrofilikliği ile biyomalzeme uygulamalarında tercih edilmektedir (Di Martino ve ark., 2005).

Kitosanın bozunma yan ürünü olan N-asetil- β -D-glukozamin, fibroblast proliferasyonunu uyararak yara iyileşmesini hızlandırır. Ayrıca, yapılan çalışmalar kitosan bazlı yara örtülerinin defekt bölgede oksijen aktarımını sağladığını ve yara sıvısını uzaklaştırdığını kanıtlamıştır. (Pillai ve ark., 2009). Yapısında bulunan glikozaminoglikan grupları ile hücre dışı matrise olan benzerliği nedeni ile kemik doku mühendisliği uygulamalarında en çok tercih edilen biyopolimerlerden biridir. Kitosanın bozunma yan ürünleri, insan vücudu tarafından tamamen absorbe edilebilecek zararsız oligosakaritler olduğu için doku iskelesi malzemesi olarak tercih edilir (Dash ve ark., 2011). Literatürde, kitosanın osteoblast proliferasyonunu ve mineral birikimini arttırdığı kanıtlanmıştır (Kim ve ark., 2008). Geleneksel

uygulamalarda ise kemik çimentosunun özelliklerini geliştirmek için toz formunda kullanılmaktadır. Kim ve ark. (2004) tarafından üretilen kitosan/hidroksiapatit katkı polimetilmetakrilat (PMMA) kemik çimentosu, in vitro çalışmalara göre, saf PMMA çimentosu ile karşılaştırıldığında osteoiletkenlik ve biyouyumluluk konusunda daha iyi sonuçlar göstermektedir.

Kitosanın yara örtüsü uygulamalarında kullanımı Food and Drug Administration (FDA) tarafından onaylanmaktadır. Kitosan bazlı yapılar, kullanılacak bölge ve amaca göre gözenekli iskele, film, mikro/nanopartikül veya tablet gibi çeşitli morfolojilerde işlenebilir. Kemik doku mühendisliği uygulamalarında ise kemik grefti, implant kaplama veya ilaç salım ajanı gibi birçok alanda kullanımı gittikçe yaygınlaşmaktadır. Literatürdeki kitosan temelli kemik doku mühendisliği uygulamalarına yönelik çeşitli malzeme tasarımları, Tablo 4'te gösterilmiştir.

Tablo 4. Kitosan temelli kemik doku mühendisliğine yönelik biyomalzemeler

Form	Amaç	Referans
Doku iskelesi	Kemik rejenerasyonu, ilaç ve büyüme faktörü salımı	Jeong Park et al., 2000
Fiber	Kemik rejenerasyonu	Zhang et al., 2008
Film	İmplant kaplama, protein taşınımı	Abarrategi et al., 2008
Tablet	Kemik enfeksiyonu tedavisi	Aimin et al., 1999
Hidrojel	Enjekte edilebilen doku iskelesi	Niranjan et al., 2013
Mikro/nanopartikül	İlaç taşınımı, İmplant kaplama	Mitra et al., 2001; Wang et al., 2004
Mikro/nanoküre	İlaç taşınımı, kemik dolgu malzemesi	Sunny et al., 2002; Arya et al., 2009

Kitosan biyopolimeri, hidrofilik ve hidrofobik birçok ajanı enkapsüle edebildiği için ilaç taşıyıcı malzeme olarak yaygın olarak kullanılmaktadır. Özellikle kemik enfeksiyonu tedavisinde, seçilen ilaçlar kitosan bazlı materyallere dahil edilerek transplantasyon sonrası kemik dokusu enfeksiyonunu yok etmek için kullanılmıştır. Literatürdeki kemik doku enfeksiyonu tedavisinde kullanılmak üzere tasarlanan kitosan temelli ilaç taşıyıcı sistemler Tablo 5'te gösterilmektedir.

Tablo 5. Kemik enfeksiyonu tedavisinde kullanılan ilaç taşıyıcı kitosan-temelli sistemler

İçerik	İlaç	Malzeme Üretim Metodu	Referans
Kitosan	Gentamisin	Solvent evaporasyonu	Aimin et al., 1999
Kitosan	Vankomisin	Püskürtmeli kurutma	Cevher et al., 2006
Kitosan	Siprofloksasin	Püskürtmeli kurutma	Orhan, 2006

Gösterdiği üstün avantajlara rağmen düşük stabilitesi nedeni ile uzun dönem etki sağlanması için çapraz bağlayıcılar, anyonik polimerler veya takviye ajanları kullanılarak güçlendirilmektedir. Güçlendirilmiş yapı ile, mekanik özelliklerde iyileşme, bozunum hızında ise yavaşlama sağlanmaktadır. Bununla birlikte, glutaraldehit veya tripolifosfat (TPP) gibi kimyasal çapraz bağlayıcılar, biyoaktivite kaybına neden olabilir ve ortamdaki tamamen uzaklaştırılamadıkları takdirde toksisitetlerine bağlı olarak bazı yan etkilere neden olabilir. Negatif yüklü karboksümetil selüloz, aljinat, dekstran sülfat gibi polimerler kitosan ile polielektrolit kompleks oluşturabilir. Bu polielektrolit kompleksleri, moleküller arası elektrostatik etkileşimlerden dolayı stabiliteyi artırır. Ayrıca, mikro veya nano katkılarında kitosanın stabilitesini ve fiziksel/kimyasal özelliklerini geliştirmektedir.

2.4.1. Kitosan/Kil Nanokompozit Malzemeler

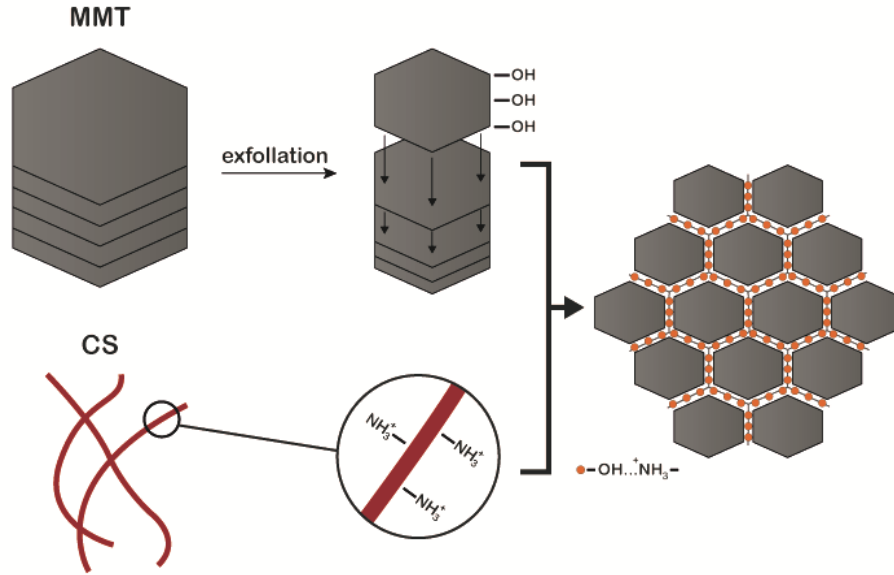
İnorganik nano yapıları dolgu malzemelerinin kitosan matrisinde homojen olarak dağıtılması ile elde edilen kitosan nano biyokompozitler, biyosensörler, ilaç ve gen iletimi, doku rejenerasyonu ve yüzey modifikasyonu gibi çeşitli biyomedikal uygulamalarda kullanılmaktadır (Kong ve ark., 2005; Kaushik ve ark., 2008; Kang ve ark., 2009; Bao ve ark., 2011). Nanokompozitler, polimer ve dolgu malzemesinin avantajlarını biyolojik, kimyasal ve fiziksel açıdan birleştirebilir. Literatürde silikat katkıları yapılan polimer nanokompozitlerde; polimer zincirleri ve silikat nanoparçacıkları arasındaki fiziksel çapraz bağlanma, malzemelerin fiziksel özelliklerini geliştirdiği, stabilitenin arttığı bu nedenle de daha yavaş bozunma oranları elde edilmektedir. Literatürde, nanokil/polimer kompozitlerinin saf polimer malzemelerle karşılaştırıldığında mekanik, reolojik ve termal özelliklerinde gelişme gösterdiği kanıtlanmıştır (Günister ve ark. 2007).

Malzeme özelliklerinde iyileşme sağlamak için polimer matrisinde nanokil katmanlarının homojen olarak disperse edilmesi gerekmektedir. Polimer, ayrılmış kil tabakalarına nüfuz edemediğinde yapı faz ayrımı olarak adlandırılır. Polimer/kil

arayüzünün artması için kil tabakalarının maksimum seviyede ayrışması gerekmektedir.

Doğal killer arasında montmorillonit (MMT), özellikle ilaç dağıtım sistemlerinde büyük bir ilgi görmektedir. Simektit mineral grubuna aittir ve iki tetrahedron tabaka ve kenar köprülü oktahedral tabaka (2:1 tip) ile çok katmanlı sandviç yapısından oluşur. İzomorf sübstitüsyon nedeniyle negatif olarak yüklenmiştir (Kevadiya ve ark., 2009). Kil kristalleri arasındaki gevşek bağlar su moleküllerinin yapı içine girmesine ve kilin şişmesine neden olur. MMT'nin antimikrobiyal aktivitesi ve sitotoksik olmaması gibi biyolojik özellikleri, biyomedikal uygulamalarda daha fazla gelişme için çeşitli fırsatlar sağlamaktadır. Literatürde, MMT katmanları arasına hapsedilen çeşitli aktif ajanların kontrollü salımı sağlanmıştır. (Joshi ve ark., 2009; Chen ve ark., 2010; Yang ve ark., 2016).

Kitosan/MMT biyonanokompoziti, katyonik değişim ve hidrojen bağları ile meydana gelmektedir. Kitosanın katyonik yapısı, negatif yüklü MMT ara tabakalarında iyon değişimi ile birleşmeyi sağlar (Darder ve ark., 2005). MMT katmanlarının açılarak (exfoliated) Kitosan/MMT nanokompozit yapısını oluşturması, Şekil 1'de gösterilmektedir.



Şekil 1. Kitosan/MMT Nanobiyokompozit oluşumunun şematik gösterimi

Kitosan/nanokil (CS/MMT) kompozit sistemleri; gıda paketlenme, biyosensör kaplama, ilaç salım sistemleri ve enzim immobilizasyonu gibi çeşitli uygulama alanlarında tercih edilmektedir. Lavorgna ve ark. (2010), kitosan film çözeltisine yapılan MMT ilavesinin; termal, mekanik ve bariyer özelliklerini iyileştirdiğini belirtmiştir. Son zamanlarda, ilaç salım uygulamalarında CS/MMT matris kullanımına yönelik çalışmalar ön plana çıkmaktadır. Chitosan/MMT kompozitlerinin ilaç dağıtım



uygulamalarındaki ana avantajları şunlardır (Kevadiya ve ark., 2010; Salcedo ve ark., 2012):

- Ani salımı engelleyen elektrostatik etkileşim
- Daha yavaş biyobozunum profili
- Geliştirilmiş yapısal ve fonksiyonel özellikler
- Artan antimikrobiyal aktivite
- Biyouyumluluk

2.4.2 Mikroakışkanlaştırıcı Tekniği ile Nanokompozit Malzeme Üretimi

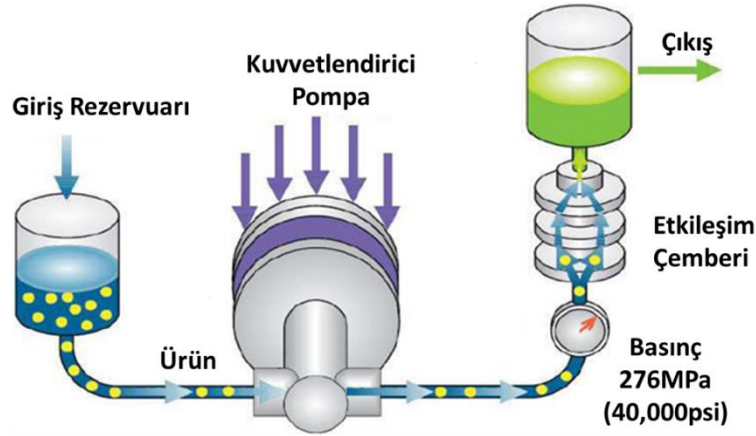
Nanobiyokompozit malzemelerdeki en önemli dezavantaj, nano-ölçekli dolgu malzemelerinin polimer matrisinde topaklanma ve kümelenme eğilimi göstermesidir. Bu nedenle, homojen yapıllı nanokompozit malzeme üretiminde çeşitli homojenizasyon yöntemleri kullanılmaktadır. Polimer-nanodolgu süspansiyonu ile nanokompozit malzeme yapısı elde etmek için kullanılan yöntemlere ultrasonik, mekanik veya mikro-ölçekli yaklaşımlar örnek olarak verilebilmektedir.

Ultrasonik homojenizasyon, biyopolimer temelli çözeltilerde nano ölçekli malzemelerin homojen dağılımını sağlamak için yaygın olarak kullanılmaktadır. Bu teknik, aynı zamanda partikül boyutunu azaltarak homojen partikül büyüklüğü dağılımına neden olur. Buna rağmen, ultrasonik yöntemin kullanımı, sonikatör probu üzerinde bulunan metal iyonlarının erozyona uğraması ile biyopolimer çözeltilisini kontamine ederek biyomedikal uygulamalarda kullanımını kısıtlamaktadır. Mekanik yöntemler ultrasonik homojenizasyona alternatif olarak gösterilebilir. Fakat, yüksek miktarda hammadde ihtiyacı ve diğer yöntemlerle kıyaslandığında elde edilen düşük homojenizasyon verimi, bu yöntemin düşük hacimli nanokompozit çözeltilerinde kullanımını verimsiz kılmaktadır.

Mikro-ölçekli yöntemler, kolay işlenebilirlik ve düşük enerji tüketimi gibi özellikleri ile geleneksel yöntemlere alternatif olarak gösterilmektedir. Mikrofluidizer teknolojisi (high shear fluid process), yüksek basınçlı homojenizasyon yöntemi olup mikrokanallar içerisinde bulunan yüksek hızdaki sıvının "Etkileşim Odası" adı verilen odacıklar içerisinde dinamik etkileşmesi esasına dayanır. Mikroakışkanlaştırıcı, ürünü sabit geometriye mikrokanal boyunca sabit basınçta yönlendirir. Ürün; etkileşim çemberinde, yüksek hızlarda kesme oranlarına maruz kalır. Mikroakışkanlaştırıcı, malzemenin tamamının homojen bir şekilde aynı işleme koşullarına tabi tutulmasını sağlar (Şekil 2). Polimer-nanodolgu süspansiyonunun hızı, mikrokanallarda 500 m/s'ye kadar yükselebilir (Panagiotou ve ark., 2008). Mikroakışkanlaştırıcı işlemi, istenilen homojenizasyon koşullarının elde edilmesi için tekrar tekrar uygulanabilir.

Optimum devir sayısı, malzeme yapısı ve süspansiyondaki nanodolgu-polimer oranına göre değişmektedir.

Nanokompozit malzemenin fiziksel özellikleri, basınç ve devir sayısına bağlı olarak değişmektedir. Mikroakışkanlaştırıcı ünitesi; nano-emülsiyon ve lipozom üretimi, yüksek basınçlı homojenizasyon ve polimer degradasyonu gibi çeşitli uygulamalarda kullanılabilir (Mahdi Jafari ve ark., 2006; Perdones ve ark., 2012; Chen ve ark., 2012). Nanodolgu malzemelerin polimer matris içerisinde homojen dağılımını sağlarken, aynı zamanda biyopolimer yapısında bozulmayı engellemek için, mikroakışkanlaştırıcı parametreleri (devir sayısı ve basınç) kullanılan malzeme ve uygulama alanına göre optimize edilmelidir.



Şekil 2. Mikroakışkanlaştırıcının Şematik Gösterimi

2.4.3. Nanosilika Katkılı Kitosan Doku İskeleleri

Kemik doku mühendisliği uygulamalarında polimer ve biyoseramiklerin kullanımı, kemik dokusunun taklit edilmesi açısından ideal bir yaklaşımdır. Kemik dokusu, polimer ve biyolojik apatitten oluşan kompozit bir yapıya sahiptir. Genellikle, doku iskelesi yapımında tek malzeme türünün kullanılması, kemik dokusu rejenerasyonu için gerekli mekanik/kimyasal özellikleri sağlayamaz. Bu nedenle, iki veya daha fazla malzemenin özellikleri kompozit bir malzemede birleştirilebilir. Biyobozunur polimerler ve seramiklerin birlikte kullanımı, kompozit kemik doku iskelesi üretimi için ideal adaylardır (Chen ve ark., 2008). Seramik katkısı olarak hidroksiapatit (HAP) ve trikalsiyum fosfat (TCP) kullanımı, kemik dokusunun inorganik fazına olan benzerlik, biyouyumluluk ve osteokondaktif özellikler açısından yaygın olarak tercih edilmektedir.

Günümüzde, kemik greft tasarımları, esas olarak kolajen matris ve hidroksiapatitten (HAP) oluşan kemik dokusunun yapısını taklit etmek için polimerlerin inorganik biyoaktif takviyelerle geliştirilmesine odaklanmıştır. Genelde, kemik dokusunun temel inorganik bileşeni olan nano-hidroksiapatit (HAP) parçacıkları

biyobozunur polimerler içine dahil edilerek; mekanik özellikleri güçlendirici, aynı zamanda mineralizasyonu indükleyici ajan olarak kullanılmaktadır. Yine de, HAP nanoparçacıkları vücut sıvısında kısa sürede çözünerek stabilite problemlerine neden olmaktadır. Bu nedenle, biyolojik uygulamalarda çözünürlük ve stabilite problemlerini aşmak için çeşitli anyon ve katyonlar ile zenginleştirilen HAP nanoparçacıkları kullanılmaktadır (Thian ve ark., 2005).

Son zamanda yapılan çalışmalar, 3B matriste iç içe geçen nanokompozit yapıları malzemelerin kemik doku mühendisliği uygulamalarında kullanılmasına odaklanmıştır. Nanodolgu katkısı olarak, silika bazlı nanopartiküller HAP kristallerine alternatif olarak tercih edilmektedir. Silika, çeşitli bitki ve hayvanların ürettiği, doğada en çok bulunan biyojenik minerallerden biridir (Narayanan ve Sakthivel, 2011). Yapılan çalışmalar, biyopolimerler ve silika parçacıklarından oluşan kompozitlerin biyomedikal uygulamalarda ümit verici potansiyele sahip olduğunu kanıtlamaktadır. Silika katkısı, kemikte gen ekspresyonunu indükleyerek osteojenik proliferasyonu arttırmakta, kalsifiye edici ajan görevi görerek de hücre tutunumunu desteklemektedir. Ayrıca, silisyum parçaları polimer yapıları kemik greftlerinin mekanik özelliklerini iyileştirmektedir. Yapılan çalışmalar, silika katkısının malzeme yüzeyinde sert doku mineralleşmesinde hayati önem taşıyan CaO birikimini indüklediğini göstermiştir (Madhumathi ve ark., 2009).

Sentetik silika kaynakları arasında *polihedral oligomerik silseskioksanlar* (POSS), silikon/oksijen inorganik kafes yapıları ve Si moleküllerine bağlı organik hidrokarbon R grupları ile en küçük sentetik silika tanecikleridir (Pittman ve ark., 2006). Nano-POSS kafes yapıları (1-3 nm), mikro ölçekli seramik partikülleri ile kıyaslandığında, daha geniş bir yüzey alanı sağlar ve yapıyı güçlendirir (Hong ve ark., 2008; Sulca ve ark., 2009). Ayrıca, POSS nanokafes yapısı, yüzey modifikasyonu gerektiren geleneksel silika parçacıklarından farklı olarak işlevsel R grupları sayesinde kovalent olarak bağlanabilmesi mümkün olduğundan polimer ile güçlü bir etkileşim sağlar. Literatürdeki çalışmalar, polimer matrisine yapılan POSS nanokafes katkısının yüzey özellikleri, camsı geçiş sıcaklığı, mekanik özelliklerde iyileşmeye neden olduğunu göstermektedir (Sulca ve ark., 2009; Tamburacı ve Tihminlioğlu, 2018). POSS nanokafes yapısı, biyouyumlu ve non-toksik özellikler göstermektedir (Ghanbari ve ark., 2011). Bu nedenle, biyomedikal uygulamalarda, ilaç dağıtım sistemlerinde ve nano-dolgu maddesi olarak kardiyovasküler, kemik ve dental nanokompozitlerde kullanılmaktadır (McCusker ve ark., 2005; Kannan ve ark., 2006; Knight ve ark., 2008; Dodiuk-Kenig ve ark., 2006; Kim ve ark., 2007; Tamburacı ve Tihminlioğlu, 2018). Grubumuzca kemik doku mühendisliği uygulamalarına yönelik geliştirdiğimiz gözenekli Kitosan/POSS doku iskelelerinin kemik ve fibroblast hücrelerine toksik etki



göstermediği kanıtlanmıştır. Ayrıca POSS ilavesinin osteoblast hücrelerin yapışmasını, çoğaltmasını ve ALP aktivitesini arttırması nedeni ile potansiyel bir doku iskelesi olduğu bulunmuştur (Tamburacı ve Tihminlioğlu, 2018). Bu nedenle bu proje çalışmamızda, kemik rejenerasyonuna yönelik antibiyotik yüklü nanokürelerin ve kitosan/POSS temelli kompozit doku iskelelerinin üretilmesi, farklı iki tabaka olarak birbirine entegre edilmesi ve *in vitro* koşullarda kemik, kırık hücreleri üzerindeki etkilerinin incelenmesi amaçlanmıştır. 1. ve 2. iş paketlerinde planlanan antibiyotik yüklü kitosan nanokürelerin üretimi /karakterizasyonu ve antibiyotik yüklü nanoküre içeren POSS/kitosan bazlı doku iskelelerinin üretimi ve karakterizasyonu sırasıyla gerçekleştirilmiştir. Son iş paketi olan 3. iş paketinde antibiyotik yüklü nanoküre kaplı kitosan/POSS doku iskelelerinin *in vitro* hücre ve histoloji çalışmaları gerçekleştirilmiştir.

3. MALZEME&YÖNTEM

3.1 Malzeme

Yapılan çalışmada düşük molekül ağırlıklı kitosan (Sigma-Aldrich) kullanılmıştır. Doku iskelelerinde nanokatki olarak POSS (Hybrid Plastics) kullanılmış, nanoküre üretiminde ise montmorillonit (MMT) nanokil (Southern Clay Products) kullanılmıştır. *In vitro* hücre kültürü çalışmalarında Saos-2 ve SW 1353 hücre hatları penisilin-streptomisin (Serox) ve %10 FBS (Serox) içeren yüksek glukozlu DMEM (Serox) ortamında kültive edilmiştir. *In vitro* analizlerde sitotoksosite ve hücre çoğalması WST-1 canlılık kiti (Biovision) ile belirlenmiştir. Saos-2 ve SW 1353 hücrelerinin doku iskelesi yüzeyindeki tutunumu Nucblue (DAPI) ve Alexa Fluor 555 floresan boyalar (Thermo Fisher Scientific) ile incelenmiştir. Saos-2 hücrelerinin alkalen fosfataz aktivitesi kolorimetrik ALP kiti (Biomerieux) ile ölçülmüştür. Osteokalsin sekresyonu ise sandviç ELISA (Elabscience) yöntemi ile ölçülmüştür. Kırık hücrelerinin aktivitelerinin belirlenmesinde kullanılan GAG ölçümünde kolorimetrik GAG analizi (Amsbio) ve hidroksiprolin analizi (Elabscience) kullanılmıştır.

3.2. Antibiyotik Yüklü Kitosan/Kil Nanokürelerin Üretimi

3.2.1 Mikrofludizer (Mikroakışkanlaştırıcı) parametrelerinin optimizasyonu

Mikroakışkanlaştırıcı işleminde (Bkz Şekil 2) etkili olan işlem parametreleri basınç ve döngü sayısıdır. Basınç ve döngü sayısı, polimer çözeltisinin homojenizasyonunu, partikül boyutu, morfolojisi ve etken madde yükleme kapasitesi

gibi özellikleri etkilemektedir. Bu şekilde daha kararlı ürünler elde edilirken aynı zamanda biyoyararlanım arttırılmaktadır. Bu sistem, polimer çözeltisi içinde kil ve ilacın homojen dağılımı için kullanılmıştır. Kitosan polimerinin stabilitesi arttırmak ve özelliklerini iyileştirmek için yapıya kil ilave edilmektedir. Bu çalışmada, polimer-kil-ilaç çözeltisi ile, iki farklı basınçta ve üç farklı döngü sayısında optimizasyon çalışması yapılmıştır. Çalışma grupları Tablo 6'da verilmiştir. Elde edilen gruplar viskozite ölçümü ile karakterize edilmiştir ve uygun moleküler ağırlıkta olan gruplar antibiyotik içeren küre üretimi için seçilmiştir.

Doku iskelesi üretimi için proje önerisinde planlanan iş paketinde klasik homojenizasyon yöntemlerinin kullanılacağı belirtilmiştir. Ancak kürelere yönelik viskozite çalışmalarında sonikasyon ve homojenizasyon yöntemlerinin molekül ağırlığı ve viskoziteye değerlerine önemli oranda etki etmesi nedeni ile Mikrofluidizer yöntemi ile homojenizasyon yapılmasına karar verilmiştir. Doku iskelesi yapımında kullanılacak olan düşük molekül ağırlıklı kitosan çözeltisi farklı mikrofluidizer üretim parametreleri ile homojenize edilmiştir. Bu denemelerde farklı basınç ve döngü sayıları kullanılmıştır. Bunun yanı sıra, doku iskelesi üretiminde kullanılan klasik homojenizasyon yöntemleri de denenmiştir. Böylece klasik homojenizasyon yöntemleri ile mikrofluidizer homojenizasyon sisteminin doku iskelesinin özelliklerine olan etkileri karşılaştırılmıştır. Çalışma grupları Tablo 7' de verilmektedir.

Tablo 6. Nanoküre üretiminde kullanılan mikrofluidizer (mikroakışkanlaştırıcı) çalışma grupları

Gruplar	Basınç (psi)	Döngü
Kitosan/kil(MMT) nanokompozit	10000	3
	10000	5
	10000	10
	20000	5
	20000	10

Tablo 7. Doku iskelesi üretiminde kullanılan çalışma grupları

Gruplar	Homojenizasyon Yöntemi
-Saf kitosan (kontrol) -Kitosan/POSS nanokompozit	Ultrasonik banyo (UB)
	Ultrasonik Homojenizatör (Sonikatör-UH)- 15Amplitude
	Ultrasonik Homojenizatör (Sonikatör-UH)- 35Amplitude



	Mikrofluidizer MF (5000psi-3döngü)
	Mikrofluidizer MF (5000psi-5döngü)
	Mikrofluidizer MF (10000psi-3döngü)
	Mikrofluidizer MF (10000psi-5döngü)

3.2.2 Reolojik Özellikler

Sıvının iç sürtünmesine bağlı olarak, kuvvetin uygulandığı tabakaya yakın olan tabakalar hızlı, uzak olanlar yavaş hareket eder. Akışkan viskozitesi bu sıvıların iç sürtünme kuvvetlerinin bir ifadesi olarak tanımlanır (Çelebi, 1996). Farklı basınç ve döngü sayıları ile homojenizasyon işlemi görmüş kitosan çözeltisinin reolojik özellikleri, $0.1-10 \text{ s}^{-1}$ kayma gerilimi (τ) aralığında 25°C 'de statik koşullarda HAAKE-MARS reometre cihazı ile belirlenmiştir. Kitosan çözeltilerinin kıvam indeksi (K) ve akış davranış indeksi (n) üstel kural ile belirlenmiştir. Üstel kuralın genel ifadesi aşağıdaki denklemde (Denklem 1) görülmektedir:

$$\tau = K \cdot \dot{\gamma}^n \quad (\text{Denklem 1})$$

3.2.3 Viskozite Ölçümü ve Moleküler Ağırlık Belirlenmesi

Polimer kalitesi, performansları ve işlenme karakteristiklerinin belirlenmesi amacıyla gerçek (intrinsik) viskozite ve ortalama molekül ağırlığı gibi özellikler değerlendirilmelidir. Bir polimer çözeltisinin viskozitesi, polimerin ortalama molar kütlesi ve konsantrasyonunun bir işlevidir. Polimer çözeltisinin viskozitesi (n), kapiler viskometre ile belirli bir mesafeyi alması için gerekli olan sürenin ölçülmesi ile belirlenir. Bağlı (relatif) viskozite (η_{rel}); polimer çözeltisinin akma süresinin (t) saf çözüngenin geçiş süresine (t_s) olan oranı üzerinden hesaplanır. Yoğunluk farkı ihmal edilebileceğinden, düşük konsantrasyonlu polimer çözeltileri için yöntem basit bir şekilde uygulanabilmektedir. Bu nedenle, göreceli viskozite doğrudan akma sürelerinin oranı üzerinden hesaplanabilir.

Nanoküre üretiminde kullanılacak olan polimer çözeltilerinin gerçek (intrinsik) $[\eta]$ viskozitelerinin belirlenmesi amacıyla Oswald viskozimetresi kullanılmıştır. İlk olarak bağlı (relatif) viskozite, η_{rel} , Denklem (2) kullanılarak hesaplanmıştır.

$$\eta_{\text{rel}} = t/t_s \quad (\text{Denklem 2})$$



Bu denklemde bağıl viskozite, η_{rel} , polimer çözeltisinin akma süresi t , saf çözgenin geçiş süresi t_s olarak tanımlanmıştır. Spesifik viskozite hesabı ise Denklem (3) te açıklanmıştır.

$$\eta_{sp} = (t/t_s) - 1 \quad (\text{Denklem 3})$$

İndirgenmiş (reduced) viskozite spesifik viskozitenin konsantrasyona bölünmesi ile bulunmaktadır (Denklem 4). Elde edilen indirgenmiş viskozite değerleri üzerinden konsantrasyona bağlı değişim grafiği çizilmiş ($\ln \eta_{red} - C$ grafiği) ve kesişim noktasından gerçek viskozite η , hesaplanmıştır (Denklem 5).

$$\eta_{red} = \eta_{sp}/c \quad (\text{Denklem 4})$$

$$\ln \eta_{rel}/C = \eta + k\eta^2 C \quad (\text{Denklem 5})$$

η gerçek viskozite (intrinsik viskozite) ortalama moleküler kütlelerin (M) bir fonksiyonu olarak Kuhn-Mark-Houwink Sakurada denklemi ile ifade edilmiştir. (Denklem 6). K ve α katsayıları ise polimer-çözgen-sıcaklık sistemine göre değişiklik göstermektedir. Bu katsayılar $\log [\eta]$ 'e karşı ortalama moleküler ağırlık grafiği elde edilerek hesaplanmıştır. Bu grafikte ortalama molekül ağırlığı mutlak metod olarak belirlenmiştir (Yacob et al., 2013). Viskozite ölçümünde 0.15M amonyum asetat ve 0.2 M asetik asit karışımı çözgen olarak kullanılmıştır. $K=9.66 \cdot 10^{-5}$ (dm^3/g), $\alpha=0.742$ olarak belirlenmiştir.

$$\eta = KM^\alpha \quad (\text{Denklem 6})$$

3.2.4. Elektropüskürtme Parametrelerinin Belirlenmesi

Küreler, %90 (v/v) asetik asit içerisinde homojen olarak hazırlanan %2 (w/v) kitosan çözeltisi kullanılarak elektropüskürtme yöntemi ile üretilmiştir. Homojen dağılım ve uygun çaplı kürelerin üretimi için voltaj, uzaklık, akış hızı ve kanül çapı değiştirilerek farklı proses şartlarında küreler üretilmiştir. Elektrosprey çalışma parametrelerinin belirlenmesinde kullanılan minimum ve maksimum değerler Tablo 8'de verilmiştir. Küre morfolojisi ve boyutları SEM analizi ile belirlenmiştir. Parametrik optimizasyon Minitab yazılımı kullanılarak 2 seviyeli tam faktöriyel tasarım ile yapılmıştır.

Tablo 8. Elektropüskürtme çalışma parametrelerinin belirlenmesinde kullanılan minimum ve maksimum değerler

Faktör	Minimum	Maksimum
Voltaj (kV)	10	20
Akış hızı (ml/h)	5	10
Uzaklık (cm)	5	10

3.2.5 Çözünürlük çalışmaları

Gentamisin sülfat ve vankomisin hidroklorid, sulu tampon çözeltilerde direkt çözünebilmektedir. Yüklenecek ilaç konsantrasyonunun belirlenmesi ve in vitro salım çalışmalarında kullanılmak üzere antibiyotiklerin pH 7.4 ortamında maksimum çözünürlükleri belirlenmiştir. Kapaklı erlenlere konulan 10 ml (pH 7.4) fosfat tamponu çözeltisi içinde yüksek konsantrasyonlu satüre antibiyotik stok çözeltileri (5 g/ml) hazırlanmıştır. 10x, 20x, 50x, 100x, 200x, 500x seri seyreltme yapılarak çeşitli konsantrasyonda antibiyotik çözeltileri elde edilmiştir. Her bir grup için çözeltiler 3 replika olacak şekilde hazırlanmıştır. Her bir konsantrasyon için antibiyotik çözeltileri (n=3) orbital karıştırıcıda 37°C sıcaklıkta 1 saat boyunca karıştırılmıştır. 1 saat sonunda çözeltiler filtrelenerek λ_{max} (gentamisin için $\lambda_{max} = 248$ nm, vankomisin için $\lambda_{max} = 282$ nm) dalgaboyunda UV-Vis spektrofotometre ile absorbans değerleri belirlenmiştir. Maksimum doygunluktaki absorbans değerleri ile, kalibrasyon eğrileri yardımıyla maksimum konsantrasyon değeri belirlenmiştir.

3.2.6. Nanoküre Üretiminde Kullanılan Kitosan/Kil/İlaç Çözeltisinin Hazırlanması

Ağırlıkça %2 (w/w) yüksek moleküler ağırlıklı kitosan %90 asetik asit içinde bir gün boyunca karıştırılarak homojen bir çözelti hazırlanmıştır. Ağırlıkça %3 (w/w kitosan) kil (MMT) deiyonize su içinde bir gün boyunca karıştırılmış, elde edilen dispersiyon kitosan çözeltisine eklenmiştir. Yapılan çözünürlük çalışmaları baz alınarak polimer:ilaç oranı vankomisin için 4:1 ve 8:1, gentamisin için 10:1 ve 20:1 olarak seçilmiştir. Belirlenen oranlarda ilaçlar; polimer-kil çözeltisine eklenmiştir. Hazırlanan çözelti mikrofluidizer ile homojenize edilmiştir. Çözelti elektropüskürtme cihazından uygun proses şartlarında ilaç yüklü Kitosan-kil nanokompozit küre haline getirilmiştir.

3.3. Antibiyotik Yüklü Kitosan/Kil Nanokürelerin Karakterizasyonu

3.3.1 Nanokürelerin Morfolojisinin SEM ve DLS Analizleri ile İncelenmesi

Oluşturulan kitosan/kil nanokürelerin boyut ve morfolojisini incelemek amacıyla SEM analizi Quanta FEG 250 (7×10^{-2} mbar ve 15mA) ile yapılmıştır. Analiz öncesi malzemeler Emitech K550X ile Argon gazı varlığında altın ile kaplanmıştır. Küre çaplarının hesaplanması için Image J yazılımı kullanılmıştır.

Çalışma kapsamında hazırlanan nanoküre morfoloji ve boyutları SEM ve DLS analizi ile incelenmiştir. Ayrıca, homojenizasyon parametrelerinin kil katkılı kitosan nanoküre morfolojisi üzerine etkileri SEM analizi ile belirlenmiştir. 5 ml deiyonize su içinde dağıtılan kürelerin hidrodinamik boyut dağılımı Malvern Zetasizer (Nano-Zs) ile belirlenmiştir. Küre çap dağılım sonuçları, % yoğunluk üzerinden verilmiştir.

3.3.2 Zeta Potansiyelinin Ölçülmesi

Nanokürelerin yüzey yükleri 5 ml deiyonize su içinde dağıtılarak Malvern Zetasizer ile belirlenmiştir. MMT nanokil katkısının farklı pH'lardaki zeta potansiyeli, 0.1M HCl ve 0.1M NaOH tampon çözeltileri ile istenilen pH değerlerinde ölçülerek eş elektrik noktası (point of zero charge) bulunmuştur.

Nanokürelerin yüzey yükü zeta potansiyeli ölçümü ile tespit edilebilmektedir. Süspansiyon halinde bulunan kürelerin yüksek pozitif veya negatif potansiyele sahip olması koagülasyonu engellemektedir. Düşük zeta potansiyel değerine sahip olan küreler, birbirlerini itmekte zorluk yaşayarak agregasyona neden olurlar. Yüzey yükünün büyüklüğü, yüzey gruplarının asidik ya da bazik şiddetine ve çözelti pH'ına bağlı olarak değişmektedir.

3.3.3. Fourier Transform Infrared Spektroskopi (FT-IR) Analizi

FT-IR spektrometre kitosan biyopolimerinin homojenizasyon şartlarının deasetilasyon üzerine etkisi ve elde edilen kürelerin kimyasal karakterizasyonu ve ilaç etkileşimlerinin belirlenmesi amacı ile kullanılmıştır. Hazırlanan kitosan çözeltileri (%2 (w/v) kitosan (yüksek molekül ağırlıklı) -20°C 'de 1 gece boyunca bekletildikten sonra vakum altında dondurularak kurutma işlemine tabi tutulmuştur. Kurutulan örnekler, FT-IR (Shimadzu FTIR-8400S) spektrometre kullanılarak $4000-400\text{ cm}^{-1}$ dalga sayısı aralığında KBr tekniği ile analizi yapılmıştır. Deasetilasyon derecesi 1655 cm^{-1} 'deki amid I ve 3450 cm^{-1} 'deki hidroksil pik yüksekliklerinin oranını temel alan bağıntıyla bulunmuştur (Denklem 7) (Zhang et al., 2005):

$$DD (\%) = \left[1 - \left(\frac{A_{1655}}{A_{3450} \cdot 1.33} \right) \right] \times 100 \quad (\text{Denklem 7})$$

3.3.4. Nanokürelerin Enkapsülasyon Verimi ve *In vitro* Salım Profilinin İncelenmesi

Kürelerin içerdiği antibiyotik miktarı (enkapsülasyon verimi), belirli miktarda kürenin PBS içerisinde çözülmesi ile belirlenmiştir. Kitosan nanoküreler, ultrasonik banyoda 30 dakika bekletilerek parçalanmıştır. Kürelerden açığa çıkan etken madde miktarı UV-spektrofotometrede okutularak önceden belirlenmiş kalibrasyon eğrisi ile tayin edilmiştir. Enkapsülasyon verimi (% EE) aşağıda verilen denklem ile hesaplanmıştır (Denklem 8).

$$\text{Enkapsülasyon verimi (\%)} = \frac{\text{Yüklenen antibiyotik miktarı}}{\text{Teorik antibiyotik miktarı}} \times 100 \quad (\text{Denklem 8})$$

Hazırlanan nanoküre sistemlerinde yüksek enkapsülasyon verimi beklenmektedir. Yapılan çalışmada, yükleme kapasitesinin polimer:ilaç parametresi ile ilişkisi incelenmiştir. Öncelikle, salım profili ve enkapsülasyon verimini belirlemek amacıyla çeşitli konsantrasyonlarda hazırlanan vankomisin ve gentamisin çözeltileri, sırası ile 282 ve 248 nm’de taranarak kalibrasyon eğrisi hazırlanmıştır. Son aşamada kitosan/kil kompozit nanokürelerde elde edilen antibiyotik salım profillerinin salım kinetiği modelleri ile uyumu incelenmiştir.

3.3.5 Nanokürelerde Antimikrobiyal Aktivitenin İncelenmesi

Nanoküre yapımında kullanılan antibiyotik yüklü kitosan-kil çözeltilerinin antimikrobiyal aktivitesi agar difüzyon yöntemiyle, *Staphylococcus aureus* (Gram-pozitif) ve *Echerichia coli* (Gram-negatif) mikroorganizmaları üzerinde denenmiştir. Mikroorganizmaların Nutrient Broth içerisinde 24 saat 37°C’de aktive edilmiş kültürleri kullanılmıştır. 0.5 McFarland’a ayarlanan bakteri konsantrasyonu ile steril swaplar yardımıyla besiyeri üzerine ekim yapılmıştır. Antimikrobiyal etkisi incelenecek gruplar bakteri ekimi yapılan petrilere yerleştirilmiştir. 24 saat inkübasyon sonunda malzemelerin bakterilere olan etkisi incelenmiştir.

İlk aşamada antimikrobiyal aktivite çalışmaları, nanoküre yapımında kullanılan çözeltilerin boş diskler 10 µl hacimde damlatılması yöntemiyle yapılmıştır. 24 saat inkübasyon sonunda, grupların antimikrobiyal etkisi incelenmiştir. Sonraki çalışmalarda, çeşitli periyotlarda alınan *in vitro* salım sıvılarının antimikrobiyal etkisi incelenmiştir. Belirli zaman aralıklarında (6 saat, 1 gün, 25 gün) () toplanan salım ortamlarının *E.coli* ve *S.aureus* mikroorganizmaları üzerindeki antimikrobiyal etkisi incelenmiştir. Salım ortamları, boş diskler üzerine 10 µl hacimde damlatılarak *E.coli*

ve *S.aureus* ekimi yapılmış petrilere yerleştirilmiştir. 24 saat inkübasyon sonucunda antibiyotik salım sıvılarının mikroorganizmalar üzerindeki etkileri incelenmiştir.

3.4 Kitosan/POSS Nanokompozit Doku İskelelerinin Üretimi

3.4.1 Doku İskelelerinin Üretim Parametrelerinin Optimizasyonu

Doku iskeleleri düşük molekül ağırlıklı kitosan (Sigma-Aldrich) ve Octa-TMA POSS (Hybrid Plastics) hibrit nanokafes silika partikülleri kullanılarak hazırlanmıştır. Yapılan ön çalışmalarda mekanik özellikler (basma testi), morfoloji (SEM), gözeneklilik yüzdesi (mikro CT) ve POSS nanopartiküllerin yüzey yapısına etkisi (AFM) değerlendirilerek POSS konsantrasyonu belirlenmiştir.

Kitosan/POSS nanokompozit doku iskelelerinin hazırlanma aşamasında POSS nanopartiküllerin polimer matrisi içinde homojen dağılımının sağlanması için farklı homojenizasyon teknikleri denenmiştir. Bu teknikler; ultrasonik banyo, ultrasonik homojenizatör probu ve mikrofludizer olarak belirlenmiştir. POSS nanopartiküller kullanım öncesi vakumlu etüvde 1 gece kurutulmuştur. Ağırlıkça %1 düşük molekül ağırlıklı kitosan %1 asetik asit çözeltisi içinde çözdürülmüştür. Partiküllerin agglomerasyonunu engellemek amacıyla POSS nanokafes yapılar ise saf su içerisinde bir gece karıştırılarak dağıtılmıştır. Daha sonra kitosan polimer çözeltisi ile POSS dispersiyonu karıştırılmıştır.

Hazırlanan polimer nanokompozit çözeltileri; ultrasonik homojenizatör probu ile 30 dk (15-35 Amplitude), ultrasonik su banyosunda 30 dk homojenize edilmiştir. Bu klasik yöntemlere alternatif olarak mikrofludizer yönteminde farklı basınçlarda (5000-10000psi) ve döngü (3-5) sayılarında homojenizasyon yapılmıştır. Elde edilen homojenizasyon yöntemlerinin kitosanın moleküler ağırlığına etkisi incelenmiştir. Homojenize edilen polimer çözeltileri 24 gözlü plakalara dökülerek -20°C'de 24 saat dondurulmuş ve 48 saat -46°C'de liyofilize edilmiştir. Liyofilizasyon yöntemi ile gözenekli doku iskeleleri üretilmiştir. Elde edilen doku iskeleleri morfolojik, mekanik ve fiziksel olarak karakterize edilerek çalışmada kullanılacak en uygun homojenizasyon sistemi belirlenmiştir.

3.5. Doku İskelelerinin Karakterizasyonu

3.5.1. Doku iskelelerinin Morfolojilerinin SEM Analizi ile İncelenmesi

SEM analizi ile hazırlanan sünger yapıdaki doku iskelelerinin morfolojileri, mikroyapısı ve gözenek boyutu belirlenmiştir. Farklı homojenizasyon tekniklerinin düşük molekül ağırlıklı kitosan ve POSS nanokafes katkısı içeren kompozit

süngerlerin gözenek yapısına ve gözenekler arasındaki duvarlara etkisi gözlenmiş ve ortalama gözenek çapları hesaplanmıştır. Bunun yanısıra, elektrosprey yöntemi ile nanokürelerle kaplanan doku iskelelerinin morfolojisi incelenmiştir. Örnekler analiz öncesinde argon gazı altında altın ile kaplanmıştır.

SEM analizi ile elde edilen nanokompozit doku iskelelerinin gözenek ve duvar yapıları incelenmiş, ortalama gözenek boyutları Image J programı kullanılarak hesaplanmıştır. Bunun yanısıra, farklı homojenizasyon tekniklerinin yapıya etkisi incelenmiştir.

3.5.2. Doku İskelelerinin Sıvı Değişim Yöntemi ve Bilgisayarlı Mikro Tomografi (Mirko CT) Analizi ile Gözeneklilik Ölçümü

Sıvı değişim yönteminde etanol (100%) kullanılmıştır. Doku iskeleleri belirli hacimde etanol (V_1) içeren mezürlere atılmıştır. Etanol içindeki doku iskeleleri vakumlu etüvde bekletilerek doku iskelesi içindeki hava boşaltılarak yapı içine etanol dolması sağlanmıştır. Daha sonra doku iskelesi ile taşan hacim (V_2) ve doku iskeleleri çıkarıldıktan sonra azalan hacim (V_3) üzerinden aşağıda belirtilen denklem kullanılarak açık gözeneklilik ölçümü yapılmıştır.

$$\varepsilon = (V_1/V_3)/(V_2 - V_3) \quad (\text{Denklem 9})$$

Üretilen doku iskelelerinin 3 boyutlu analizi bilgisayarlı mikro tomografi yöntemi kullanılarak yapılmıştır (Scanco- μ CT50 (Scanco Medicals, İsviçre). Taramalar 45 kVp ve 88 uA ile gerçek çözünürlükte yapılmıştır.

3.5.3. Doku İskelelerinin Mekanik Özelliklerinin Belirlenmesi

Doku iskelelerinin mekanik özellikleri basma testi ile belirlenmiştir. Bu testte elde edilen datalar mekanik güç ve basma modülü (elastisite modülü) ölçülmüştür. Mekanik güç, mekanik işin hızını belirleyen fiziksel bir nicelik olarak tanımlanmaktadır. Basma kuvveti, malzeme ile aynı doğrultuda kuvvetin malzeme üzerine basma etkisi olacak şekilde uygulanması sonucunda malzemenin kırılmadan dayanabildiği maksimum gerilme olarak tanımlanır. Elastisite modülü de, malzemenin mekanik bir özelliğidir ve rijitlikle ilişkilidir. Malzemenin elastik bölgede gerilme ve uzaması ile ilişkilidir. Elastisite modülü ne kadar büyükse malzeme o kadar rijittir ve elastik birim şekil değiştirmesi ise o kadar küçüktür. Hazırlanan kitosan/POSS nanokompozit doku iskelelerinin mekanik özelliklerini belirlemek için basma testleri ASTM D 5024 standardına göre yapılmıştır. Basma testinde, 5 kgf yük hücresi ile 3 mm/dk hızla



basma uygulanmıştır. Basma testi ile farklı homojenizasyon tekniklerinin doku iskelelerinin basma dayanımı ve modulus değerleri üzerindeki etkisi belirlenmiştir.

3.5.4. Doku İskelelerinin Sıvı Absorpsiyon Kapasitelerinin Belirlenmesi (Şişme Testi)

Biyomalzemelerin doku ile teması sırasında ilk olarak vücut sıvısını absorplayarak, sıvı ya da kan içindeki proteinlerin malzeme yüzeyine tutunması gerekmektedir. Protein tutunumu ile yüzeyde hücre tutunumu ve proliferasyonu sağlanmaktadır. Malzemelerin sıvı absorpsiyon kapasitelerinin belirlenmesi için 1XPBS ile şişme testleri yapılmıştır. Şişme testinde PBS içinde 24 ve 48 saat 37°C'de inkübe edilen örneklerin ağırlık değişimleri ölçülerek şişme oranları belirlenmiştir. Doku iskelelerinin 1M NaOH çözeltisi ile 30 dk inkübe edilerek nötralizasyonu sonrasında şişme oranları belirlenmiştir. Nötralizasyon ile kitosanın yapısındaki aktif uçlar kapatılmaktadır.

3.5.5. Fourier Transform Infrared Spektroskopi (FT-IR) Analizi

Doku iskelelerini oluşturan kitosan polimer matriks ve POSS nanopartiküllerin yapı içindeki kimyasal bağlarının belirlenmesi için fourier transform infrared spektroskopi (FTIR) analizi gerçekleştirilmiştir. POSS nanopartikülleri toz halinde incelenerek karakteristik pikleri belirlenmiştir. Farklı homojenizasyon teknikleri ile hazırlanan kitosan/POSS nanokompozit doku iskelelerinde, POSS nanokafes yapıların polimer yapı ile etkileşimi FTIR analizi ile karakteristik pikler incelenerek belirlenmiştir.

3.5.6. Doku İskelelerinin Biyobozunum Davranışının İncelenmesi

Kitosan biyobozunur özellikte doğal bir polimer olması nedeniyle vücut sıvısı ortamı içinde biyobozunma davranışının incelenmesi ve biyobozunma oranının belirlenmesi gerekmektedir. Hazırlanan nanoküre kaplı kitosan/POSS nanokompozit doku iskelelerinin biyobozunum davranışı lizozim enzimi varlığında hazırlanan 1X PBS çözeltisi içinde inkübe edilerek incelenmiştir. Doku iskeleleri bozunum sıvısı içinde 7,14, 21 ve 28 gün inkübe edilen örneklerin kurutularak zamana karşı ağırlık ölçümü yapılmıştır. Deney öncesi ve sonrasında farklı inkübasyon günlerinde doku iskelelerindeki ağırlık azalması incelenerek % ağırlık kaybı hesaplanmıştır.

3.5.7. Biyomineralizasyon Testi

Mineralizasyon kemik doku oluşumunun en önemli göstergesidir. Bu test ile malzemenin yapısının ve yüzeyinin kemik hücrelerinin mineral oluşturmaya uygun olup olmadığı incelenmiştir. Kitosan/POSS kompozitlerin yüzeyinde mineralizasyon oluşumunu gözlemek için malzemeler modifiye SBF içinde 21 gün, 10x SBF içinde ise 14 gün boyunca 37°C'de çalkalamalı inkübatörde tutulmuştur. Malzemelerin mineralizasyon kapasitesi SBF kompozisyonundaki minerallerin yüzeyde oluşturduğu kalsiyum-fosfat birikimi ile belirlenmiştir. SEM analizinde Backscatter modunda görüntülenen doku iskelesi yüzeylerinde inorganik kalsiyum (Ca) ve fosfat (P) minerallerinin birikimi gözlemlenmiş ve yüzeyde EDX analizi yapılarak kantitatif Ca/P oranı belirlenmiştir. Aynı zamanda XRD analizi kullanılarak yüzeyde oluşan Ca-P oluşumunun karakteristik pikleri belirlenmiştir.

3.5.8. Antibiyotik Yüklü Kitosan/Kil Nanoküre Kaplı Doku İskelelerinden *In Vitro* Salım Profilinin İncelenmesi

Doku iskeleleri üzerine püskürtülmek için, nanokürelerin enkapsülasyon verimi ve salım profili göz önünde bulundurularak vankomisin ve gentamisin yüklü nanoküre gruplarından birer ilaç konsantrasyonu seçilmiştir. Vankomisin yüklü gruplardan 8:1, gentamisin yüklü gruplardan ise 20:1 polimer:ilaç oranı seçilmiştir.

Antibiyotik içeren kitosan-kil nanoküre çözeltileri, mikroakışkanlaştırıcıdan geçirildikten sonra elektrosprey yöntemi ile küre formunda, kollektör yüzeyine sabitlenen doku iskelelerinin üzerine kaplanmıştır. Nanoküre kaplı doku iskelelerinden vankomisin ve gentamisin salım çalışmaları, 37°C'de, fosfat tamponunda (1xPBS, pH=7.4) ve 50 rpm karıştırma hızında inkübe edilerek incelenmiştir. Belirlenen periyotlarda örnek alınarak salım sıvıları spektrofotometrik olarak ölçülmüştür. UV-VIS spektrofotometre (Varioskan) ile okutulan salım sıvılarından antibiyotik miktar tayini yapılmıştır. Salım sıvısındaki miktar tayini, antibiyotik yüklü kitosan-kil nanokompozit küre salım çalışmalarında kullanılan antibiyotik kalibrasyon eğrilerine göre belirlenmiştir.

3.5.9. Antibiyotik Yüklü Kitosan/Kil Nanoküre Kaplı Doku İskelelerinin Antimikrobiyal Aktivitelerinin Belirlenmesi

Antibiyotik yüklü kitosan/kil nanoküre kaplı doku iskelelerinin antimikrobiyal aktivitesi *Staphylococcus aureus* (Gram-pozitif) ve *Echerichia coli* (Gram-negatif) mikroorganizmaları üzerinde denenmiştir. Mikroorganizmaların Nutrient Broth içerisinde 24 saat 37°C'de aktive edilmiş kültürleri kullanılmıştır. Mikroorganizma konsantrasyonu 0.5 McFarland'a ayarlanmış ve steril swaplar yardımıyla besiyeri



üzerine ekim yapılmıştır. Antimikrobiyal etkisi incelenecek doku iskeleleri, yüzeyleri 10 µl 1xPBS ile ıslatılarak bakteri ekimi yapılan petri kaplarına yerleştirilmiştir. Malzemelerin bakterilere olan etkisi ve zon oluşumu 24 saatlik inkübasyon sonunda incelenmiştir. Çalışmada pozitif kontrol grubu olarak amoksisilin antibiyotik diskler kullanılmıştır.

3.5.10. Antibiyotik Yüklü Kitosan/Kil Nanoküre Kaplı Doku İskelelerinin Biyobozunumu

Nanoküre kaplı doku iskeleleri lizozim içeren 1x PBS çözeltisi içerisinde inkübe edilerek zamana karşı ağırlık değişimi ölçümleri yapılmıştır. Deney öncesinde kuru örneklerin ağırlık ölçümleri yapılmış ve sonrasında örnekler 1x PBS çözeltisi içinde 37°C'de inkübe edilmiştir. Degredasyon sıvısı içinde 7,14, 21 ve 28 gün inkübe edilen örnekler yıkanıp kurutulularak zamana karşı ağırlık ölçümü yapılmıştır. Bu yöntemle doku iskelelerinin bozunma yüzdesi hesaplanmıştır.

3.6. In vitro Hücre Kültürü Çalışmaları

3.6.1 Hücre kültivasyonu

In vitro hücre kültürü çalışmaları kemik ve kırıldak rejenerasyonuna yönelik olmak üzere iki aşamada gerçekleştirilmiştir. Kemik doku için model hücre olarak Saos-2 hücre hattı kullanılmıştır. Saos-2 hücre hattının belirlenmesinde, ALP aktivitesi ve mineralizasyon kapasitesiyle normal kemik hücrelerine daha çok benzerlik göstererek farklılaşma sağlaması göz önünde bulundurulmuştur. Saos-2 hücre hattı %10 FBS içeren DMEM ortamında (penisilin-streptomisin, L-glutamin) 37°C'de %5 CO₂'li ortamda kültive edilmiştir. Saos-2 hücrelerinin doku iskelesi üzerindeki ALP, osteokalsin sekresyonu ve mineralizasyonu ise hazırlanan osteojenik ortam (DMEM, L-askorbik asit, β-gliserofosfat) ile kültivasyon yapılarak incelenmiştir. SW 1353 hücre hattı kırıldak rejenerasyonuna yönelik biyomalzeme çalışmalarında model hücre olarak kullanılmaktadır. SW 1353 hücreleri de %10 FBS içeren DMEM ortamında (penisilin-streptomisin, L-glutamin) 37°C'de %5 CO₂'li ortamda kültive edilmiştir.

3.6.2 In vitro Sitotoksitenin Belirlenmesi

Doku iskelelerinin Saos-2 hücreleri üzerinde toksik bir etki göstermediğini belirlemek için ISO-10993-5 standardında belirtilen indirek ekstraksiyon yöntemi kullanılarak, 24, 48 ve 72 saat inkübasyon sürelerinde hücre canlılığı gözlemlenmiştir. 96 gözlü plakalara Saos-2 hücreleri (10⁴ hücre/göz) ekilerek ekstraksiyon ortamları ile 72 saat inkübe edilmiştir. Ekstraksiyon ortamlarının etkisini belirlemek amacıyla negatif kontrol grubu sadece DMEM ortamı ile inkübe edilmiş, negatif kontrol



kullanılarak % canlılık değerleri hesaplanmıştır. Sitotoksinite testleri WST-1 canlılık kiti (Biovision) kullanılarak gerçekleştirilmiştir.

3.6.3 Saos-2 ve SW1353 Hücrelerinin Doku İskelesi Üzerinde Tutunumu

Doku iskelesi yüzeyindeki hücre-malzeme etkileşiminin gözlenmesi için Saos-2 hücreleri doku iskelesi yüzeyine ekilerek 3 ve 7 gün kültive edilmiştir. Daha sonra malzemeler üzerindeki hücreler %3,7 paraformaldehit ile fikse edilerek SEM analizi ve floresans mikroskobu ile gözlemlenmiştir. Floresans mikroskobu analizi için fikse edilen Saos-2 hücreleri DAPI (çekirdek) ve Alexa fluor 555 (membran-aktin filamentleri) boya ile boyanmıştır. SEM analizi için ise %3,7 PFA ile fikse edilen doku iskeleleri aşamalı olarak etanol serileri (%50,70,90,100) ile susuzlaştırılmıştır.

3.6.4 Doku İskelelerinde Saos-2 ve SW1353 Hücrelerinin Proliferasyonu

Doku iskeleleri üzerine ekilen Saos-2 hücrelerinin 28 gün boyunca proliferasyonu WST-1 canlılık kiti kullanılarak, absorbans değeri 440nm'de spektrofotometrik ölçüm yapılarak belirlenmiştir. WST-1 ile inkübe edilen doku iskeleleri spektrofotometrik ölçüm sonrasında 1x PBS ile yıkanmış ve tekrar kültür ortamı ile inkübe edilmiştir.

3.6.5 Doku İskelelerinde Saos-2 ve SW 1353 Hücrelerinin Farklılaşma Düzeylerinin İncelenmesi

Doku iskelelerinde 28 gün boyunca kültive edilen Saos-2 hücrelerinin erken dönem ve geç dönem farklılaşma markerlarının sekresyonu alkalen fosfat (ALP) aktivitesi ve osteokalsin miktarı ile belirlenmiştir. Ayrıca inkübasyonun son aşamasında Saos-2 hücrelerinin biyomineralizasyonu von Kossa ve Alizarin Red S boyamaları yapılarak belirlenmiştir. Von Kossa boyaması ile fosfat grupları belirlenmiş, Alizarin Red S boyaması ile kalsiyum birikimi gözlenmiştir. Boyanan doku iskelelerindeki biyomineralizasyon kalitatif olarak incelendiği için, Alizarin Red S ekstraksiyonu yapılarak doku iskelelerinde CaP birikimi yarı-kantitatif olarak belirlenmiştir. Saos-2 hücrelerinin osteojenik ortam varlığında doku iskeleleri üzerindeki ekstraselüler ALP aktivitesi kolorimetrik ALP aktivite kiti (Colorimetric ALP Assay Kit, Abcam) ile 7,14,21 ve 28. günlerde ölçülmüştür. Kullanılan kit p-nitrofenil fosfat (pNPP)' in ALP enzimi ile defosforile edilmesiyle oluşan renk değişimini spektrofotometrik olarak ölçmektedir (OD:405nm). Saos-2 hücrelerinin osteojenik ortam varlığında osteokalsin sekresyonu ise kültür ortamının 21. ve 28. günlerinde



İnsan OC/BGP (osteokalsin) Sandwich ELISA kiti (Elabscience Human OC/BGP) kullanılarak ölçülmüştür.

SW 1353 hücrelerinde ise total kolajen miktarının belirlenmesi için kullanılan hidroksiprolin sekresyonu kolorimetrik hidroksiprolin testi (Elabscience-HP) ile ve sülfatlanmış glikozaminglikan miktarı ise GAG analizi (Amsbio) ile spektrofotometrik olarak belirlenmiştir. Asit hidroliz metodu ile üretilen kolajen parçalanarak ortaya çıkan hidroksiprolin 550 nm de spektrofotometrik olarak ölçülmüştür. Glikozaminglikanlar arasında hyaluronik asit, dermatan sülfat, heparin ve kıkırdak doku oluşumunda önem teşkil eden kondrotin sülfat bulunmaktadır. Bu yüzden kıkırdak hücreleri için metakromatik boyama ile tespit edilen GAG birimleri spektrofotometrik olarak ölçülmüştür.

3.6.6 Doku iskelelerinin Histolojik Analizleri

Doku iskeleleri histokimyasal incelemeler için %4'lük paraformaldehit içerisinde 30dk bekletilerek fiske edilmiştir. Dehidratasyon amacıyla sırasıyla %70, %80 ve %96'lık etil alkol serilerinde 20'şer dakika; ardından 4 farklı aseton serisinde 20'şer dakika tutulan doku iskeleleri şeffaflaştırma amacıyla 30'ar dakika iki farklı ksilene tabi tutulmuştur. 1'er saatlik 2 kez yumuşak parafin ile immersiyon sağlandıktan sonra doku iskeleleri sert parafin bloklar içerisine gömülmüştür. En son aşamada doku iskelelerinden rotary mikrotom (RM 2255, Leica) aracılığı ile 5µ kalınlığında kesitler alınmıştır. Doku iskeleleri hematoksilin-eozin, masson trikrom, periyodik asit schiff (PAS), alsiyen mavisi ile boyanarak incelenmiştir. Boyama protokolleri aşağıda ayrıntılı bir şekilde verilmiştir.

Hematoksilen-Eozin Boya Protokolü

Alınan kesitler deparafinizasyon işlemi için 1 gece 60°C'lik etüvde tutulmuştur. Ardından ilki 20 dakika (etüvde) diğer ikisi 10'ar dakikalık üç farklı ksilene tabi tutuldu. Daha sonra dehidratasyon işlemi için 5 değişim azalan alkol serilerinden geçirilmiş, kesitler distile su ile çalkalandıktan sonra 10 dakika hematoksilin (01562E, Surgipath, Bretton, Peter Borough, Cambridgeshire) ile boyanmıştır. Boyamanın ardından, boyanın fazlasının dokudan uzaklaştırılması için 10 dakika akarsuda yıkanan kesitler, 2 dakika eozin (01602E, Surgipath, Bretton, Peter Borough, Cambridgeshire) boyası ile boyanmıştır. Boyamadan sonra sırasıyla %70, %80, %96 ve 2 seri absölü alkolden geçirilen kesitler şeffaflaştırma amacıyla 20'şer dakika üç değişim ksilende tutulduktan sonra entellan (UN 1866, Merck, Darmstadt, Germany) ile kapatılmıştır.

Masson Trikrom Boya Protokolü

Deparafinizasyon için 1 gece 60°C'lik etüvde bekletilen kesitler üç farklı ksilende tutulmuş, daha sonra azalan alkol serilerinden geçirilmiştir. Distile suda çalkalandıktan sonra masson trikrom boyama seti (2049 GBL, İstanbul, Türkiye) içerisinde dokular üzerine 4 damla weigert hematoksilen boyası ile 4 damla ferrik klorür çözeltisi damlatılmış ve 10 dakika bekletilmiştir. Distile su ile yıkandıktan sonra kesitlere uygulanan 2 damla asit-alkol çözeltisi 4 dakika sonra uzaklaştırılmıştır. Ardından 2 damla ponceau asit fuksin azofloksin çözeltisi dokunun üzerini tamamen kaplayacak şekilde uygulanmış, 4 dakika bekletilen kesitler distile su ile yıkanmıştır. Daha sonra 2 damla fosfomolibdik asit turuncu G boyası ile 10 dakika muamele edildikten sonra uzaklaştırılmış ve 8 damla açık yeşil boya ile 5 dakika boyanmıştır. Boyamanın ardından distile su ile yıkanan kesitler artan alkol serilerinden geçirilmiştir. Ksilene ile şeffaflaştırma yapıldıktan sonra entellan ile kapatılmıştır.

Periyodik Asit Schiff (PAS) Boya Protokolü

Alınan parafin kesitler deparafinizasyon işlemi için 1 gece 60°C'lik etüvde bekletilmiştir. Ardından ilki 1 saat (etüvde) diğer ikisi 30'ar dakikalık üç farklı ksilene tabi tutulmuştur. Daha sonra dehidratasyon işlemi için azalan alkol serilerinden geçirilip, distile su ile çalkalandıktan sonra 10 dakika periyodik asit ile muamele edilmiştir. Ardından 10 dakika akarsuda bekletilen kesitler distile suda çalkalanıp kurutulduktan sonra 20 dakika schiff reagent ile muamele edilmiştir. Sonrasında 10 dk akarsuda yıkanmıştır. Daha sonra dehidratasyon işlemi için artan alkol serilerinden geçirilen kesitler şeffaflaştırma amacıyla 20'şer dakika üç değişim ksilende tutulduktan sonra entellan (UN 1866, Merck, Darmstadt, Germany) ile kapatılmıştır.

İmmünohistokimyasal Boya Prosedürü (Tip 1 ve Tip 2 kolajen)

Alınan kesitler öncelikle 60°C'lik etüvde 1 gece bekletildi daha sonra şeffaflaştırma amacıyla 30'ar dakika üç değişim ksilole tabi tutulmuştur. Azalan alkol serilerinden geçirilip distile suda çalkalanmıştır. Suyu uzaklaştırılan dokuların etrafı pappen ile çizildi. Ardından dokular 15 dakika 37°C de Tripsin ile muamele edilerek. 3 kez fosfat tamponlu saline (PBS) ile yıkanmış, kesitler 10 dk hidrojen peroksit ile oda ısısında muamele edilmiştir. Daha sonra kesitler tekrar PBS ile yıkanmış ve 1 saat bloklama solüsyonu (TA125-UB, Lab Vision, Fremont, CA) ile bekletilmiştir. Primer antikör rat spesifik anti- tip 1 kollajen ve anti- tip 2 kollajen antikoru ile + 4°C' de 1 gece bekletilmiştir. Ertesi gün PBS ile yapılan yıkamadan sonra anti-mouse biotin-streptavidin hidrojen peroksitaz ikincil antikoru (85-9043 Zymed Histostain Kit, San Francisco, USA) ile 30 dakika bekletilmiştir. PBS ile tekrar yıkanan kesitler



oluşturulan immunohistokimyasal reaksiyonun görünürlüğü saptamak amacıyla diaminabenzidinamine (DAB) (Roche, Germany) ile muamele edilmiştir. Distile su ile yıkanan kesitlere mayer's hematoksilen ile artalan boyaması sağlandıktan sonra akarsu ile yıkanmıştır. Artan alkol ve ksilol serilerinden geçirildikten sonra entellan (UN 1866, Merck, Darmstadt, Germany) ile kapatılmıştır.

4.SONUÇLAR

4.1 Antibiyotik Yüklü Kitosan/Kil Nanokürelerin Üretimi

4.1.1 Mikrofluidizer Çalışma Parametrelerinin Optimizasyonu

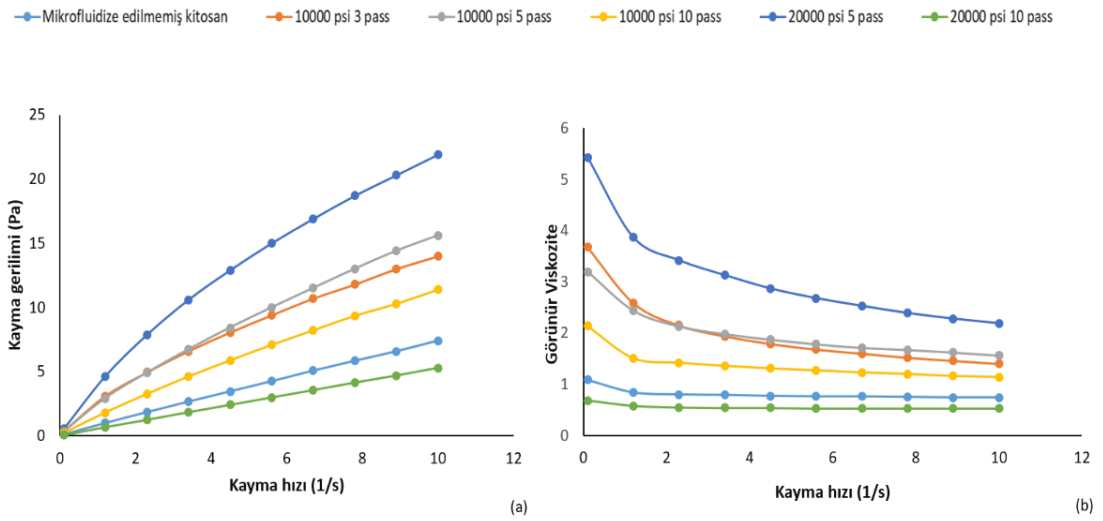
Doğal polimerler ile çalışılırken, iyi bir karıştırma amacı ile uygulanan homojenizasyon işlemleri polimer zincirlerinde kırılma ve dolayısı ile moleküler ağırlıkta azalmaya neden olabilmektedir. Bu nedenle, mikrofluidizer işleminde homojenizasyon koşulları belirli bir basınç ve döngü aralığında tutulmuştur. Bu basınç ve döngü değerlerinde polimer yapısındaki değişim viskozite ve moleküler ağırlık hesaplamaları ile belirlenmiştir. İlk olarak polimerin reolojik özellikleri incelenmiştir. Reoloji çalışmalarında sadece yüksek moleküler ağırlıklı kitosan incelenmiştir. Öncelikle intrinsik viskozite ölçümleri yapılmış ve ardından moleküler ağırlıkları hesaplanarak nanoküre ve doku iskelesi üretiminde kullanılacak homojenizasyon parametreleri belirlenmiştir.

4.1.2 Kitosan Çözeltilerinin Reolojik Özelliklerinin Belirlenmesi

Yüksek basınçlı homojenizasyon (Mikrofluidizer) işleminin kitosan çözeltisinin reolojisi üzerindeki etkileri HAAKE-MARS reometre ile incelenmiştir. Şekil 3'te homojenizasyon işlemine tabi tutulmamış ve farklı parametrelerde mikrofluidize edilmiş kitosan çözeltilerinin reolojik özellikleri verilmiştir. Grafiklerde görüldüğü üzere, mikrofluidizer işlemine tabi tutulmuş kitosan çözeltilerinin akışkan viskoziteleri kayma hızı arttıkça azalmaktadır. Malzemenin reolojik davranışı üstel kural modeline önemli ölçüde uyum sağlamıştır ($R^2 > 0.99$) (Tablo 9). Üstel kural modeline göre bulunan akış davranış indeksi değerlendirildiğinde çözelti, genellikle polimerik çözeltilerde görüldüğü üzere psödoplastik (shear-thinning) davranış göstermiştir ($n < 1$) (Geankoplis, 2003).

Kayma gerilimi ve görünür viskozite değerleri incelendiğinde, mikrofluidizer yöntemi, malzemenin reolojik özelliklerinde değişime sebep olduğu gözlenmiştir. Sonuçlar incelendiğinde, mikrofluidizer basıncının çözelti viskozitesini belirgin derecede düşüren önemli bir parametre olduğu görülmüştür. Viskozite düşüşünün

nedeni, polimer zincirlerinin parçalanması, konformasyonel değişimi ve diğer kitosan-asetik asit çalışmalarında da görüldüğü üzere yüksek basınca bağlı olarak molekül ağırlığında meydana gelen azalma ile ilişkilendirilebilir (Vargas ve ark., 2011; Bonilla ve ark., 2012; Perdones ve ark., 2012). 10000 psi basınç koşullarında 3 ve 5 döngü sayısı ile homojenize edilen çözeltiler birbirlerine benzer davranış göstermektedir. 20000psi basınç koşullarında mikrofluidizer ile homojenizasyon uygulandığında, polimer çözeltisinin moleküler yapısında önemli ölçüde değişim görülmüştür. Azalan viskozite nedeniyle, 20000 psi basınç koşullarında işlem gören çözeltilerden elektrosprey yöntemi ile küre elde edilememiştir.



Şekil 3. Kitosan çözeltilerinin akış (a) ve viskozite (b) eğrileri.

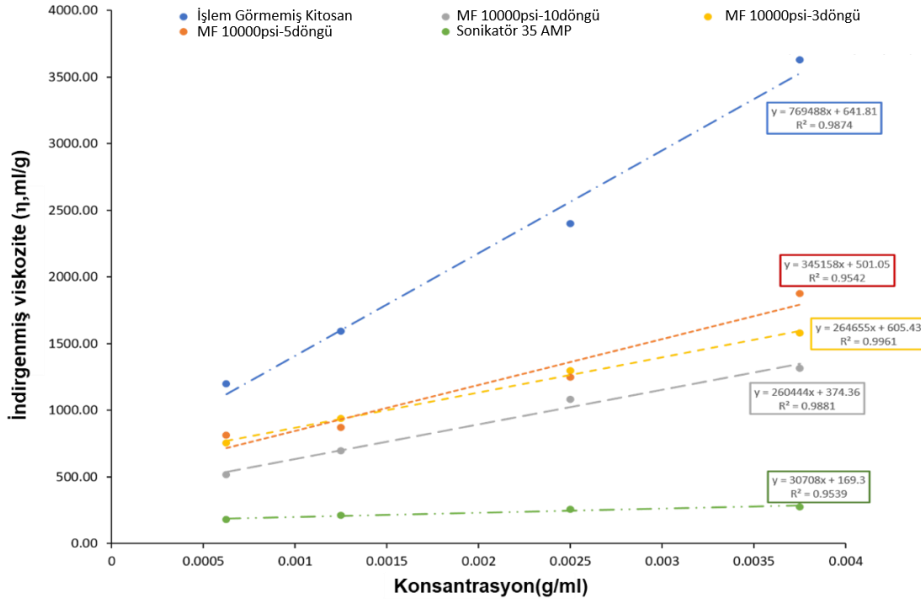
Tablo 9. Kitosan çözeltilerinin üstel kural parametreleri ($\tau = K \cdot \dot{\gamma}^n$)

Gruplar	K	n	R ²
Mikrofluidize edilmemiş kitosan	4.461	0.6957	0.9994
MF-10000psi 3döngü	2.763	0.7083	0.9999
MF-10000psi 5döngü	2.561	0.7891	0.9999
MF-10000psi 10döngü	1.641	0.8446	0.9999
MF-20000psi 5döngü	0.841	0.9439	1
MF-20000psi 10döngü	0.562	0.9717	1

4.1.3 Kitosan Çözeltilerinin Viskozite Ölçümü ve Moleküler Ağırlıklarının Belirlenmesi

Mikrofluidizer ile ön işlem görmüş kitosan çözeltilerinin viskozite ölçümü Oswald viskozimetresi ile yapılmış ve materyal metod kısmında, 2.1.3 alt başlığında verilen denklemler kullanılarak hesaplanmıştır. Şekil 4'te işlem görmemiş ve farklı mikrofluidizer şartları uygulanmış örneklerin indirgenmiş viskozite değerleri gösterilmiştir. Buradan elde edilen gerçek viskozite değerleri ile Denklem (6) kullanılarak molekül ağırlıkları hesaplanmıştır. Viskozite çalışmalarında işlem görmemiş, klasik sonikasyon ve mikrofluidize edilerek homojenizasyon işlemine tabi tutulmuş yüksek molekül ağırlıklı kitosan çözeltilerinin viskozite ve moleküler ağırlıkları hesaplanmış (Şekil 4 ve Tablo 10) ve yöntemlerin ortalama molekül ağırlığına olan etkileri karşılaştırılmıştır. Görüldüğü üzere, işlem görmemiş yüksek moleküler ağırlıklı kitosan çözeltisinin molekül ağırlığı 141.75 kDa olarak bulunmuştur. Sonikasyon işlemine tabi tutulmuş çözeltinin molekül ağırlığında ise ciddi bir düşüş gözlenmiştir (23.52 kDa). Mikrofluidizer sisteminde ise molekül ağırlığı 68.5 - 131 kDa aralığında bulunmuştur. Proseste döngü sayısı arttıkça polimer çözeltinin moleküler ağırlığında azalma meydana gelmektedir. 10000 psi-10 döngü çalışma parametresinde moleküler ağırlığı 68.55 kDa olarak bulunmuştur. Kitosanın molekül ağırlığındaki bu azalmadan dolayı döngü sayısının 10'dan daha düşük olması gerektiği saptanmıştır. Molekül ağırlığı, 10000psi 3 döngü koşullarında 131 kDa, 5 döngü koşullarında 101.53 kDa olarak hesaplanmıştır. Bu çözeltilerden elektrosprey yöntemi ile küre üretildiğinde ve SEM görüntüleri incelendiğinde, yapıda küresellikten sapma ve kürelerin etrafında fiberleşme meydana gelmiştir. Bu yüzden, 10000 psi 3 döngü parametresi üretim için uygun bulunmamıştır. Buna karşı, 10000psi 5 döngü koşullarında, düzgün yapıda ve pürüzsüz yüzeye sahip küreler elde edildiği gözlenmiştir. **Bu nedenle, en uygun çalışma parametresi 10000 psi 5 döngü olarak belirlenmiştir.** Bu şartlar altında üretilen nanokürelerin karakterizasyonu yapılmıştır.

Literatür çalışmaları incelendiğinde, kitosan polimeri ile yapılan homojenizasyon çalışmalarında döngü sayısı ve basınç parametrelerinin kitosanın molekül ağırlığını etkileyen önemli parametreler olduğu bulunmuştur. Doğal yapısı nedeniyle, artan döngü sayısı ve basınç ile polimer zincirlerinde kırılmalar meydana gelmektedir. Bu nedenle homojenizasyon süresince basınç ve döngü sayısı belirli bir aralıkta tutulmalıdır. Çalışma basıncı, polimer moleküler ağırlığı üzerinde önemli ölçüde etkilidir. Kasaai ve ark. kitosan çözeltisini 3000-14000 psi basınçlarda 1-5 döngü sayısında mikrofluidizer işlemine tabi tutup, molekül ağırlığı üzerindeki değişimleri incelemiştir (Kasaai et al.,2003).



Şekil 4. Yüksek moleküler ağırlıklı kitosanın homojenizasyon sonrası konsantrasyona bağlı viskozite değişimi

Tablo 10. Yüksek moleküler ağırlıklı kitosan için gerçek viskozite ve moleküler ağırlık değerleri

	İşlem görmemiş kitosan	Sonikasyon	MF 10000 psi 3 döngü	MF 10000 psi 5 döngü	MF 10000 psi 10 döngü
Gerçek viskozite	641.81	169.3	605.43	501.05	374.36
Moleküler Ağırlık (kDa)	141.75	23.52	131.03	101.53	68.55

Tablo 11 ve 12'de ise mikrofluidizer ve farklı homojenizasyon tekniklerinin, doku iskelesi üretiminde kullanılacak olan düşük moleküler ağırlıklı kitosan çözeltilisinin moleküler ağırlık ve intrinsik viskozite değerleri üzerine etkileri gösterilmiştir. Şekil 5 ve 6'da öncelikle kitosanın farklı homojenizasyon teknikleri ve mikrofluidizer ile homojenizasyonu sonrasında belirlenmiş konsantrasyona bağlı indirgenmiş viskozite değerleri sırasıyla hesaplanmıştır. Doku iskelesi üretiminde kullanılan gruplar incelendiğinde, ultrasonik banyoda homojenize edilen (98.84 kDa) ve işlem görmemiş (91.34 kDa) kitosan çözeltilerinin moleküler ağırlıkları arasında

ciddi bir fark görülmemiştir. Sonikasyon işleminde farklı şiddetler kullanılmıştır. Her iki çalışma şiddetinde de sonikasyonun kitosanın moleküler ağırlığını önemli ölçüde azaltığı gözlenmiştir (30.24-22.21 kDa).

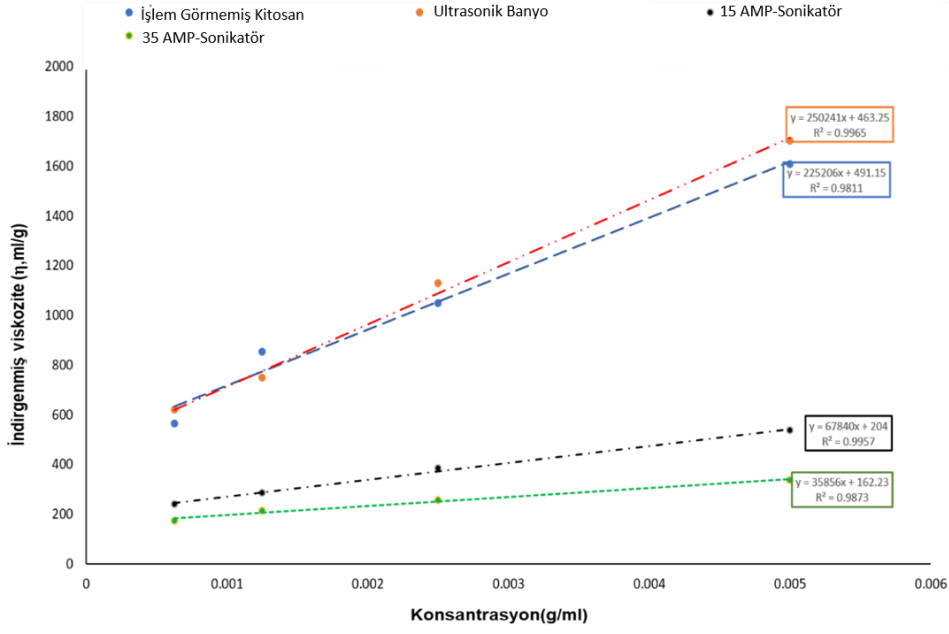
Tablo 11. Düşük moleküler ağırlıklı kitosanın farklı homojenizasyon yöntemleri sonrası gerçek viskozite ve moleküler ağırlık değerleri

	İşlem Görmemiş Kitosan	Ultrasonik Banyo	Sonikatör 15Amp.	Sonikatör 35Amp.
Gerçek viskozite	491.15	463.25	204	162.23
Moleküler Ağırlık (kDa)	98.84	91.34	30.24	22.21

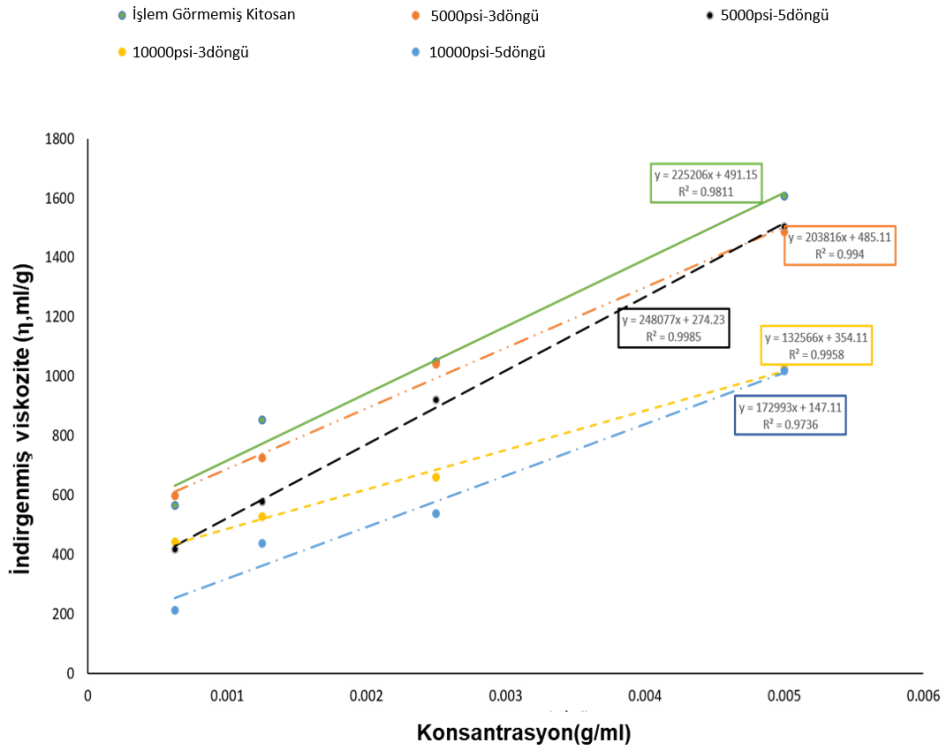
Tablo 12. Düşük moleküler ağırlıklı kitosanın mikrofluidize ile homojenizasyon sonrası gerçek viskozite ve moleküler ağırlık değerleri

	İşlem Görmemiş Kitosan	MF 5000psi- 3döngü	MF 5000psi- 5döngü	MF 10000psi-3 döngü	MF 10000psi- 5döngü
Gerçek viskozite	491.15	485.11	274.23	354.11	147.11
Moleküler Ağırlık (kDa)	98.84	97.20	45.06	63.60	19.46

Mikrofluidizer yöntemi ile işlem gören kitosan çözeltisinin indirgenmiş viskozite ve moleküler değerleri incelendiğinde (Şekil 6, Tablo 12), düşük basınçta (5000psi) ve düşük döngü sayısında (3 döngü) kitosanın molekül ağırlığında ciddi ölçüde bir değişim gözlenmemiştir. Bununla birlikte, basınç ve döngü sayısı arttıkça kitosanın molekül ağırlığında düşüş gözlenmiştir. Viskozite sonuçları değerlendirildiğinde, vizkosiye en az en az etki gösteren çalışma grubu **5000psi-3döngü** olarak belirlenmiştir.



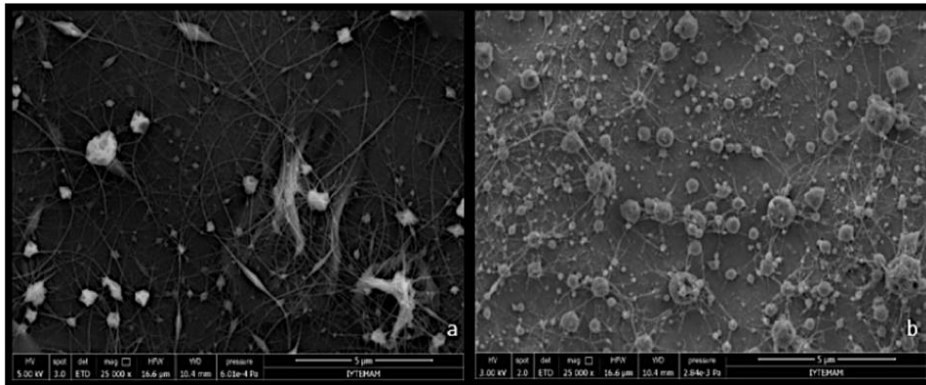
Şekil 5. Düşük moleküler ağırlıklı kitosanın farklı homojenizasyon yöntemleri sonrası konsantrasyona bağlı viskozite değişimi



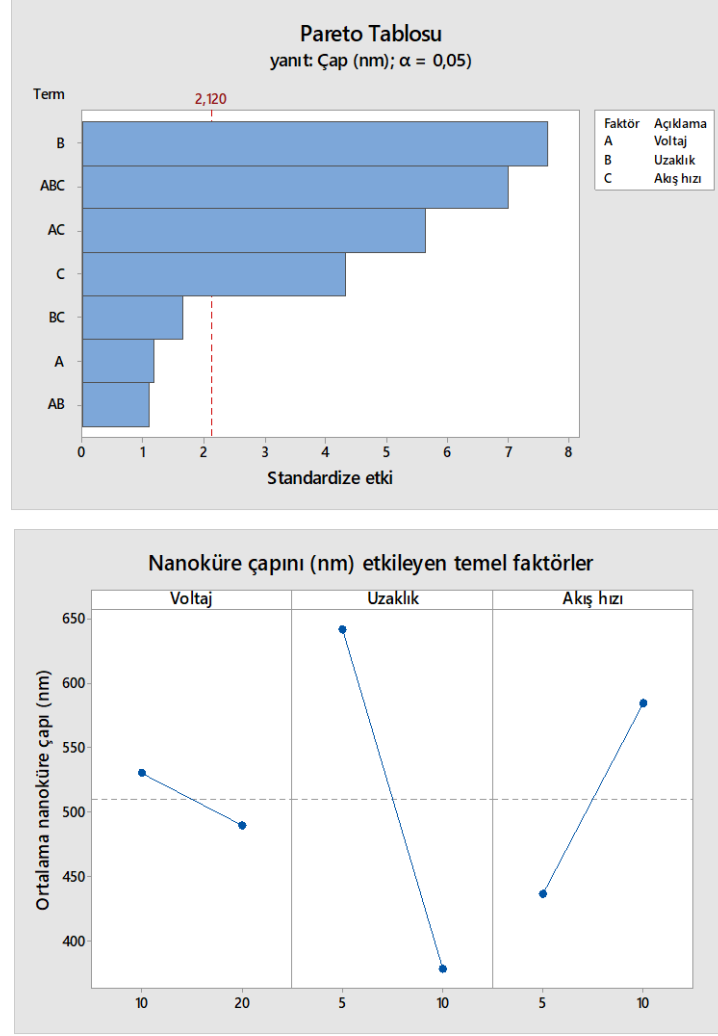
Şekil 6. Düşük moleküler ağırlıklı kitosanın mikrofludizer ile homojenizasyon sonrası konsantrasyona bağlı viskozite değişimi

4.1.4 Nanoküre Üretiminde Kullanılan Elektrosprey Parametrelerinin Belirlenmesi

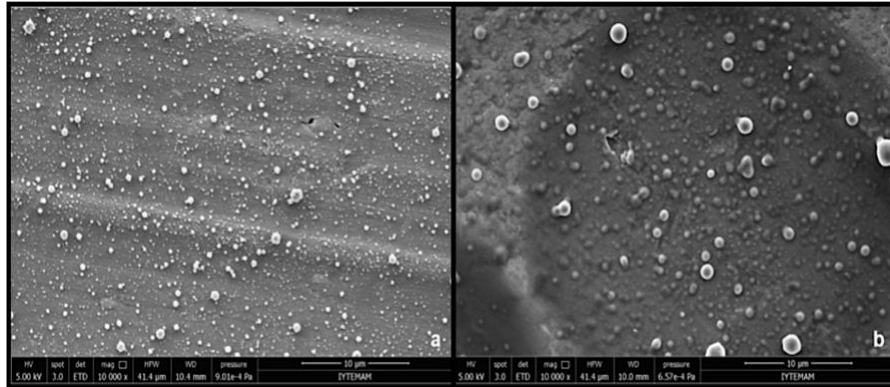
Elektrosprey yöntemi etken madde yüklü uniform dağılıma sahip mikro-nanoküre üretilmesi açısından avantajlı bir yöntemdir. Ancak, düzgün morfolojide ürün elde edilmesi için çalışma koşulları optimize edilmelidir. Bu nedenle, bu çalışmada istenilen morfoloji ve boyutta küre üretimi için elektrosprey proses parametreleri optimize edilmiştir. Ön çalışmalarda şırınga çapı değiştirilmiş, daha sonrasında ise voltaj, uzaklık ve akış hızı parametreleri optimize edilmiştir. Yapılan ön çalışmalar ile şırınga çapının malzeme morfolojisi üzerine etkileri belirlenmiştir. 18G kanül çapı ile hazırlanan örneklerde nanopartikül ve ağsı yapılar gözlemlenirken, 25G kanül çaplı malzemelerde küresel yapılar gözlemlenmiştir (Şekil 7). Buna bağlı olarak, diğer elektrosprey parametreleri (Voltaj, akış hızı ve uzaklık), 25G kanül çapı kullanılarak küre üretimi optimize edilmiştir. İki seviyeli faktöriyel tasarım yöntemi ile değişkenlerin nanoküre çapı üzerinde etkisi incelenmiştir (Şekil 8). Kolektör-şırınga mesafesindeki artış kürelerin boyutunu önemli ölçüde etkilemiştir. Elektrik alanına daha uzun süre maruz kalan küreler parçalanarak küçülmüştür. Bu nedenle, artan mesafe ile daha küçük çaplı ve birim zamanda daha fazla miktarda küre elde edilmiştir (Şekil 9). İstatistiksel analiz çalışmalarına göre (Şekil 8), elektrosprey yöntemi ile elde edilen kürelerin çapını etkileyen en önemli faktör uzaklık olarak bulunmuştur. Akış hızı ile çap arasındaki ters orantı literatür ile benzer bulunmuştur (Zhang ve Kawakami, 2010). Bu çalışmada voltaj, tek başına belirgin bir etki göstermemektedir (Şekil 8). Parametrik çalışmaların sonucunda, uniform küre yapısı ve ağsı yapılar oluşturmadan küre üretimini sağlayan elektrosprey parametreleri **20 kV voltaj, 10 cm uzaklık ve 5 ml/saat akış hızı** olarak belirlenmiştir.



Şekil 7. Kanül çapının malzeme morfolojisine etkisi: 18G (a); 25G (b)



Şekil 8. Nanoküre boyutları için ana etken grafikleri



Şekil 9. 20 kV ve 5ml/s çalışma koşulları ile üretilen kürelerde mesafenin boyut dağılımı üzerindeki etkisi: 10 cm (a), 5 cm (b).

4.1.5 Nanokürelere Yüklenen Antibiyotiklerin Çözünürlük Çalışmaları

Farklı konsantrasyonlarda hazırlanan antibiyotik çözeltileri absorbans verdikleri spesifik dalga boylarında spektrofotometrik olarak ölçülmüş ve elde edilen

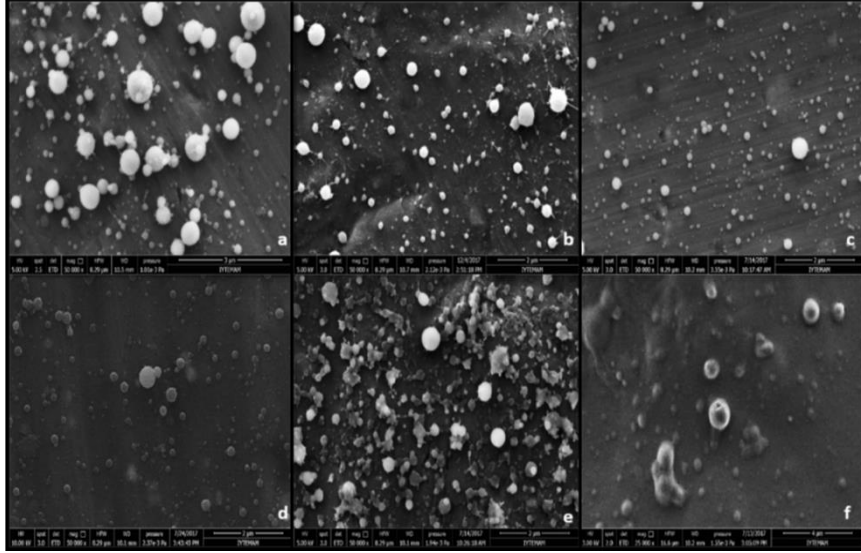
değerlerle kalibrasyon eğrileri çizilmiştir. Elde edilen kalibrasyon eğrileri kullanılarak gentamisin ve vankomisin maksimum çözünürlük değerleri belirlenmiştir. Gentamisin sülfat antibiyotiğinin maksimum çözünürlüğü 100 mg/ml, vankomisin hidroklorid antibiyotiğinin maksimum çözünürlüğü ise 50 mg/ml olarak bulunmuştur. İlaç taşıyıcı nanoküre üretiminde kullanılacak polimerik çözeltilere antibiyotikler eklenirken maksimum çözünürlük değerleri dikkate alınmıştır.

4.2. Antibiyotik Yüklü Kitosan/Kil Nanokürelerin Karakterizasyonu

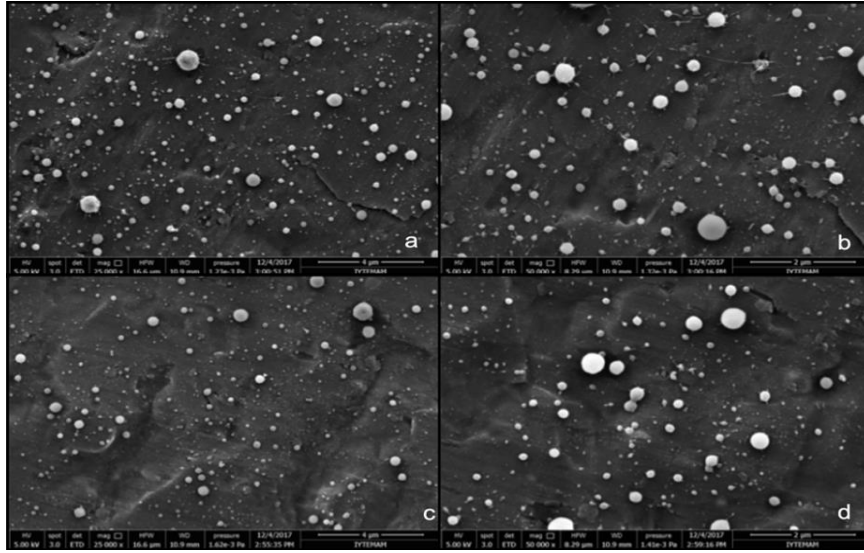
4.2.1 Nanoküre Morfolojisinin İncelenmesi

Çalışma kapsamında hazırlanan nanokürelerin morfolojileri SEM analizi ile incelenmiş, partikül boyutları ise DLS analizi ile belirlenmiştir. Homojenizasyon parametrelerinin belirlenmesi için yalnızca polimer özellikleri yeterli değildir. Kitosan-kil çözeltisi, farklı proses şartlarında homojenize edilip elektrosprey yöntemi ile nanoküre üretiminde kullanılmıştır. Farklı parametrelerde homojenize edilen kitosan-kil nanokürelerin morfolojileri SEM analizi ile incelenmiştir (Şekil 10). 10000 psi basınç koşulları ile homojenize edilen gruplarda homojen çap dağılımlı küreler elde edilmiştir. 20000 psi-5 döngü koşullarında homojenize edilen malzemelerde toplayıcı üzerinde jelleşen film formunda yapılar gözlemlenmiştir. 20000 psi basınç koşullarında döngü sayısının artmasıyla beraber küre formunda malzeme elde edilememiştir. Elektrosprey yöntemi ile uniform küre morfolojisine sahip olabilmek için viskozite değerinin spreysel uygulamalarına uygun olması gerekmektedir. Viskozitedeki belirgin düşüş, malzemenin elektrosprey yöntemi ile küre formunda elde edilmesine engel olmuştur. Polimer viskozitesi, molekül ağırlığı ve deasetilasyon derecelerinin yanı sıra morfoloji (SEM analizi) dikkate alındığında, ilaç yüklü kürelerin 10000 psi-5 döngü koşullarında homojenize edilmesine karar verilmiştir.

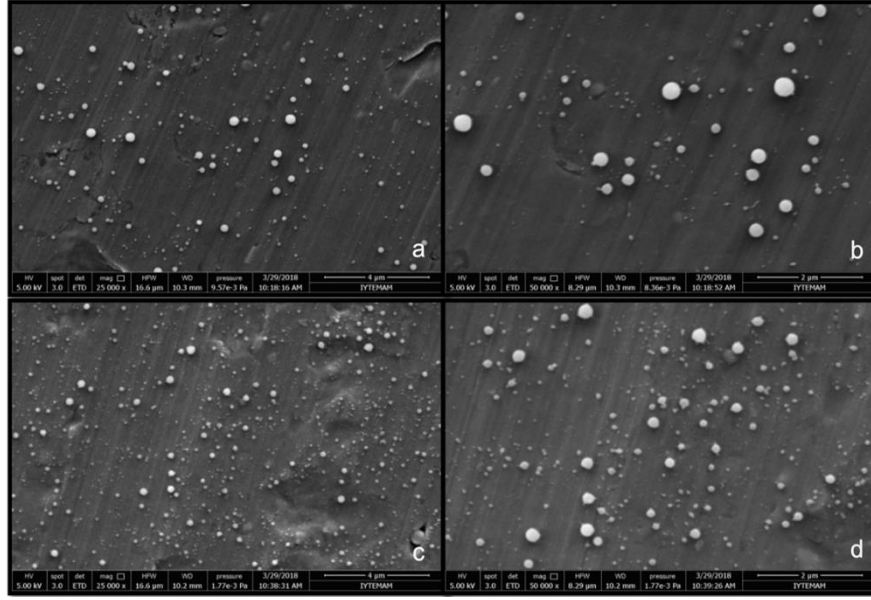
Vankomisin ve gentamisin yüklü küreler, model ilacın çözünürlüğü dikkate alınarak iki farklı polimer:ilaç oranlarında üretilmiştir. SEM analizi ile incelendiğinde; uniform dağılımlı nano ölçekli küreler başarı ile elde edilmiştir (Şekil 11&12)



Şekil 10. Kürelerin SEM görüntüleri: kitosan(a); kitosan-kil 10000 psi 3 döngü (b); kitosan-kil 10000 psi 5 döngü (c); kitosan-kil 10000 psi 10 döngü (d); kitosan-kil 20000 psi 5 döngü (e); kitosan-kil 20000 psi 10 döngü (f).

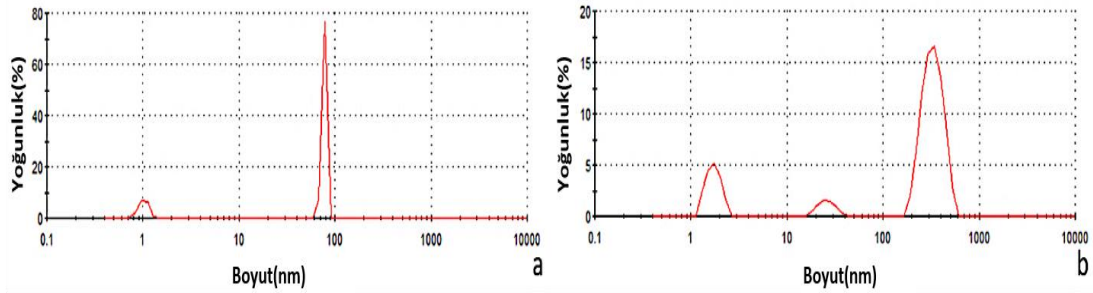


Şekil 11. Vankomisin yüklü kitosan-kil kompozit nanoküreler, polimer:ilaç oranı 4:1 (a,b); 8:1 (c,d).



Şekil 12. Gentamisin yüklü kitosan-kil kompozit nanoküreler, polimer:ilaç oranı 10:1 (a,b); 20:1 (c,d)

İlaç taşıyıcı nanoküre sistem morfolojisinin sıvı ortam içerisindeki stabilitesi, ilaç salım süresi üzerinde önemli ölçüde etkilidir. Malzemenin sıvı ortamda da belirli bir süre boyunca formunu koruyabilmesi gerekmektedir. DLS analizi ile kürelerin PBS ortamı (pH=7.4) içerisindeki hidrodinamik çapları ve polidispersite indeksleri belirlenmiştir (Tablo 13). Saf Kitosan küreler, stabil olmamaları nedeni ile zamana bağlı olarak parçalanma eğilimindedir. İlk taramada ortalama boyutları 77.9 nm (%83,8) olan küreler, sonraki taramalarda parçalanmış ve aglomere olarak büyük partiküller oluşturmuşlardır (Şekil 13). Bu nedenle, kil ilavesi (montmorillonite, MMT) ile kitosanın stabilitesi artırmak ve aynı zamanda daha kontrollü antibiyotik salımı için MMT nanokil katkısı içeren kompozit küreler üretilmiştir.

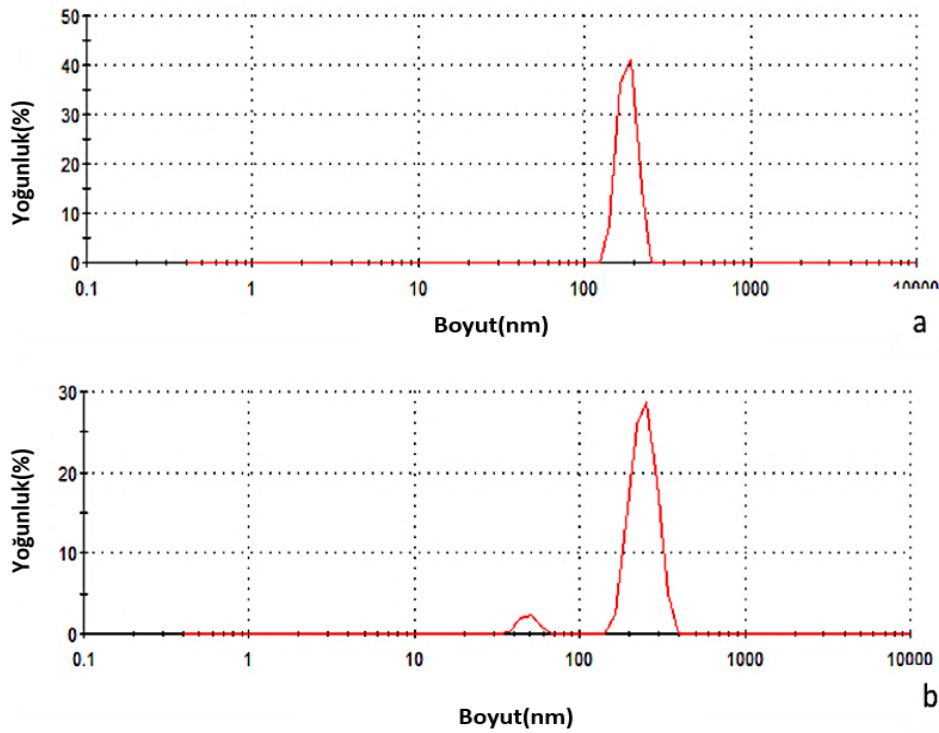


Şekil 13. DLS analizinde tarama esnasında parçalanarak aglomere olan kitosan küreler

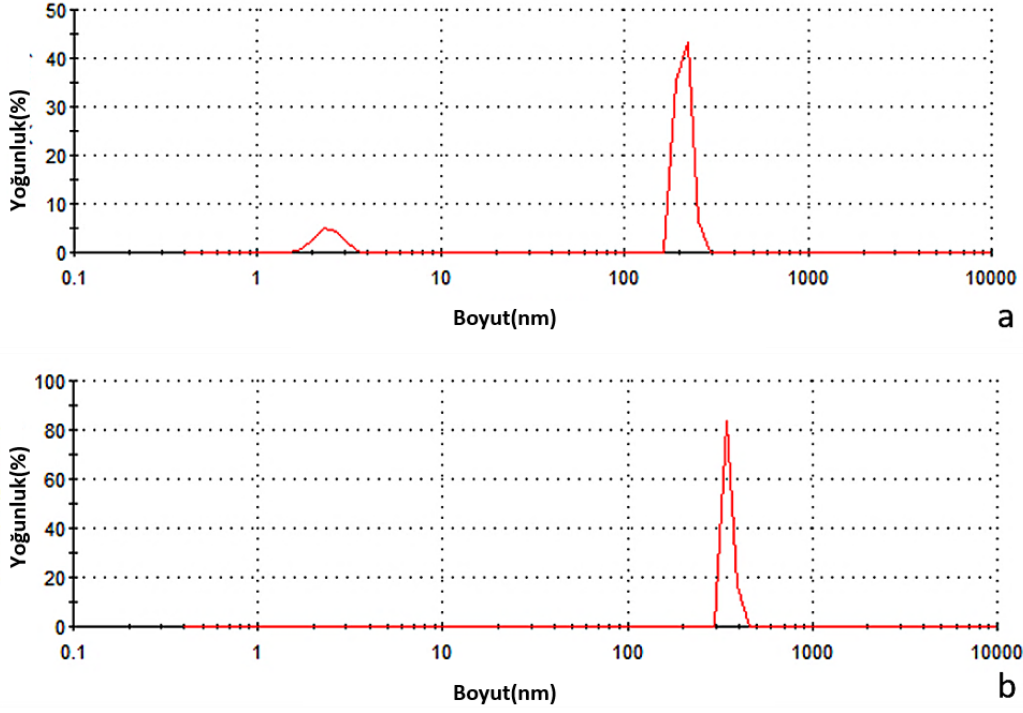
Nanokil katkısı ile sistemin stabilitesinde önemli ölçüde artış gözlemlenmiştir. Malzemelerin hidrodinamik çapları tarama süresi boyunca değişmemiştir. Mikrofludizer işlemi ile 10000 psi ve 5 döngü koşullarında homojenize edilen kitosan-kil (CC) gruplarının ortalama çapı 65.17 nm olarak bulunmuştur.

Gentamisin katkılı gruplar kontrolle (CC) kıyaslandığı zaman hidrodinamik çap değerlerinde artış gözlenmiştir (Şekil 14). Aynı zamanda, artan ilaç oranının nanoküre çapını arttırdığı gözlemlenmiştir. Polimer:ilaç oranı 20:1 olan gentamisin yüklü nanokürelerin ortalama hidrodinamik çapı 181.6 nm iken, 10:1 oranına sahip gruplarda ortalama çap 246.4 nm (%94.8) olarak bulunmuştur. Literatürdeki çalışmalarda, yüzeye adsorbe olan ve nanopartikül içerisine hapsolan ilacın partikül boyutunu arttırdığı gösterilmiştir (Esmaeili et al., 2008).

Vankomisin katkılı gruplarda polimer ilaç oranındaki artış ile küre çapında düşüş gözlemlenmiştir (Şekil 15). Artan vankomisin miktarı ile ilaç polimer matrisine ve küre yüzeyine dahil olarak çapta artışa neden olmuştur. Polimer:ilaç oranı 8:1 olan gruplarda ortalama çap artarak 210 ± 19.25 nm (%85), 4:1 oranlı gruplarda 351 ± 20.18 nm (%100) olarak bulunmuştur. Antibiyotik yüklü kürelerin polidispersite indeksleri karşılaştırıldığında, gentamisin yüklü örneklerin daha dar polidispersite indeksine sahip olduğu görülmüştür.



Şekil 14. Gentamisin katkılı kürelerin DLS ile belirlenen hidrodinamik çap dağılımları (a) polimer ilaç 20:1; (b) polimer ilaç 10:1.



Şekil 15. Vankomisin katkıli kürelerin DLS ile belirlenen hidrodinamik çap dağılımları (a) polimer ilaç 8:1; (b) polimer ilaç 4:1.

Tablo 13. Kitosan, kitosan-kil ve ilaç katkıli kitosan-kil gruplarının hidrodinamik çap dağılımı ve polidispersite indeksleri

Grup	Boyut (nm)	% Yoğunluk	PDI
Kitosan	77.9±3	83.8	1
	1.1±0.1	16.2	
CC (Kitosan-kil)	65.2	100	0.980
CC:VC 4:1	351±20.2	100	0.885
CC:VC 8:1	210.4±19.2	85	0.990
	2.4±0.4	15	0.987
CC:GS 10:1	246.4±42.4	94.8	0.544
	49.3±5.6	5.2	
CC:GS 20:1	181.6±22.0	100	0.696

4.2.2 Nanokürelerin Zeta Potansiyelinin Ölçülmesi

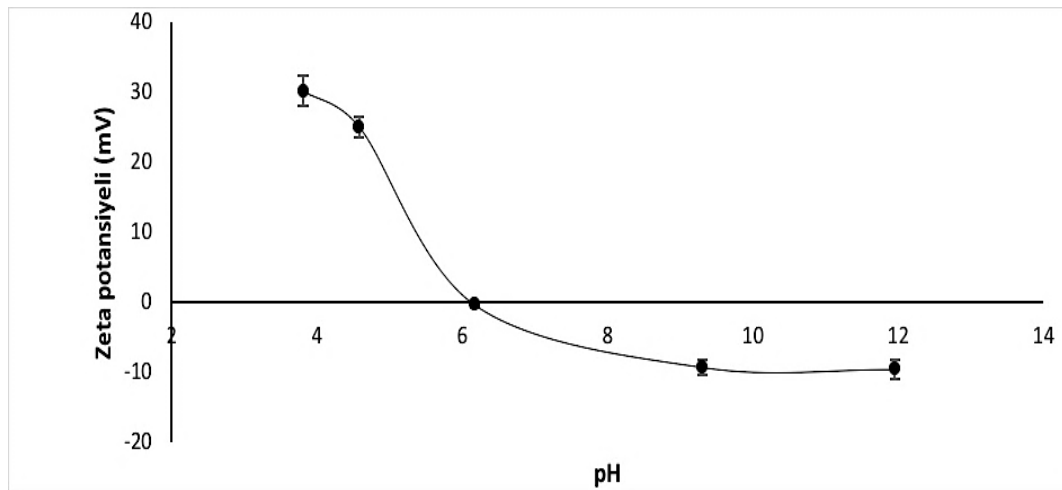
İlk olarak MMT nanokil katkısının yüzey yükleri değişen pH ortamında incelenmiştir (Şekil 16). MMT, kenar yüzünde çok değerlikli katyonlar içermektedir. Oktahedral Al-OH ve tetrahedral Si-OH gruplarından oluşan kutupsal alanlar, yapının kenarlar bölgelerinde bulunmakta ve tabakaların -OH bağlı düzlemleri ile etkileşime

girmektedir. Bu iyonik etkileşim; kenar yüzeydeki =AlOH ve =SiOH grupları, yüzeydeki Al-OH-Al grupları ve siloksan katmandaki Si-O-Si grupları ile meydana gelmektedir. MMT nanokil partikülleri iki tür elektrik yükü taşımaktadır. Kenar gruplarının pH'a bağlı proton adsorpsiyon/desorpsiyonu ile yüklenmesi ve platelet yüzeyindeki izomorf yapılardan ötürü negatif yüklenme olmaktadır (Forano, 2004). Amfoterik kısımları pH'a bağlı olarak pozitif veya negatif olarak yüklenebilmektedir.

Literatürde, MMT nanokilin eş elektrik noktası yaklaşık olarak pH 6.4-7.2 aralığında bulunmuştur (Komulski, 2011). Projede ise, MMT nanokilin eş elektrik noktası ise pH 6.20'de bulunmuştur.

Daha sonra PBS (pH=7.4) içerisinde süspansiyon olarak dağıtılan saf kitosan, kitosan-kil ve ilaç yüklü kitosan-kil kürelerin yüzey yükleri Malvern Zetasizer ile belirlenmiştir (Tablo 14). Elde edilen küreler, kitosanın polikasyonik yapısından dolayı pozitif yüklüdür. Kitosan-kil sistemlerinde MMT'nin ortam PH değerinde negatif yüklü olmasından dolayı kürelerin zeta potansiyeli düşmüştür. Kısmi pozitif yüklü vankomisin, polimer matrisine ve küre yüzeyine dahil olarak ilaç yüklü kürelerin stabilitesinde azalışa neden olmuştur. Vankomisin miktarındaki artış ile sistem stabilitesinde düşüş gözlenmektedir. Ancak bu azalış, MMT nanokil katkısı ile stabilitenin artması nedeni ile kompanse edilmiştir. Gentamisin yüzeyindeki amin grupları nedeniyle pozitif yüke sahiptir. Gentamisin katkılı nanokürelerde de kontrol gruba göre zeta potansiyellerinde düşüş gözlenmiştir.

Birçok bakteri hücre membranı negatif yüklü olduğu için, üretilen kompozit nanokürelerin pozitif yüzey yükü antimikrobiyal aktivite açısından avantajlı bulunmuştur (Honary and Zahir, 2013).



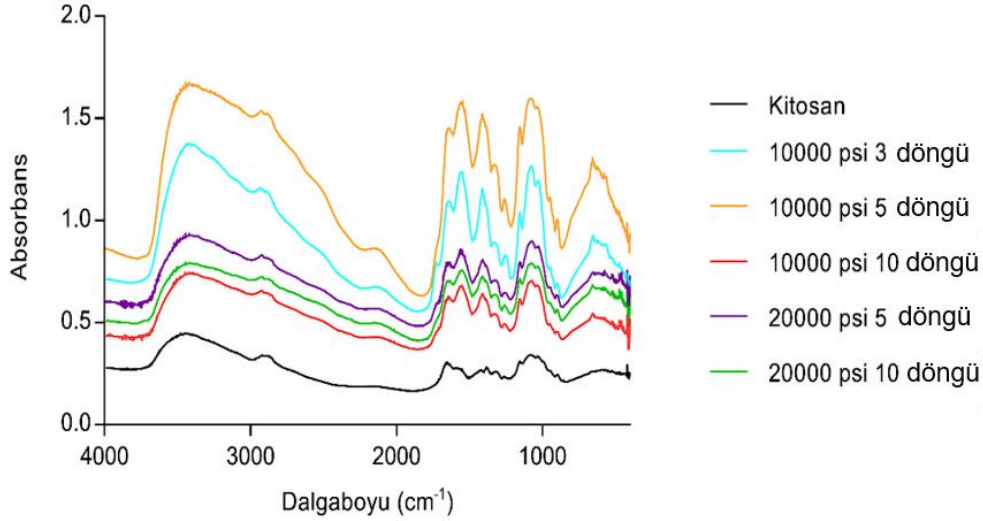
Şekil 16. MMT nanokil katkısının değişen pH ortamında yüzey yükünün belirlenmesi

Tablo 14. Kitosan, kitosan-kil ve ilaç katkılı kitosan-kil gruplarının zeta potansiyelleri

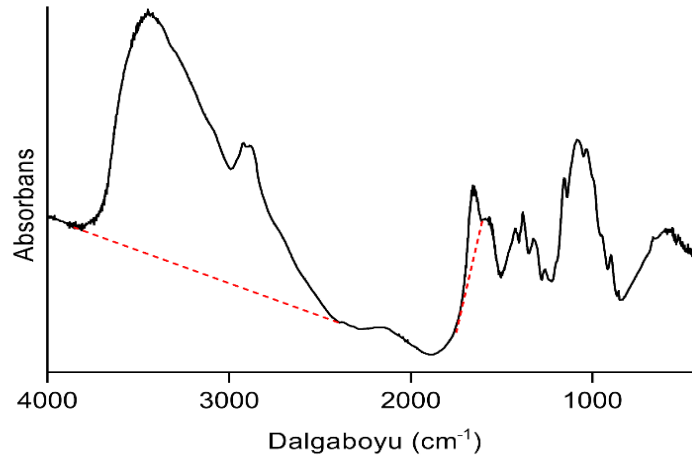
Gruplar	Zeta Potansiyeli (mV)
Kitosan nanoküre	24.0 ± 3.6
MMT nanokil	-5.3 ± 0.10
Kitosan/Kil	13.3 ± 1.26
Kitosan/Kil/VC (4:1)	5.7 ± 0.21
Kitosan/Kil/VC (8:1)	12.3 ± 1.72
Kitosan/Kil/GS (10:1)	4.3 ± 0.03
Kitosan/Kil/GS (20:1)	6.9 ± 0.55

4.2.3 Fourier Transform Infrared Spektroskopi (FT-IR) Analizi

Grupların deasetilasyon dereceleri, FT-IR analizi ile incelenmiştir (Şekil 17). Deasetilasyon derecesi, asetil gruplarının aminoasetil gruplarından uzaklaştırılma derecesidir. Kitinin deasetillenmesi ile elde edilen kitosan yapısında bulunan serbest amin grupları, malzemenin çözünür özellik kazanmasına neden olur. Bu nedenle, kitosan deasetilasyon derecesi malzemenin fiziksel ve kimyasal özelliklerinde önemli bir etkiye sahiptir. Bu çalışmada, farklı homojenizasyon koşullarına tabi tutulmuş kitosan gruplarının deasetilasyon derecesi FT-IR analizi ile hesaplanmıştır. Hesaplamalarda kullanılan piklerin referans hatları Şekil 18’da gösterilmiştir. Kitosan deasetilasyon derecesi homojenizasyon koşullarındaki basınç ve döngü sayısı artışı ile orantılı olarak değişmektedir.



Şekil 17. Farklı homojenizasyon koşullarına tabi tutulan kitosan gruplarının FT-IR spektrumu



Şekil 18. Deasetilasyon derecelerinin hesaplanmasında kullanılan referans hatları

Yapılan çalışmalarda, kitosan deasetilasyon derecesindeki artışın çapraz bağlanma ve stabilite üzerine olumlu etkileri incelenmiştir (Draget, 1996). FT-IR analizinde gözlenen piklerin oranlanması ile deasetilasyon dereceleri hesaplanmıştır (Tablo 15, 16). Mikrofluidizer işleminde basınç ve döngü sayısı, deasetilasyon derecesinde artışa neden olmuştur. Yüksek molekül ağırlığında bu artış daha belirgin olarak gözlenirken, düşük molekül ağırlığında ise mikrofluidizer grupları arasında döngü sayısı arttıkça değişim meydana gelmiştir. Literatürdeki çalışmalarda da mikrofluidizer yöntemi uygulanan kitosan çözeltilerinin deasetilasyon derecesinde düşük miktarda artış gözlemlendiği belirtilmiştir (Chen, 2005). Gupta ve Jabrail tarafından yapılan çalışmada (2005), deasetilasyon derecesinin artışına bağlı olarak daha küçük

çaplı, yüksek enkapsülasyon kapasitesine sahip, daha kontrollü salım yapan ilaç taşıyıcı kitosan mikroküreler elde edilmiştir (Gupta ve Jabrail, 2005). Bu nedenle; viskozite, moleküler ağırlık ve deasetilasyon derecesi çalışmaları birlikte incelendiğinde 10000 psi 5 döngü koşulları ile mikrofluidize edilen kitosan çözeltisi, nanoküre üretiminde kullanılmak üzere uygun bulunmuştur. Doku iskelesi üretiminde ise 5000 psi 3 ve 5 döngü gruplarının uygun olduğu gözlenmiştir.

Tablo 15. Homojenizasyon koşullarının yüksek molekül ağırlıklı kitosanın deasetilasyon derecesi üzerindeki etkisi

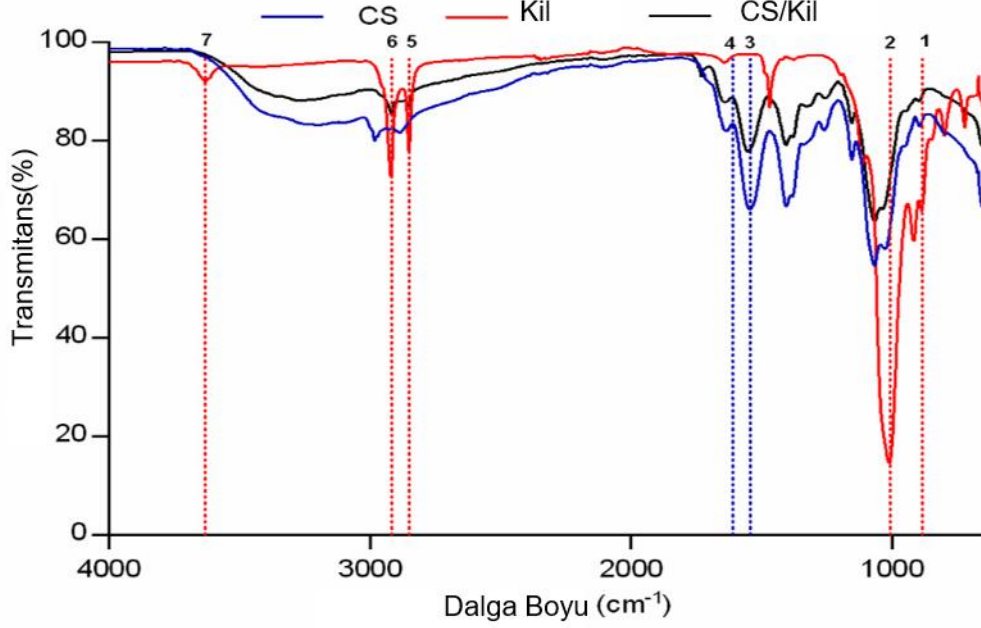
Gruplar	Deasetilasyon Derecesi (%)
İşlem görmemiş kitosan	77.58
10000 psi 3 döngü	80.99
10000 psi 5 döngü	80.92
10000 psi 10 döngü	84.25
20000 psi 5 döngü	80.28
20000 psi 10 döngü	84.92

Tablo 16. Homojenizasyon koşullarının düşük molekül ağırlıklı kitosanın deasetilasyon derecesi üzerindeki etkisi

Gruplar	Deasetilasyon Derecesi (%)
İşlenmemiş düşük molekül ağırlıklı kitosan	75.11
5000 psi 3 döngü	75.17
5000 psi 5 döngü	77.93
10000 psi 3 döngü	71.32
10000 psi 5 döngü	75.17

Kitosan ve MMT nanokil arasındaki kimyasal etkileşim de FT-IR analizi ile belirlenmiştir. Şekil 19'da kil, kitosan ve kitosan-kil gruplarının IR spektrumu gösterilmektedir. Grupların karakteristik pikleri Tablo 17'de gösterilmiştir. Kitosan-kil gruplarında -OH grubunun karakteristik piki (2990 cm^{-1}), 2934 cm^{-1} dalga boyundaki MMT nanokilin -CH₂- vibrasyonuna bağlı olan piki (2916 cm^{-1}) ile örtüşmüştür. Kitosan kil etkileşimi; MMT'nin hidrosilated silikat grupları ile Kitosanın amino ve hidroksil gruplarının hidrojen bağı yapması ile gerçekleşir. Ayrıca, MMT karakteristik Al-OH-Al

(913 cm^{-1}) ve -CH- gerilme (2852 cm^{-1}) pikleri; kil katkılı kompozit gruplarda kil ile kıyaslandığında daha düşük yoğunlukta görülmüştür.

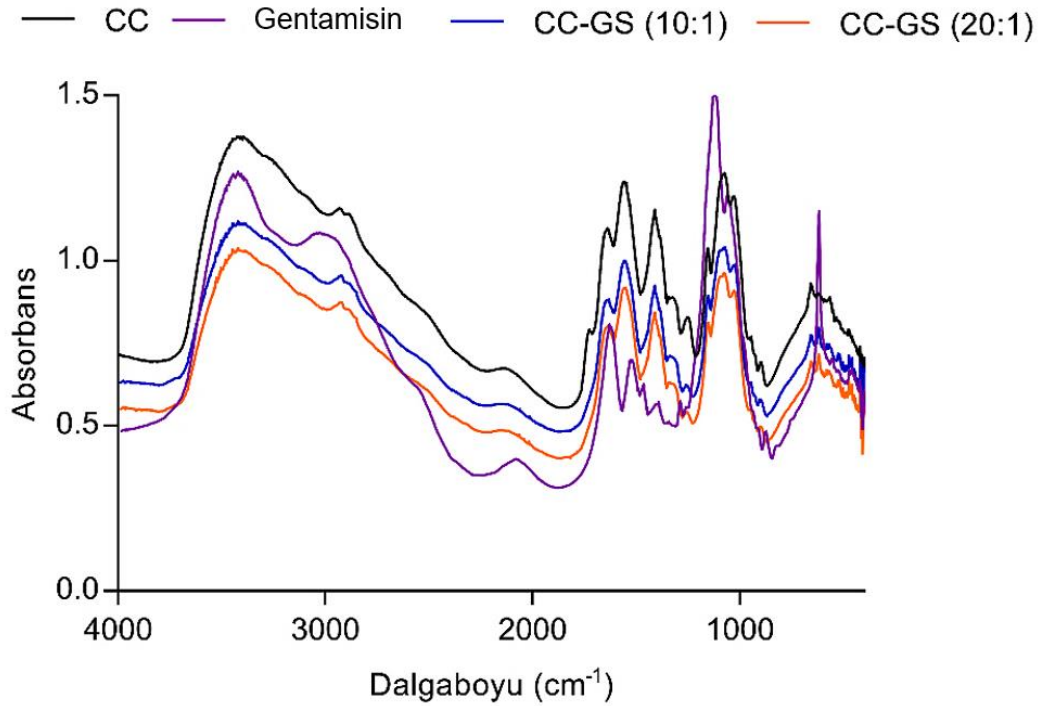


Şekil 19. Kil, kitosan ve kitosan/kil IR spektrumu (CS: kitosan, Kil: MMT nanokil, CS/Kil: kitosan/nanokil kompozit)

Tablo 17. Grupların karakteristik pikleri

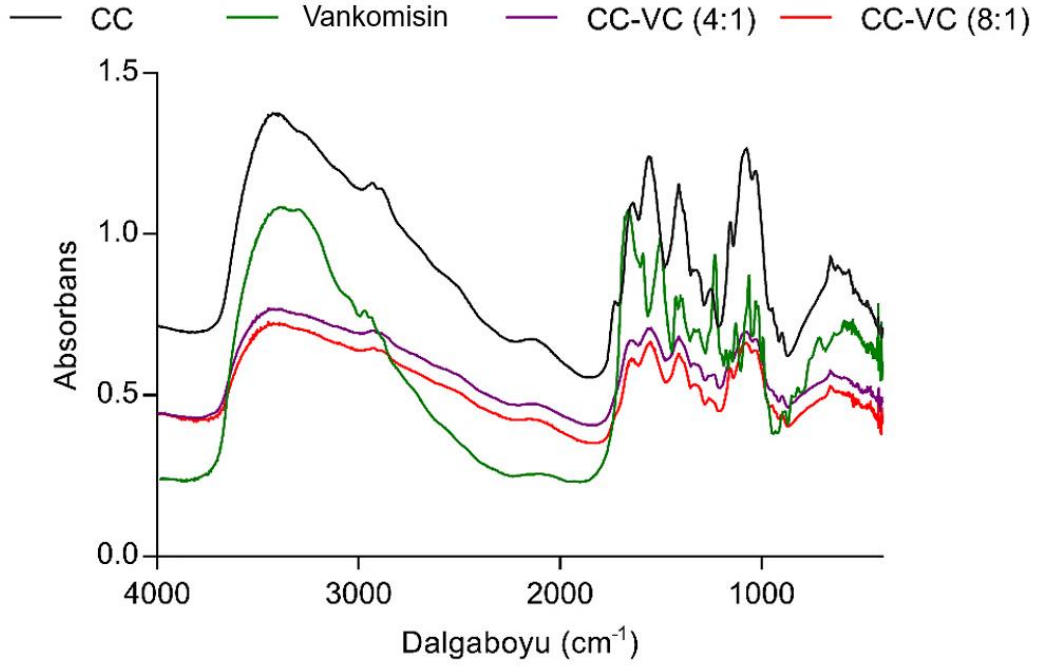
No	Dalga boyu (cm^{-1})	Band	Formülasyon	Referans
1	913	Al-Al-OH gerilme	MMT CS/MMT	Silva ve ark., 2012
2	1020	Si-O gerilme	MMT	Koosha ve ark., 2015
3	1560	N-H eğilme	Chitosan (amine)	Baxter ve ark., 1992
4	1655	C=O gerilme	Chitosan (amide I)	
5	2852	-CH- gerilme	MMT CS/MMT	Huang ve ark., 2015
6	2916	-CH ₂ vibrasyon	MMT CS/MMT	
7	3667	AlOH and SiOH gerilme	MMT	Silva ve ark., 2012

Gentamisin katkılı kitosan/kil nanokürelerin FT-IR analizi incelendiğinde (Şekil 20); literatürde gentamisin için verilen karakteristik pikler $1650-1400\text{ cm}^{-1}$ aralığında N-H vibrasyonu, C-H ve C-N gerilmesi; $1300-900\text{ cm}^{-1}$ aralığındaki güçlü absorpsiyon bandı C-N ve C-O grubunun gerilme vibrasyonları elde edilmiştir. (Rapacz-Kmita et al., 2015). Kitosanın Amid I ve Amid II piklerinin kayması, gentamisinin polimer-kil matrisine dahil olmasının hidrojen bağı ile gerçekleştiğini göstermektedir. 3420 cm^{-1} de görülen hidroksil piki, gentamisin katkılı tüm gruplarda genişlemekte ve yoğunluğu azalmaktadır. Bu değişim, kitosan hidrojen bağlarının gentamisin -OH- bükülmesi (3415 cm^{-1}) ile birleşmesi ile ilişkilendirilebilir (Huang et al., 2016; Ji et al., 2011).



Şekil 20. Gentamisin yüklü nanoküre gruplarının FT-IR analizi

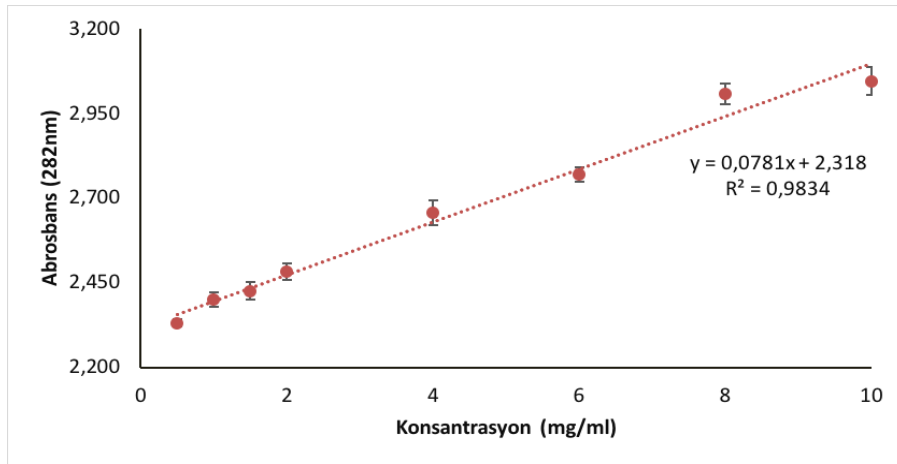
Şekil 21'de Vankomisin katkılı kitosan/kil nanokürelerin FTIR grafiği gösterilmektedir. Vankomisin; 3450 cm^{-1} 'de -OH- gerilmesi, 1652 cm^{-1} 'de C=O gerilmesi, 1502 cm^{-1} 'de aromatik C=C gerilmesi, 1232 cm^{-1} 'de de fenolik grupların neden olduğu karakteristik absorpsiyon bantlarına sahiptir (Yao et al., 2013; Yang et al., 2011). Literatürde tanımlanan karakteristik vankomisin pikleri, grafik incelendiğinde ilaç yüklü gruplarda da gözlemlenmektedir. Vankomisin ve kitosan arasındaki etkileşim, hidrojen bağı ile sağlanmaktadır. Vankomisin katkılı kitosan/kil nanokompozit gruplarında (CC-VC (4:1) ve CC-VC (8:1)) -OH- gerilme bandı (3450 cm^{-1}); kaymakta ve vankomisin ve kitosan arasındaki hidrojen bağı nedeniyle yoğunluğunu kaybetmektedir.



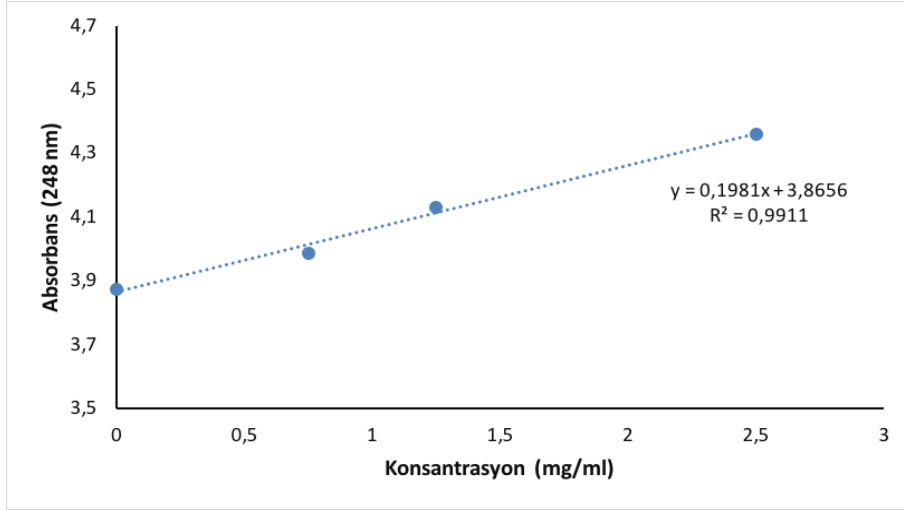
Şekil 21. Vankomisin yüklü nanoküre gruplarına ait FT-IR grafiği

4.2.4 Antibiyotik Yüklü Nanokürelerin Enkapsülasyon Verimi ve *In Vitro* Salım Profili

Nanokürelerin salım profili ve enkapsülasyon verimini belirlemek amacıyla çeşitli konsantrasyonlarda hazırlanan vankomisin ve gentamisin çözeltileri, sırası ile 282 ve 248 nm'de taranarak kalibrasyon eğrileri elde edilmiştir (Şekil 22 ve 23).



Şekil 22. Vankomisin kalibrasyon grafiği



Şekil 23. Gentamisin kalibrasyon grafiği

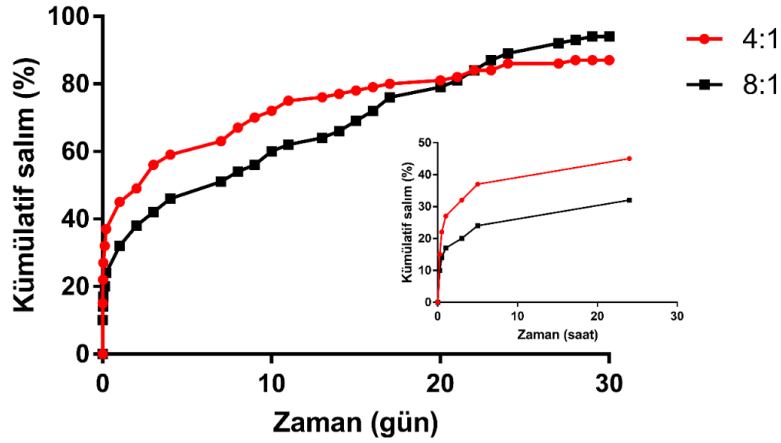
Hazırlanan kitosan-kil nanokompozit kürelerin enkapsülasyon verimi vankomisin için 79-86%, gentamisin için 90-94% olarak bulunmuştur (Tablo 18). Sonuçlar incelendiğinde, polimer:ilaç oranındaki artışın enkapsülasyon verimi üzerinde önemli ölçüde etkisi olduğu görülmüştür. Artan polimer:ilaç oranı ile, ilacın polimer matris yapısına dahil olması kolaylaşmakta, böylece enkapsülasyon verimi artmaktadır. Polimer:ilaç oranı, malzemelerin salım profilini etkileyen önemli özelliklerden biridir. Daha önce yapılan çalışmalarda da enkapsülasyon verimi, malzemelerin polimer:ilaç oranındaki artış ile doğru orantılı bulunmuştur.(Desai ve Park, 2005; Dhakar ve ark., 2010).

Tablo 18. Farklı oranlarda gentamisin ve vankomisin yüklü kitosan nanokürelerin enkapsülasyon oranları

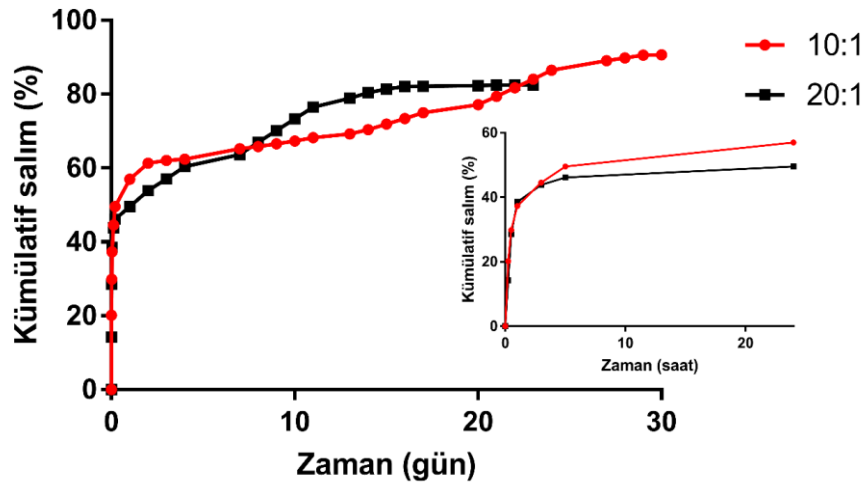
Antibiyotik	Polimer:ilaç oranı	Enkapsülasyon verimi (%)
Vankomisin	4:1	79.04 ± 0.74
	8:1	86.56 ± 2.63
Gentamisin	10:1	90.59 ± 4.88
	20:1	94.73 ± 5.52

Doku iskeleleri üzerine kaplanan vankomisin ve gentamisin içeren kitosan/kil nanokürelerin salım sıvılarından alınan örnekler alınarak UV-VIS spektrofotometre (Varioskan) ile okutulmuş ve hazırlanan kalibrasyon eğrilerinden miktar tayini yapılmıştır. Salım profili incelendiği zaman kısa dönemde nanokürelerin yüzeyine yakın bulunan ilaç kristallerine veya yüzeye adsorbe olmuş ilaç kristallerine bağlı olarak ilk 60 dakika içinde hızlı bir salım gerçekleşmiştir. Her iki grupta da polimer:ilaç

oranındaki artışla beraber daha kontrollü bir salım profili gözlemlenmiştir. Düşük ilaç konsantrasyonuna sahip gruplarda polimer-kil matrisi ilacı daha kuvvetli bir şekilde hapsederek daha yavaş salım yapılmasına, patlama etkisinin (burst release) azalmasına neden olmuştur. Vankomisin yüklü gruplarda ilk 24 saatte polimer:ilaç oranı 4:1 olan malzemelerde %45, 8:1 olan gruplarda %32 kümülatif salım gözlemlenmiştir. 30 günün sonunda 4:1 ve 8:1 oranlı gruplarda enkapsüle edilmiş ilacın sırası ile salımı %87 ve %94 olarak gerçekleşmiştir (Şekil 24). Gentamisin yüklü nanoküre gruplarında da; polimer:ilaç oranındaki artış ile benzer etki gözlemlenmiştir. İlk 24 saatte 10:1 ve 20:1 kodlu gruplarda sırası ile %56 ve %49 salım gerçekleşmektedir (Şekil 25).



Şekil 24. Kitosan/kil nanokompozit kürelerin vankomisin salım profili



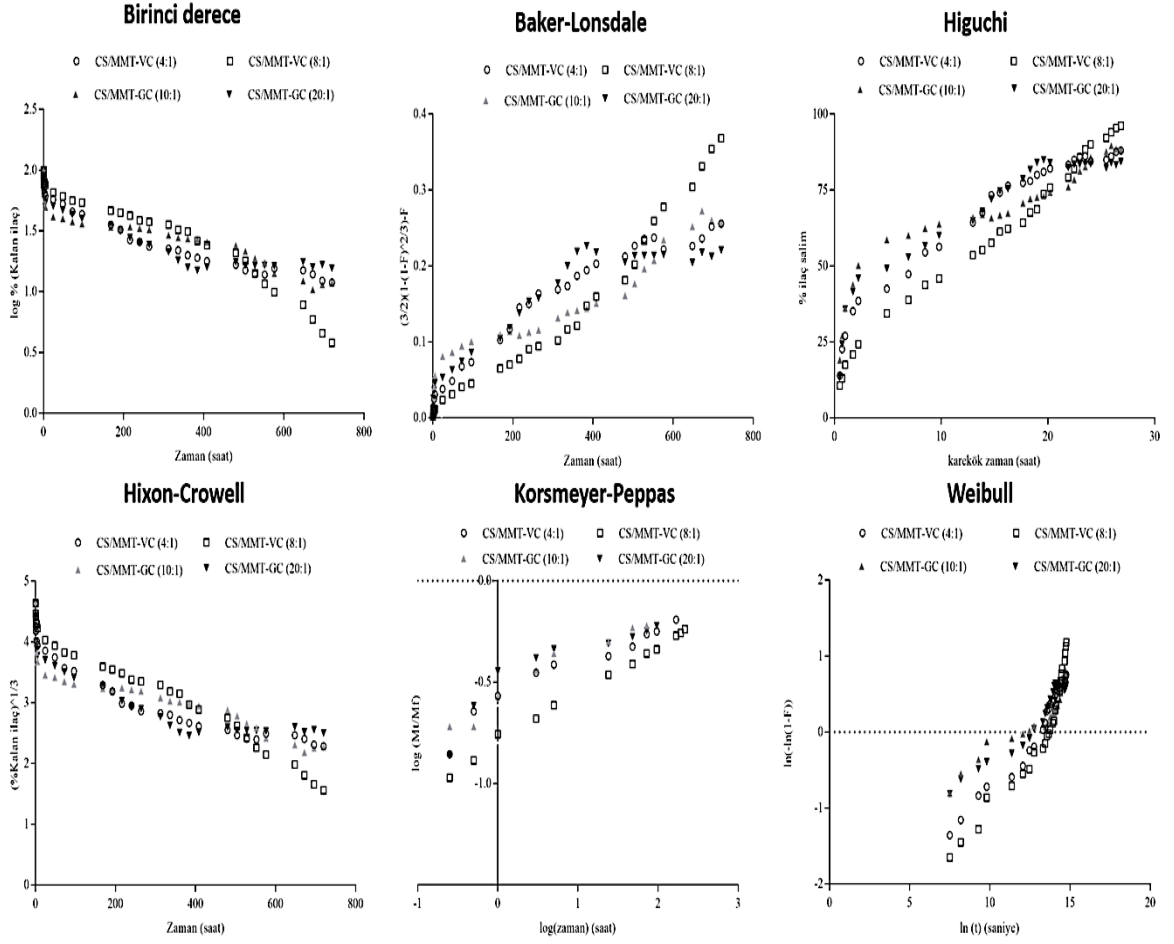
Şekil 25. Kitosan/kil nanokompozit kürelerin gentamisin salım profili

İlaç salım profilleri daha önce belirlenmiş olan Gentamisin ve Vankomisin yüklü CS/MMT nanokompozit sistemler, matematiksel ampirik modeller yardımı ile ilaç salım hızının zamana karşı fonksiyonu olarak değerlendirilmiştir. Bu nedenle, Birinci derece, Higuchi, Korsmeyer-Peppas, Hixson Crowell, Weibull ve Baker-Lonsdale ampirik modelleri uygulanmıştır. Matematiksel modeller deneysel verilere uygulanarak Şekil 26'da gösterilmiştir. Salım (k) ve korelasyon katsayıları (R^2) Tablo 19'da gösterilmiştir.

Sonuçlar incelendiğinde, Korsmeyer-Peppas modelinin CS/MMT-VC (8:1) ve CS/MMT-GC (10:1) grupları ile uyumluluk gösterdiği; Weibull modelinin ise CS/MMT-VC (4:1) ve CS/MMT-GC (20:1) grupları ile yüksek korelasyon katsayısı ile uyum sağladığını göstermektedir (Şekil 26). Weibull modelinin genellikle erozyon ve şişme mekanizması gösteren sistemlere uygunluğu; 14. Günden sonra gözlemlenen iki-fazlı salım profilini açıklamaktadır. Korsmeyer-Peppas üstel katsayısı (n), CS/MMT nanokürelerin salımında baskın olan mekanizma hakkında fikir vermektedir. Elde edilen sonuçlara göre; her formülasyonda n değerinin 0.45'den küçük olması, salım sistemlerinin Fickian difüzyon modelinin ana mekanizma olduğunu göstermektedir. Bu nedenle, ilaç salım hızının polimer matrisinde hapsolmuş ilaç konsantrasyonuna bağlı olmadığı düşünülmektedir.

Ji ve ark. (2011), Gentamisin ve salisilik asit yüklü kitosan nanopartiküllerinin salım profilini 70 saatlik inkubasyon periyodunda incelemiş, maksimum kümülatif salımı %92 olarak bulmuşlardır. Salım profili kinetik modellere uyarlandığında, üretilen nanokürelerin Weibull kinetik modeline uygun salım gösterdiği belirlenmiştir. Ayrıca, Korsmeyer-Peppas üstel katsayısına göre erken-dönem salım mekanizması Fickian difüzyon modeline uymaktadır. Huang ve ark. (2016), Gentamisin yüklü kitosan/fukoidan nanopartikülleri pulmoner ilaç salım sistemleri için araştırmış, ilacın iki fazlı salım profili gösterdiğini belirlemiştir. İlk 10 saatte ilaç salımı difüzyon ve şişme ile kontrol edilirken, 10-72 saatte Fickian difüzyon baskın olarak görülmüştür. Sezer ve ark. (2017) levan nanopartiküllerden Vankomisin antibiyotik salımının çoğunlukla Higuchi modelini takip ettiğini incelemiştir.

Yaygın olarak kullanılan mekanizma-temelli ampirik denklemlerden sonra, ilaç yüklü nanokompozit kürelerde Kopcha modeli yardımı ile erozyon/difüzyon arasındaki ilişki incelenmiştir. Kopcha modeli, A/B oranının 1'den büyük olması nedeni ile her grupta difüzyon mekanizmasının erozyondan daha baskın olduğunu göstermektedir (Tablo 20).



Şekil 26. CS/MMT Nanokürelerin farklı polimer:ilaç oranlarında gentamisin ve vankomisin salım kinetiği modelleri

Tablo 19. Vankomisin ve gentamisin yüklü kitosan/montmorillonit nanokompozit kürelerin salım ve korelasyon katsayıları

İlaç	Polimer:İlaç oranı	Birinci derece		Higuchi		Korsmeyer-Peppas		Hixson-Crowell		Weibull	Baker-Lonsdale	
		K	R ²	k	R ²	N	R ²	k	R ²	R ²	R ²	
Vankomisin	4:1	0.0026	0.9085	2.47	0.9354	0.1928	0.9216	-	0.0073	0.8593	0.9552	0.9308
	8:1	0.0037	0.9537	3.037	0.9915	0.238	0.995	-	0.0036	0.9789	0.8734	0.9622
Gentamisin	10:1	0.0023	0.8998	1.935	0.8847	0.2152	0.9515	-	0.0023	0.8531	0.8369	0.9383
	20:1	0.0022	0.8064	2.17	0.8781	0.1913	0.8015	-	0.0023	0.7667	0.9354	0.8330

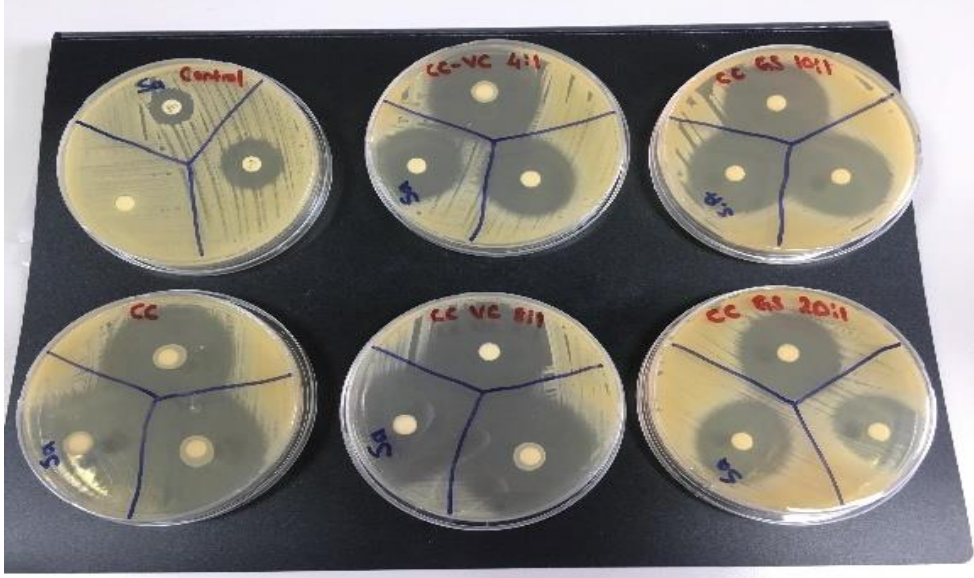
Tablo 20. İlaç yüklü kompozit nanokürelerin Kopcha modeline göre A, B ve korelasyon katsayıları

Gruplar	A	B	R ²
CS/MMT-VC (4-1)	101.7	6.192	0.99
CS/MMT-VC (8-1)	43.91	2.839	0.98
CS/MMT-GC (10-1)	17.48	1.126	0.99
CS/MMT-GC (20-1)	7.365	0.393	0.98

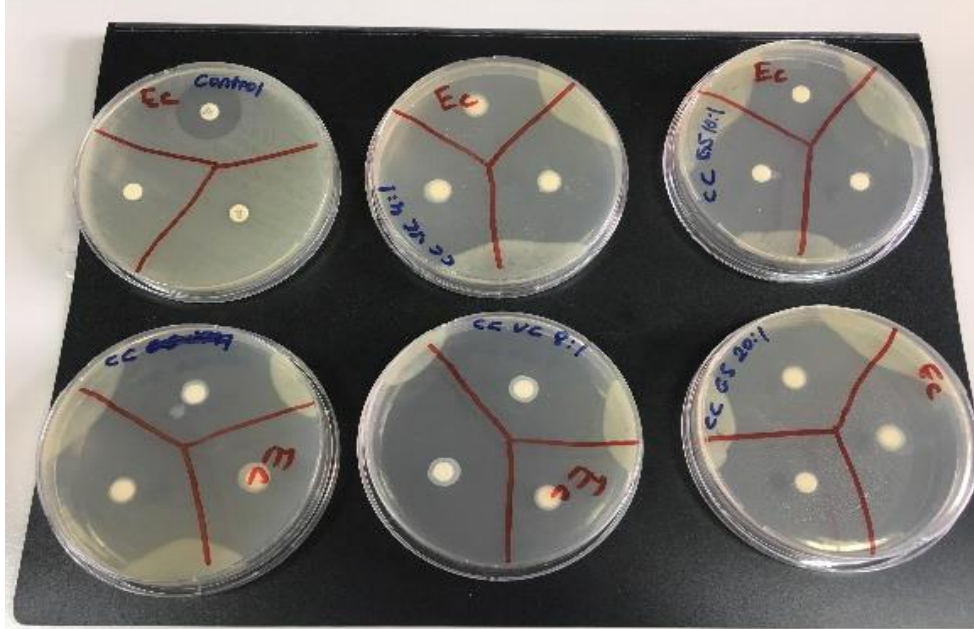
4.2.5 Antibiyotik Yüklü Nanokürelerin Antimikrobiyal Aktivitesi

Antibiyotik yüklü kitosan-kil nanoküre çözeltilerinin antimikrobiyal aktivitesi agar difüzyon yöntemiyle, *Staphylococcus aureus* (Gram-pozitif) ve *Echerichia coli* (Gram-negatif) bakterileri ile incelenmiştir. Nanoküre çözeltilerinin 24 saatlik inkübasyon sonrasındaki antimikrobiyal aktivitesi Şekil 27 ve 28'de verilmiştir. Çözeltinin içerdiği antibiyotik ve çözgen olarak kullanılan asetik asit nedeni ile yüksek oranda antimikrobiyal etki gözlemlenmiştir. Elde edilen sonuçlar zon çapı ölçümü için uygun değildir. Bu nedenle, sonraki çalışmalarda çeşitli periyotlarda alınan *in vitro* salım sıvılarının antimikrobiyal etkisi incelenmiştir. 24 saat inkübasyon sonucunda antibiyotik salım sıvılarının mikroorganizmalar üzerindeki etkileri incelenmiştir (Şekil 29-34). Oluşan zon çapları Tablo 21 ve 22'de verilmiştir. Negatif kontrol olarak petriye yerleştirilen boş diskler antimikrobiyal etki göstermemiştir.

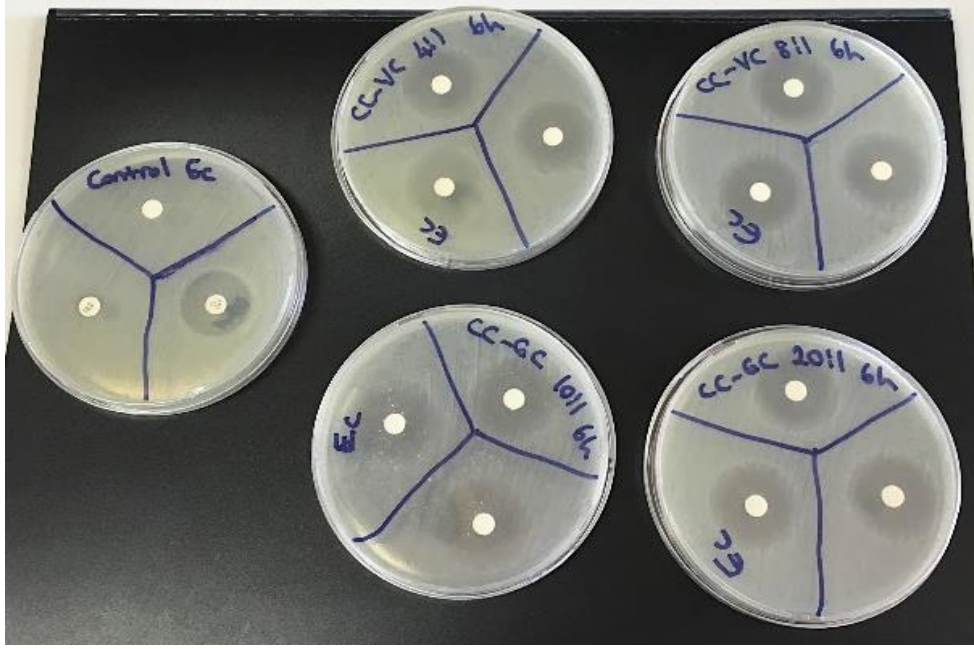
Çalışmada pozitif kontrol olarak kullanılan amoksisilin ve vankomisin diskleri *E. coli* mikroorganizması üzerinde antimikrobiyal etki göstermiştir. Salım sıvıları kontrol gruplar ile kıyaslandığında daha yüksek antimikrobiyal etki göstermiştir. Salım sıvılarının etki gösterdiği zon çapları değerlendirildiğinde ilk 6 saatte patlama etkisi (burst release) nedeni ile ortama diğer zaman periyotları ile kıyaslandığında daha yüksek miktarda antibiyotik salınmıştır. Bu nedenle erken dönemde (6 saat) salınan antibiyotik nedeniyle daha büyük zon çapı gözlemlenmiştir. 24 saat ve 25 gün periyotlarında alınan salım sıvıları, mikroorganizmalar üzerinde benzer değerlerde zon çapına neden olmuştur (Şekil 29-31).



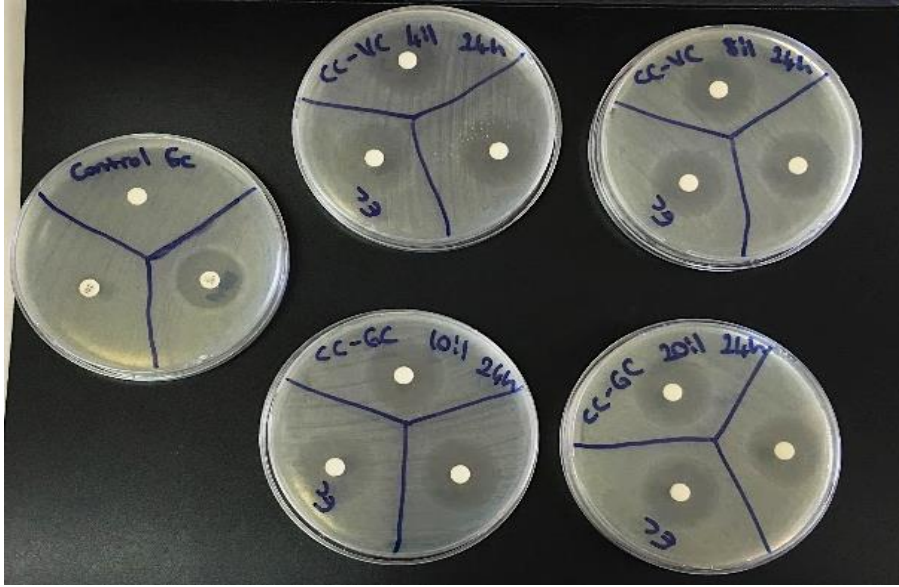
Şekil 27. Küre hazırlanmasında kullanılan ilaç katkılı kitosan/kil çözeltilerinin 24 saat inkübasyon sonunda *S.aureus* mikroorganizması üzerindeki etkisi.



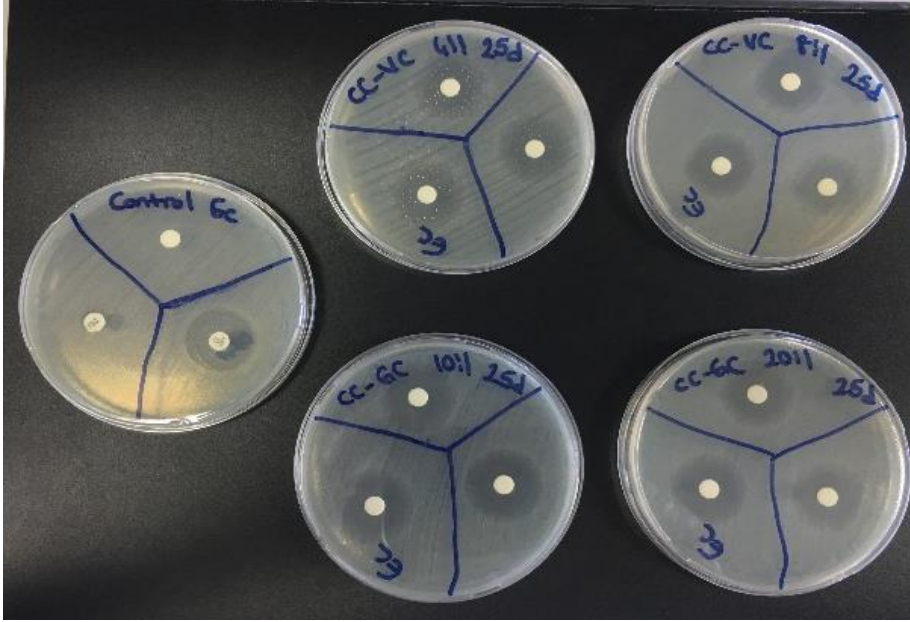
Şekil 28. Küre hazırlanmasında kullanılan ilaç katkılı kitosan/kil çözeltilerinin 24 saat inkübasyon sonunda *E.coli* mikroorganizması üzerindeki etkisi.



Şekil 29. 6 Saatte toplanan antibiyotik salım sıvılarının E. coli mikroorganizması üzerindeki etkisi



Şekil 30. 24. Saatte toplanan antibiyotik salım sıvılarının E. coli mikroorganizması üzerindeki etkisi



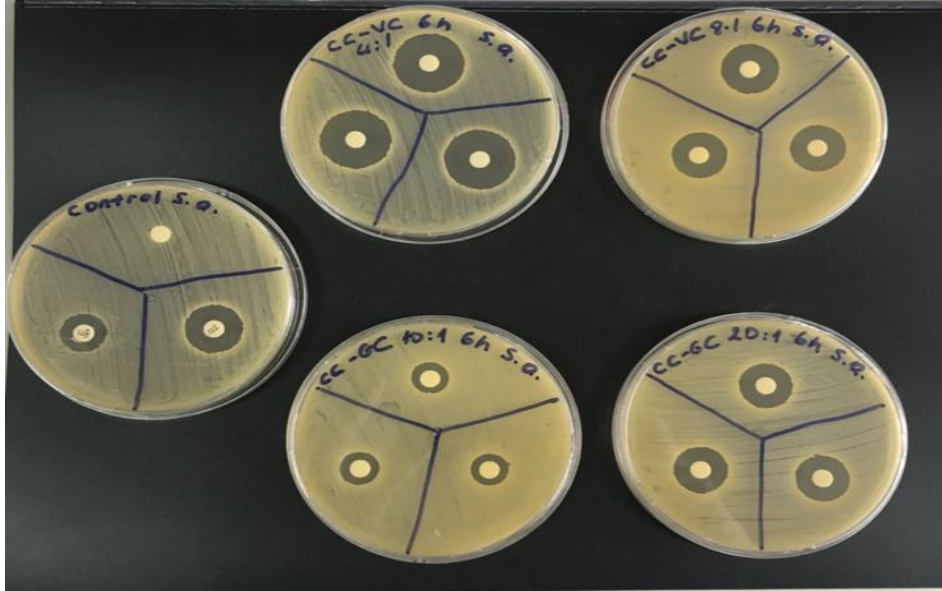
Şekil 31. 25. Günde toplanan antibiyotik salım sıvılarının E.coli mikroorganizması üzerindeki etkisi

Tablo 21. 6 saat, 24 saat ve 25. günde alınan salım sıvılarının E.coli mikroorganizması üzerinde etkisinin karşılaştırılması

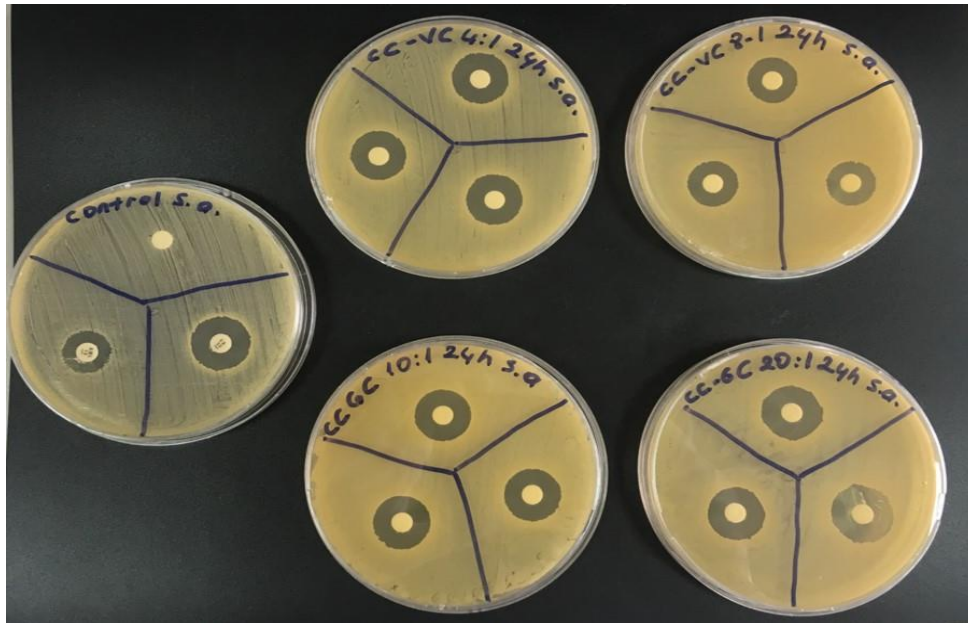
Gruplar	Zon çapı (cm)		
	6 saat	24 saat	25 gün
Pozitif kontrol 1 (Amoksisilin)	1		
Pozitif kontrol 2 (Vankomisin)	0.5		
Negatif kontrol (Boş disk)	-		
Kitosan/Kil/VC (4:1)	1.40 ± 0.10	1.13 ± 0.15	1.00 ± 0.10
Kitosan/Kil/VC (8:1)	1.47 ± 0.15	1.07 ± 0.12	0.90
Kitosan/Kil/GS (10:1)	1.47 ± 0.21	1.00 ± 0.10	1.03 ± 0.06
Kitosan/Kil/GS (20:1)	1.17 ± 0.15	0.97 ± 0.06	0.88 ± 0.03

Çalışmada pozitif kontrol olarak kullanılan geniş spektrumlu amoksisilin ve vankomisin diskleri *S.aureus* mikroorganizması üzerinde antimikrobiyal etki göstermiştir. Vankomisin hidroklorid, özellikle gram pozitif bakterilere karşı antimikrobiyal etki göstermektedir. Bu nedenle, vankomisin yüklü nanoküre gruplarının salım sıvıları gentamisin yüklü gruplarla karşılaştırıldığı zaman daha belirgin bir etki göstermiştir(Şekil 32-34). Ryu ve ark.(2014), PCL104 mikrokürelere salınan gentamisin salım sıvıları kullanılarak *S. aureus* ve *E. coli*'ye karşı antimikrobiyal aktivitesi üzerindeki etkisini incelemiştir. İlk dönemde daha fazla

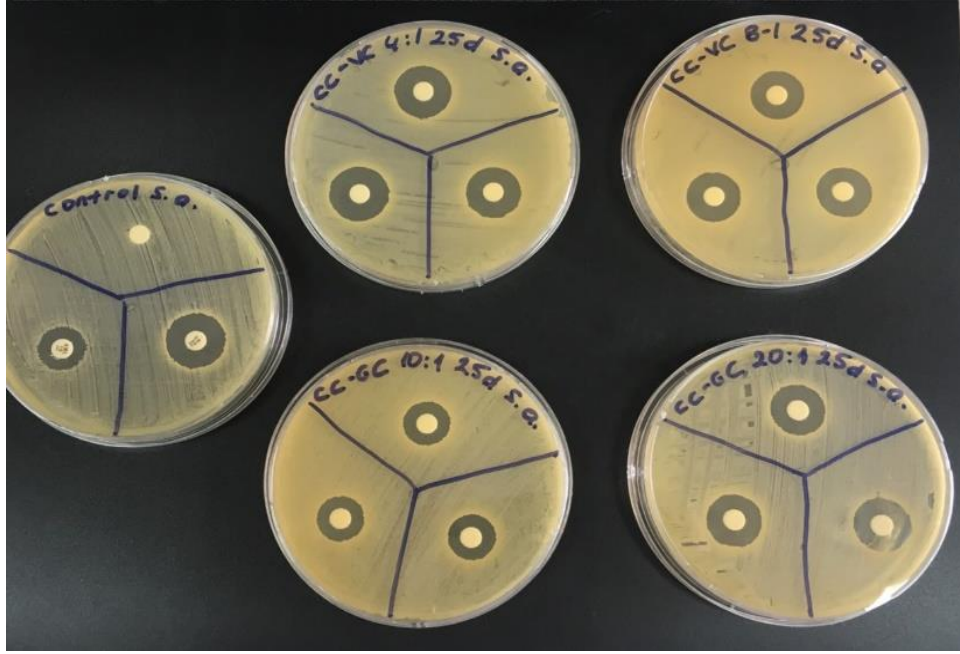
salınım olan grupta daha büyük inhibisyon zonunun elde edildiği belirlenmiştir. Literatürde, Vankomisin yüklü polimerik mikropartiküllerin, gram pozitif *S. aureus*, gram negatif *S. epidermidis* ve *P. Aeruginosa*'ya karşı antimikrobiyal aktiviteye sahip oldukları belirtilmiştir (Noel ve ark, 2010; Rumian ve ark., 2017). Vankomisin yüklü gelatin mikroküreler *S. aureus* bakterilerine karşı antimikrobiyel aktivite göstermiştir (Nouri-Felekori ve ark. 2019). Ek olarak, Lertsutthiwong ve ark. (2012) CS / MMT kompozitlerinin *E. coli* bakterilerine karşı antimikrobiyal aktivitesini kanıtlamıştır.



Şekil 32. 6. Saatte toplanan antibiyotik salım sıvılarının *S.aureus* mikroorganizması üzerindeki etkisi



Şekil 33. 24. Saatte toplanan antibiyotik salım sıvılarının *S.aureus* mikroorganizması üzerindeki etkisi



Şekil 34. 25. Günde toplanan antibiyotik salım sıvılarının S.aureus mikroorganizması üzerindeki etkisi

Tablo 22. 6 saat, 24 saat ve 25 günde alınan salım sıvılarının S.aureus mikroorganizması üzerinde etkisi

Gruplar	Zon çapı (cm)		
	6 saat	24 saat	25 gün
Pozitif kontrol 1 (Amoksisilin)	0.6		
Pozitif kontrol 2 (Vankomisin)	1.13±0.07		
Negatif kontrol (Boş disk)	-		
Kitosan/Kil/VC (4:1)	0.79 ± 0.03	0.53 ± 0.03	0.53 ± 0.03
Kitosan/Kil/VC (8:1)	0.55 ± 0.03	0.48 ± 0.02	0.44 ± 0.02
Kitosan/Kil/GS (10:1)	0.28 ± 0.02	0.40	0.31 ± 0.01
Kitosan/Kil/GS (20:1)	0.38 ± 0.01	0.41 ± 0.01	0.38 ± 0.01

4.3 Kitosan/POSS Nanokompozit Doku İskelelerinin Üretimi

4.3.1 Doku İskelelerinin Üretim Parametrelerinin Optimizasyonu

Ön çalışmalarda kitosan polimer matris yapısına %1-10 POSS aralığında POSS eklenmesi ile mekanik, şişme ve gözeneklilik üzerinde pozitif etkisi belirgin bir şekilde gözlenmiştir. Basma modül değerleri 13.5kPa'dan 17kPa'a çıkarken, %10 üzerindeki konsantrasyonlarda POSS katkısının mekanik özellikler üzerinde ciddi bir

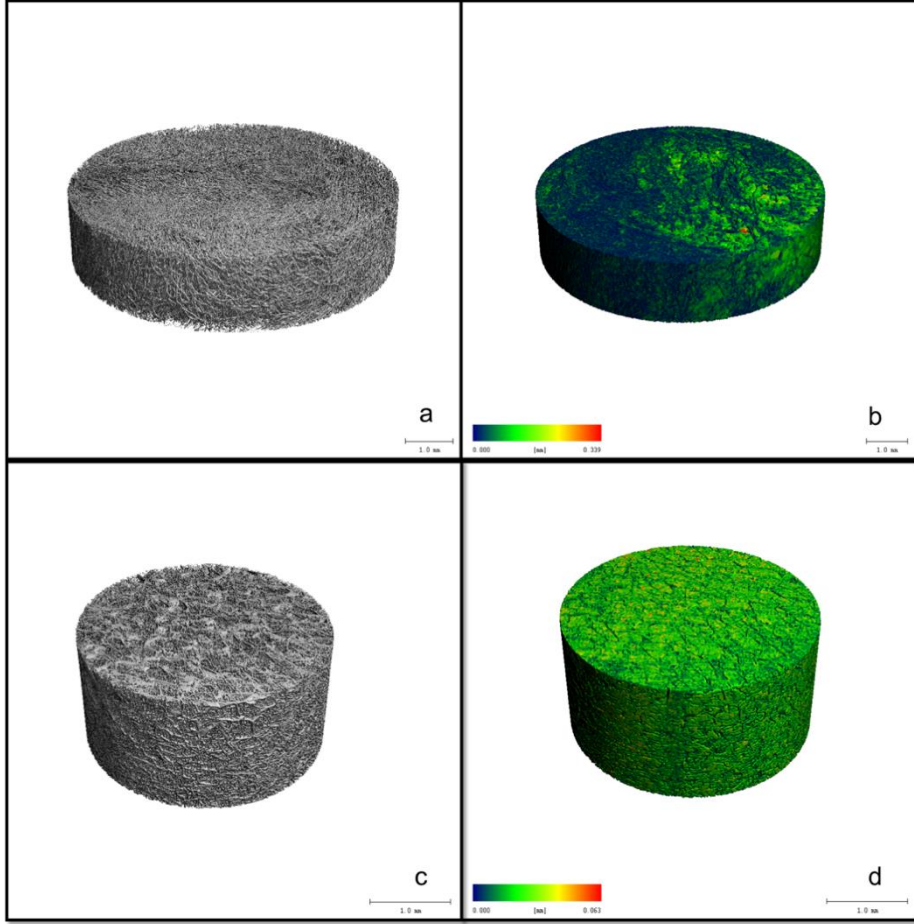


etkisi gözlenmemiştir (Tablo 23). Yapılan ön çalışmalar değerlendirilerek POSS konsantrasyonu ağırlıkça %10 olarak belirlenmiştir.

Tablo 23. Farklı konsantrasyonlarda POSS katkılı kitosan doku iskelelerinin mekanik özellikleri

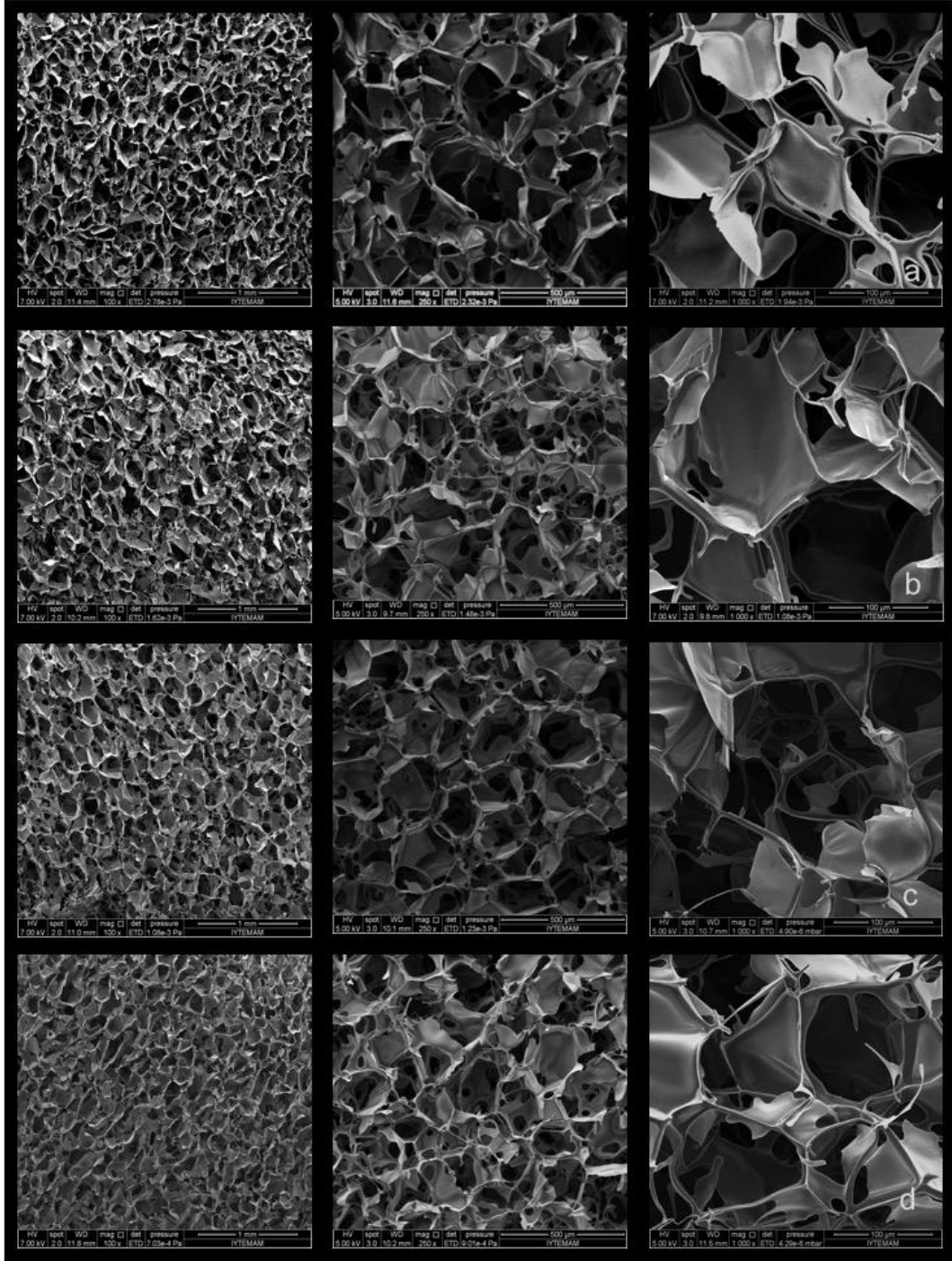
Gruplar	Basma Modülü (kPa)
Kitosan-% 1POSS	13.5 ± 0.67
Kitosan-% 3POSS	12.6 ± 1.15
Kitosan-% 5POSS	17.3 ± 0.22
Kitosan-% 10POSS	17 ± 1.26
Kitosan-% 20POSS	20 ± 2.8
Kitosan-% 40POSS	12.5 ± 0.31

Kitosan matrikse POSS katkısının eklenmesiyle mikro yapıda oluşan değişimler incelendiğinde ise, mikro CT sonuçlarına göre toplam gözeneklilik POSS katkısı %5'ten %20'ye çıkarıldığında yapı gözenekliliği %85 den %82 değerlerine düşmüştür (Şekil 35). Ayrıca mikro CT görüntüleri incelendiğinde, gözenek yapısının değiştiği, gözenek duvarlarının kalınlaştığı ve gözenekler arasında bağlantının azaldığı görülmüştür. Ayrıca doku iskelesinin mikro yapısının uniform bir dağılıma sahip olmadığı, malzemenin dış çeperlerinde tabakalanmalar meydana geldiği görülmektedir (Sedef Tamburacı, Doktora tezi, İYTE Biyomühendislik, 2016).

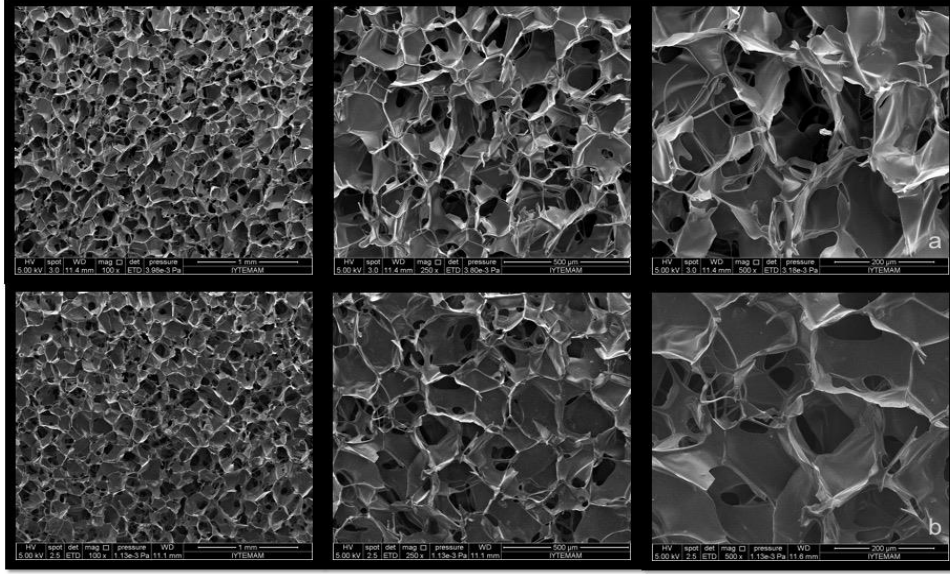


Şekil 35. Farklı konsantrasyonlarda POSS katkısı içeren kitosan doku iskelelerinin mikro ct analizi ile elde edilen üç boyutlu görüntüleri: kitosan-%5 POSS (a,b) ; kitosan-%20 POSS (c,d).

Farklı konsantrasyonlarda hazırlanan kitosan/POSS doku iskelelerinin SEM görüntüleri incelendiğinde %1-10 katkılı doku iskelelerinde POSS konsantrasyonunun düşük olduğu gruplarda benzer gözenek morfolojisi elde edilmiştir (Şekil 36). %10 katkı oranının üzerindeki gruplarda gözeneklerin iç kısımlara doğru artan duvar kalınlığı ile birlikte bağlantılarının daha kapalı olduğu gözlenmiştir (Şekil 37).

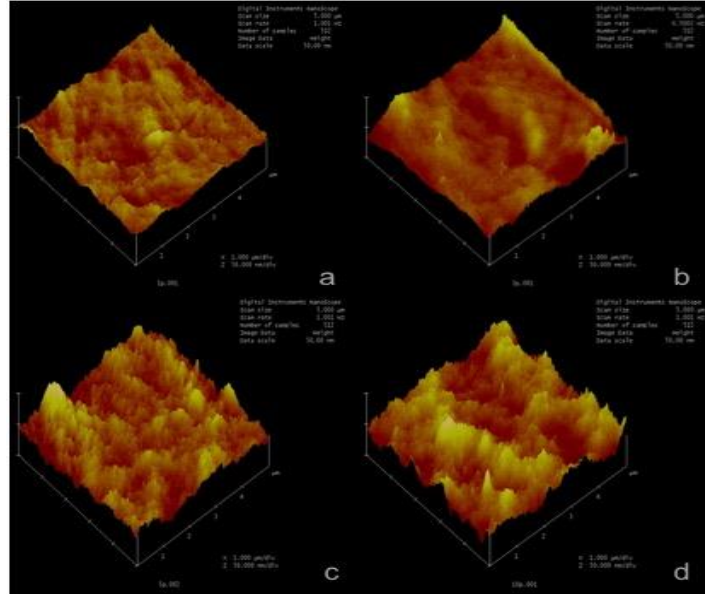


Şekil 36. Farklı konsantrasyonlarda POSS katkılı kitosan doku iskelelerinin 100X, 250X ve 500X büyütme SEM görüntüleri: %1POSS (a); %3POSS (b); %5POSS (c); %10POSS

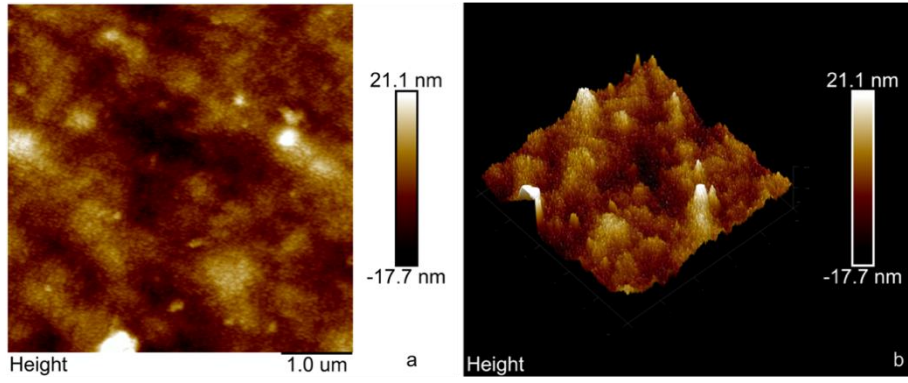
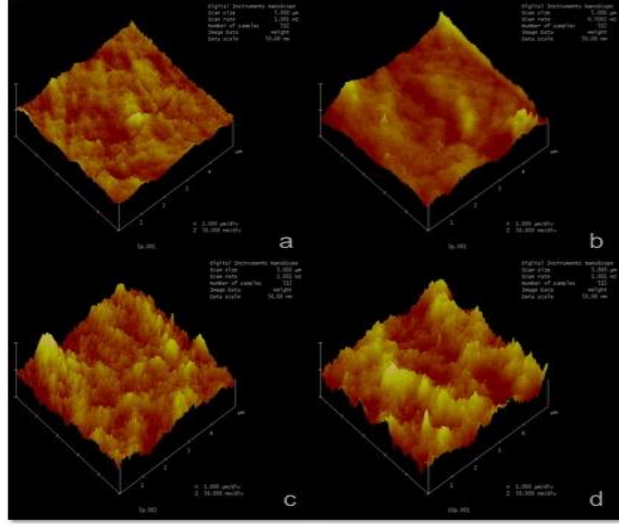


Şekil 37. Yüksek oranlarda POSS katkılı kitosan doku iskelelerinin 100X, 250X ve 500X büyütmelerde SEM görüntüleri: %20POSS (a); %40POSS (b)

Bunun yanısıra, AFM analizi sonuçları ile, POSS nanokafes yapı katkısının yüzeyde pürüzlülüğü artırarak hücreler için uygun tutunum ortamı sağladığı görülmüştür (Şekil 38). %10 POSS katkılı kitosan film yüzeyinde 9.54nm pürüzlülük elde edilmiştir (Tamburaci&Tihminlioglu 2017). %20 POSS konsantrasyonunda ise yüzeyde pürüzlülük artışı sağlanmış fakat POSS nanopartiküllerinde agglomerasyonlar da olduğu gözlenmiştir (Şekil 39).



Şekil 38. Farklı konsantrasyonlarda POSS katkısının kitosan yüzeyinde pürüzlülüğe etkisini gösteren üç boyutlu yüzey AFM görüntüleri: %1 POSS (a); %3 POSS(b); %5 POSS (c); %10 POSS(d)

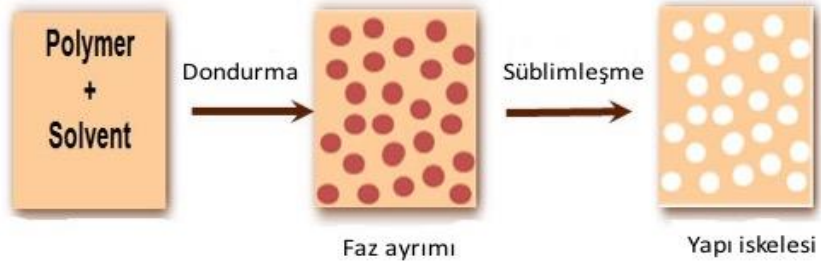


Şekil 39. AFM analizi ile elde edilen %20 POSS katkılı kitosan yüzeyinin yüzey (a) ve üç boyutlu yüzey (b) görüntüleri

Liyofilizasyon yöntemi ile gözenekli doku iskeleleri üretilmiştir (Şekil 40). Üretilen doku iskeleleri morfolojik, mekanik ve fiziksel olarak karakterize edilerek çalışmada kullanılacak en uygun homojenizasyon sistemi belirlenmiştir (Tablo 24).

Tablo 24. Farklı homojenizasyon teknikleri ile üretilen doku iskelesi grupları

Gruplar	Homojenizasyon Yöntemi
-Saf kitosan (kontrol)	Ultrasonik banyo (UB)
-Kitosan/POSS nanokompozit	Ultrasonik Homojenizatör (Sonikatör-UH) 15Amplitude
	Ultrasonik Homojenizatör (Sonikatör-UH) 35Amplitude
	Mikrofludizer MF (5000psi-3döngü)
	Mikrofludizer MF (5000psi-5 döngü)
	Mikrofludizer MF (10000psi-3 döngü)
	Mikrofludizer MF (10000psi-5 döngü)



Şekil 40. Dondurarak kurutma yöntemi ile üretim

4.4 Doku İskelelerinin Karakterizasyonu

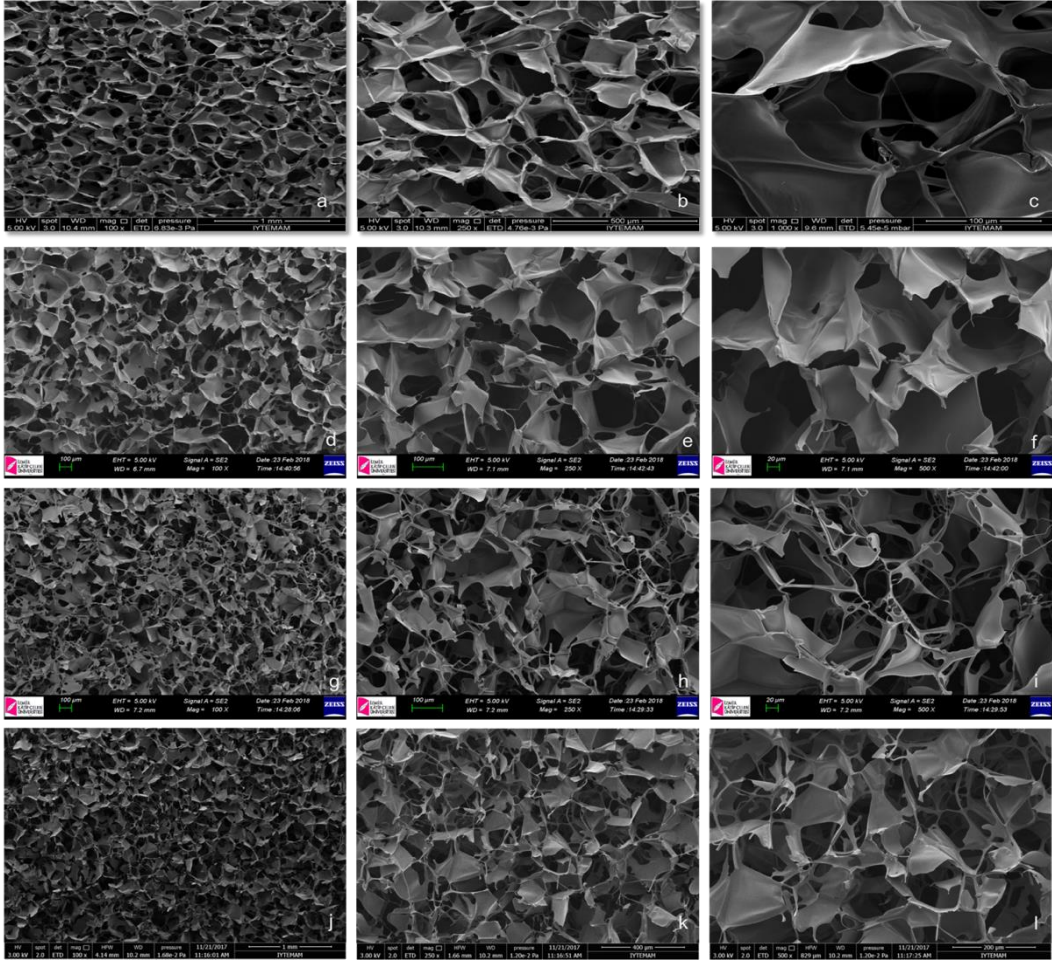
4.4.1 Morfoloji

SEM analizi ile doku iskelelerinin gözenekli yapısı incelenmiş ve elde edilen SEM görüntüleri Image J programında kullanılarak ortalama gözenek çapları belirlenmiştir. Tablo 25’ de farklı homojenizasyon teknikleri ile üretilmiş kitosan ve kitosan/POSS nanokompozit doku iskelelerinin ortalama gözenek çapları verilmiştir. SEM görüntülerinde liyofilizasyon yöntemi ile elde edilen doku iskelelerinin kemik yapısını taklit edebilen, besin ve gaz geçişini sağlayabilecek birbirleriyle bağlantılı açık gözenekli bir yapıda olduğu gözlenmiştir. Bunun yanısıra, gözenek boyutları damarlanma için uygun aralıktadır. Literatür çalışmalarında 75-250 μm aralığının kemik doku iskelelerinde optimum gözenek çapı olduğu belirtilmiştir (Cheung ve ark., 2007). Bunun yanısıra, minimum 100 μm hücre göçü ve transportu için uygun iken, 100 μm ’den büyük makro gözeneklerin de damarlanma ve kemik doku oluşumu için uygun olduğu sonucuna varılmıştır (Hutmacher ve ark., 2017; Bose ve ark., 2012). Bu çalışmada liyofilizasyon yöntemi ile üretilen doku iskelelerinin ortalama gözenek çapları (190-282 μm) literatür verileri ile uyum sağlamaktadır.

Şekil 41’de işlem görmemiş kitosan, ultrasonik banyo ve farklı iki şiddette (15-35 amplitude) ultrasonik homojenizatör ile işlem görmüş kitosan doku iskelelerinin SEM görüntüleri verilmiştir. SEM görüntüleri incelendiğinde, ultrasonik banyo ile işlem görmüş kitosan doku iskelelerinin kalın duvarlara sahip homojen gözenek yapısına sahip olduğu, işlem görmemiş kitosan doku iskeleleri ile benzer yapı sergilediği görülmüştür. Ultrasonik homojenizatör ile işlem görmüş doku iskelelerinin ise gözenek duvarlarının belli bölgelerde incelendiği gözenek yapısının homojen olmadığı gözlenmiştir. İşlem görmemiş kitosan doku iskelelerinin ortalama gözenek çapı 213 μm olarak ölçülmüştür. Kitosan doku iskelelerinin ultrasonik banyo ile homojenizasyon tekniği ile gözenek çapı yaklaşık 200 μm iken ultrasonik homojenizasyon ile gözenek duvarlarında incelmeye ve gözenek çaplarında artış (210-239 μm) gözlenmiştir.

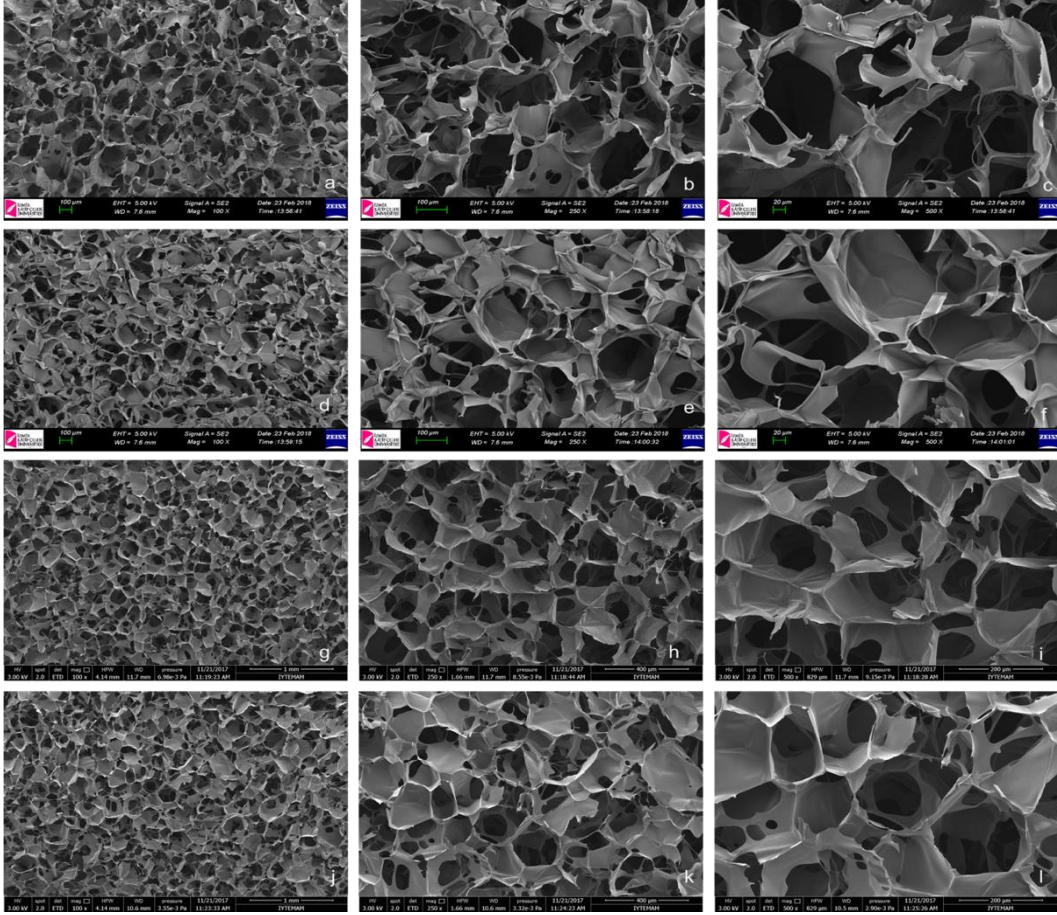
Tablo 25. Farklı homojenizasyon teknikleri ile üretilmiş kitosan ve kitosan/POSS nanokompozit doku iskelelerinin ortalama gözenek çapı

Kitosan Grupları	Ortalama Gözenek Çapı (μm)
İşlem Görmemiş Kitosan	213 \pm 44
Ultrasonik Banyo (UB)	199.2 \pm 56
Ultrasonik Homojenizatör (Sonikatör UH) 15 Amplitude	210.6 \pm 55.4
Ultrasonik Homojenizatör (Sonikatör UH) 35 Amplitude	239.8 \pm 52.3
Mikrofludizer MF (5000psi-3döngü)	234.8 \pm 72
Mikrofludizer MF (5000psi-5döngü)	221 \pm 42.2
Mikrofludizer MF (10000psi-3döngü)	277 \pm 41.2
Mikrofludizer MF (10000psi-5döngü)	281.1 \pm 42.8
Kitosan/POSS Grupları	Ortalama Gözenek Çapı (μm)
Ultrasonik Banyo (UB)	282.7 \pm 52.1
Ultrasonik Homojenizatör (Sonikatör UH) 15 Amplitude	281 \pm 67.3
Ultrasonik Homojenizatör (Sonikatör UH) 35 Amplitude	239.2 \pm 39
Mikrofludizer MF (5000psi-3döngü)	258 \pm 57.3
Mikrofludizer MF (5000psi-5döngü)	223.3 \pm 55.2
Mikrofludizer MF (10000psi-3döngü)	257 \pm 40.4
Mikrofludizer MF (10000psi-5döngü)	190.6 \pm 32.5



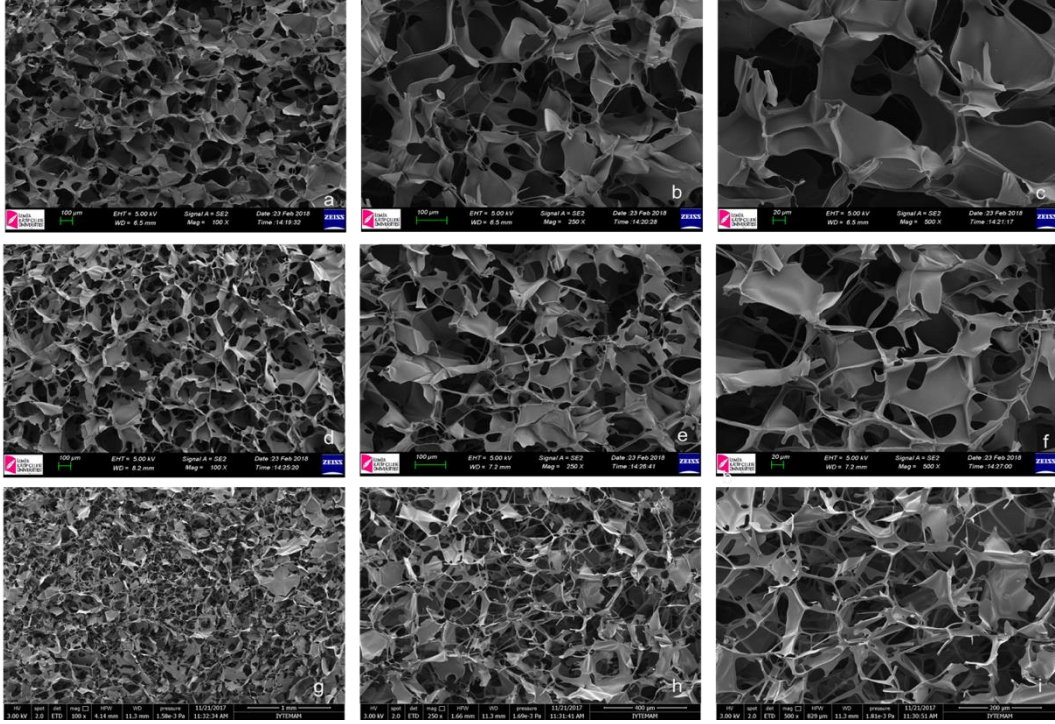
Şekil 41. Ultrasonik banyo ve ultrasonik homojenizatör ile hazırlanmış kitosan doku iskelelerinin 100X,250X ve 500X büyütmelemlerde SEM görüntüleri: İşlem görmemiş kitosan (a,b,c); ultrasonik banyo (d,e,f); Sonikatör-15Amp. (g,h,i); Sonikatör-35Amp. (j,k,l).

Şekil 42’de mikroludizer yöntemi ile homojenize edilmiş kitosan doku iskelelerinin SEM görüntüleri verilmiştir. Doku iskelelerinin SEM görüntülerine göre, 5000psi 3-5döngü ile homojenize edilmiş kitosan doku iskelelerinde yapının 10000psi 3-5döngü gruplarına göre daha deforme bir mikroyapıya sahip olduğu gözlenmiştir. Ancak, gözenek duvarlarında belirgin düzeyde bir farklılaşma gözlenmemiştir. Bu durum, mikroludizer yönteminin klasik sonikasyon yöntemlerine göre daha uniform bir mikroyapı elde edilmesinde avantaj sağlayacağını göstermiştir. Mikroludizer yönteminde, doku iskelelerinin gözenek çapları 5000 psi basınç 3-5 döngü’te 221-234 μm aralığında değişmekte iken, 10000 psi basınçta ise gözenek çapında 277-281 μm aralığında artış gözlenmiştir.



Şekil 42. Mikrofludizer yöntemi ile homojenize edilmiş kitosan doku iskelelerinin 100X, 250X ve 500X büyütmelede SEM görüntüleri: 5000psi 3 döngü (a,b,c); 5000psi 5 döngü (d,e,f); 10000psi 3 döngü (g,h,i); 10000psi 5 döngü (j,k,l).

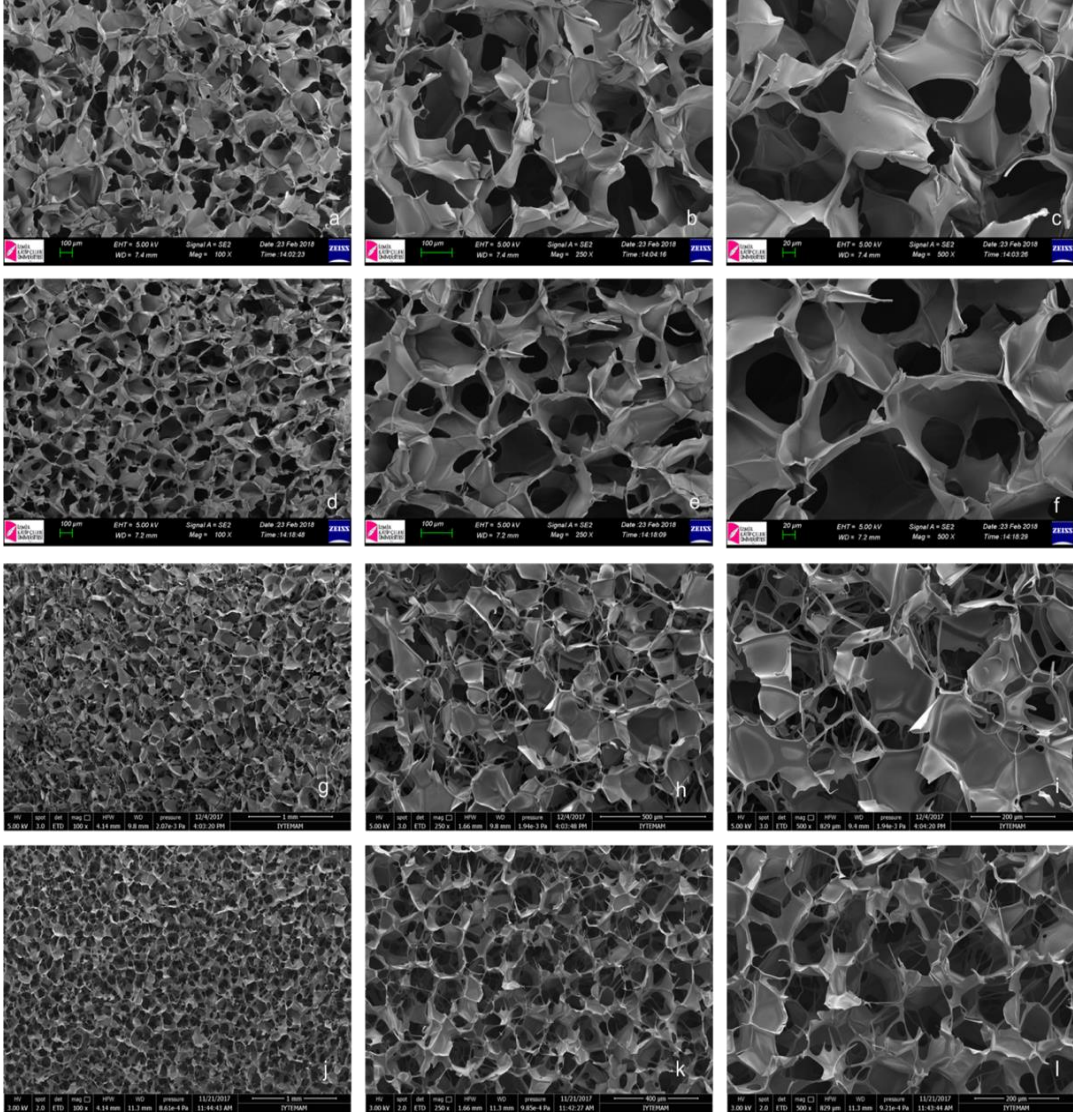
Şekil 43'de ultrasonik banyo ve ultrasonik homojenizatör ile hazırlanmış kitosan/POSS nanokompozit doku iskelelerinin SEM görüntüleri verilmiştir. SEM analizine göre, kitosan doku iskelelerinde elde edilen yapıya benzer şekilde ultrasonik banyo ön işleminden geçirilmiş nanokompozit doku iskelelerinin yapısında belirgin bir değişiklik olmamıştır. Benzer şekilde, ultrasonik homojenizatör ile ön işlemden geçirilen kitosan/POSS nanokompozit doku iskelelerinin gözenek duvarlarında bozulma ve incelmeler meydana gelmiştir. Bu durum mikroyapının homojenliği etkileyerek yapıda çökmelere neden olmuştur.



Şekil 43. Ultrasonik banyo ve ultrasonik homojenizatör ile hazırlanmış kitosan/POSS nanokompozit doku iskelelerinin 100X,250X ve 500X büyütme SEM görüntüleri: Ultrasonik banyo (a,b,c); Sonikatör-15Amp. (d,e,f); Sonikatör-35Amp. (g,h,i).

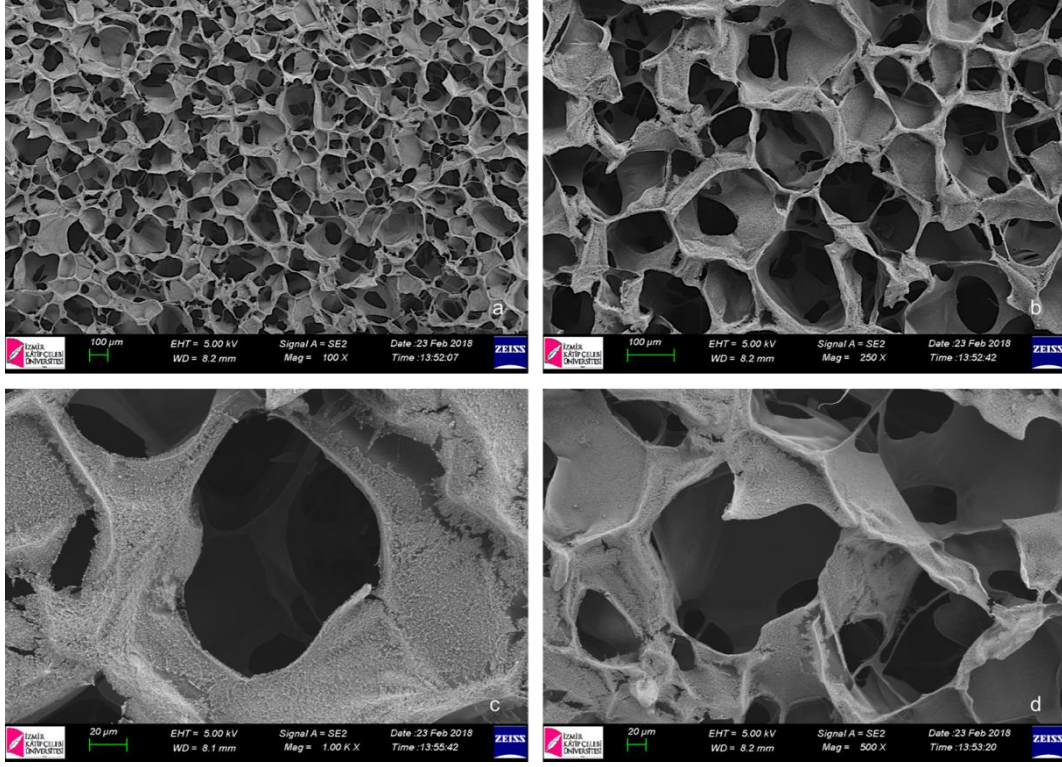
Şekil 44'de mikrofluidizer ile ön işlemden geçirilmiş kitosan/POSS nanokompozit doku iskelelerinin SEM görüntüleri incelendiğinde, 5000 psi 3 döngü işleminden geçmiş doku iskelelerinin gözenek duvarlarında kırılmalar ve homojen olmayan bir mikro yapı gözlenirken, 5000 psi 5 döngü'de daha düzgün bir mikro yapı elde edilmiştir. 10000psi basınçta ise, duvarlarda incelmeler ve non-uniform bir yapı elde edilmiştir. Saf kitosan doku iskelelerinden farklı olarak mikro yapıda bozulmalar gözenek duvarlarında uzamalar meydana gelmiştir. Bunun nedeni POSS katkısının kitosan polimer çözeltisinin viskozitesini azaltması olarak düşünülmektedir. Düşük viskoziteli nanokompozit çözeltide liyofilizasyon aşamasında daha büyük buz kristalleri oluşmakta ve gözenek duvarlarının kalınlığı azalmaktadır.

Kaplama ön çalışmalarında liyofilizasyon yöntemi ile üretilen doku iskelelerinin yüzeyi elektrosprey yöntemi kullanılarak gentamisin yüklü kitosan/kil (MMT) nanokürelerle kaplanmıştır. Şekil 45'de nanoküre kaplı doku iskelelerinin SEM görüntüleri verilmiştir. SEM görüntülerinde, doku iskelesi yüzeyinin gözenek açıklığını etkilemeden ve gözenek duvarlarının yapısını bozmadan, başarılı bir şekilde nanokürelerle kaplandığı görülmüştür. Şekil 44 (c,d)' de gözenek duvarlarının homojen bir şekilde kürelerle kaplandığı gösterilmiştir.

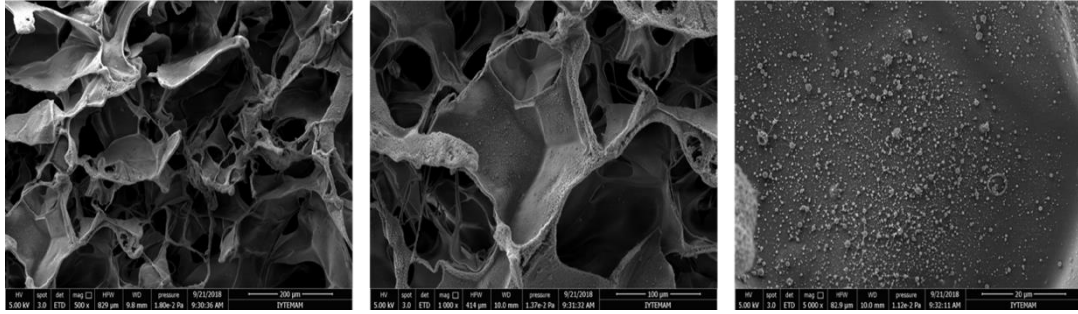


Şekil 44. Mikrofludizer yöntemi ile homojenize edilmiş kitosan/POSS nanokompozit doku iskelelerinin 100X, 250X ve 500X büyütmelede SEM görüntüleri: 5000psi 3 döngü (a,b,c); 5000psi 5 döngü (d,e,f); 10000psi 3 döngü (g,h,i); 10000psi 5 döngü (j,k,l).

Çalışmalarda kullanılmak üzere üç farklı hacimde antibiyotik yüklü kitosan/kil(MMT) çözeltisi hazırlanarak farklı kalınlıklarda doku iskelelerinin yüzeyi kaplanmıştır. SEM analizi ile yüzey kaplamaları incelendiğinde (Şekil 46-51), 2ml hacimde nanoküreler komojen bir şekilde yüzeyi kaplayarak doku iskelesi yüzeyine entegre olmuştur (Şekil 46) Nanoküre çözelti hacmi arttırıldığında nanoküreler yüzeyde belli bölgelerde agglomer olarak kaplanmıştır. Sonuç olarak, vankomisin ve gentamisin yüklü küreler kompozit doku iskelesi yüzeyine başarılı bir şekilde entegre edilmiştir.



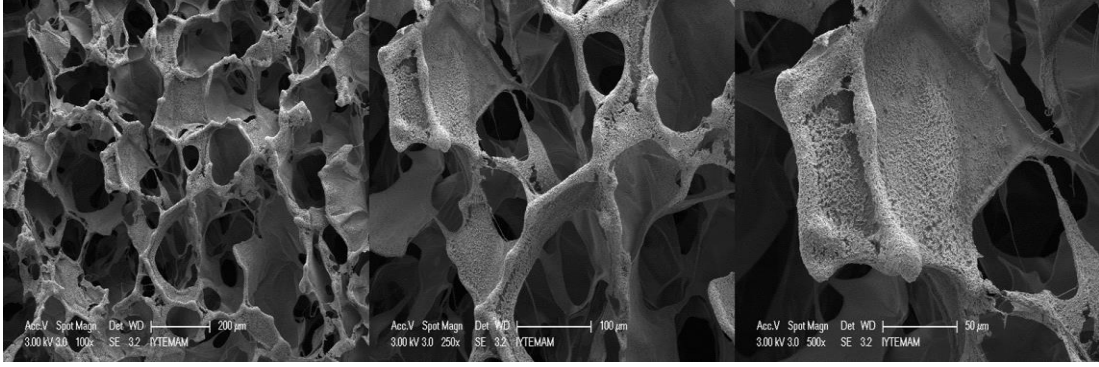
Şekil 45. İlaç yüklü kitosan/kil (MMT) nanoküre kaplı kitosan/POSS doku iskelelerinin farklı büyütmelerde SEM görüntüleri: 100X (a); 250X (b); 500X (c); 1000X (d).



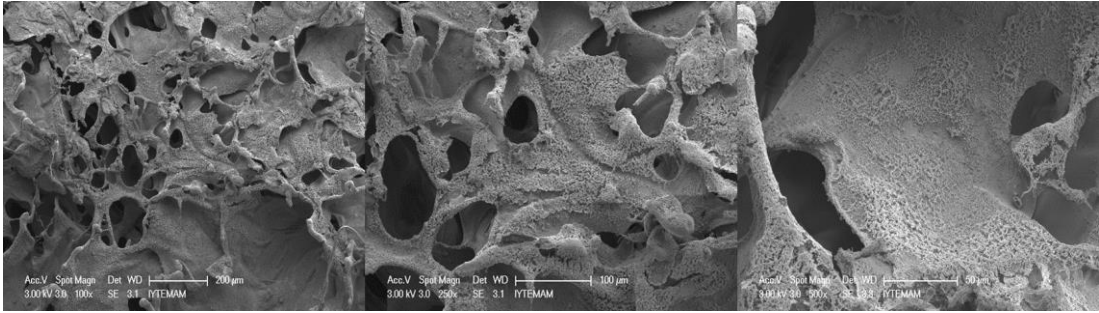
Şekil 46. Vankomisin yüklü kitosan/MMT nanoküre kaplı doku iskelesi (2ml kaplama)



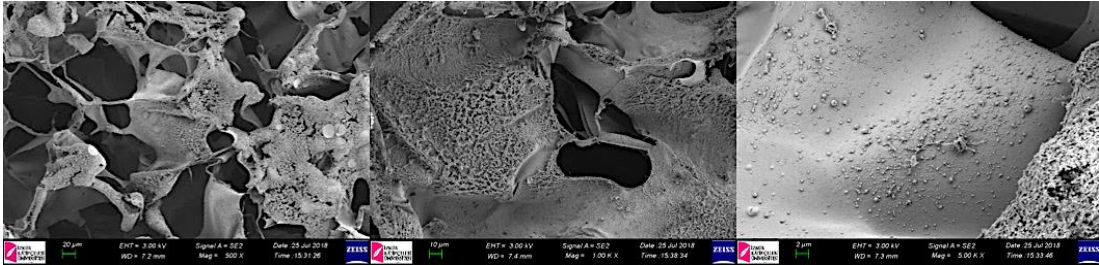
Şekil 47. Gentamisin yüklü kitosan/kil nanoküre kaplı doku iskelesi (2ml kaplama)



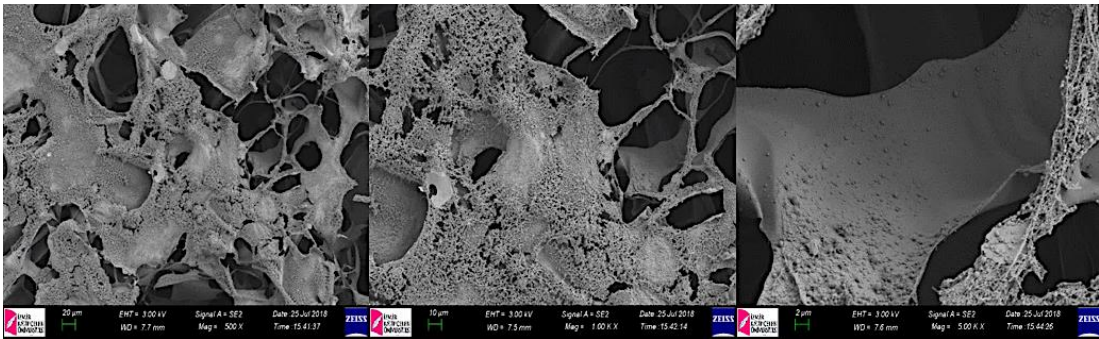
Şekil 48. Vankomisin yüklü kitosan/kil nanoküre kaplı doku iskelesi (5ml kaplama)



Şekil 49. Gentamisin yüklü kitosan/kil nanoküre kaplı doku iskelesi (5ml kaplama)



Şekil 50. Vankomisin yüklü kitosan/kil nanoküre kaplı doku iskelesi (7ml kaplama)



Şekil 51. Gentamisin yüklü kitosan/kil nanoküre kaplı doku iskelesi (7ml kaplama)

4.4.2 Toplam Gözeneklilik ve Mikro Yapı

Doku iskelelerinin açık gözeneklilik yüzdesi sıvı değişim yöntemi ile, toplam gözenekliliği ve üç boyutlu mikro yapısı ise mikro CT analizi ile belirlenmiştir. Tablo 26'da kitosan ve kitosan/POSS doku iskeleleri için elde edilen açık gözeneklilik

değerleri verilmiştir. Liyofilizasyon tekniği ile üretilen doku iskelelerinde %70-85 aralığında açık gözeneklilik elde edilmiştir. Bu değerler %50-90 gözenekli yapıda olan trabeküler kemik dokunun taklit edilebilmesi için yeterlidir (Costa-Pinto ve ark., 2011). Gözeneklilik değerlerine göre, liyofilizasyon tekniği ile üretilen doku iskelelerinin açık gözenek yüzdesi %70-85 aralığında değişmiştir. Ultrasonik banyo ve ultrasonikatör ile homojenize edilen çözeltilerle üretilen doku iskelelerinde %74-82 aralığında yüksek gözenekliliğe sahip bir yapı gözlenmiştir. Mikrofludizer ile homojenizasyonu yapılan çözeltilerde ise, en yüksek açık gözeneklilik 10000psi-3 döngü ve 5000psi-3 döngü grubunda elde edilmiştir. Mikrofludizer ile homojenizasyon yönteminde döngü (döngü) sayısı arttıkça yapının gözenekliliğinde azalma meydana geldiği görülmüştür. Tüm gruplar ele alındığında, bu gözeneklilik değerleri kemiğin yapısını taklit edecek bir doku iskelesinde besin-sıvı geçişi ve damarlanma için yeterlidir.

Tablo 26. Farklı homojenizasyon teknikleri kullanılarak hazırlanan kitosan ve kitosan/POSS doku iskelelerinin açık gözeneklilik yüzdeleri

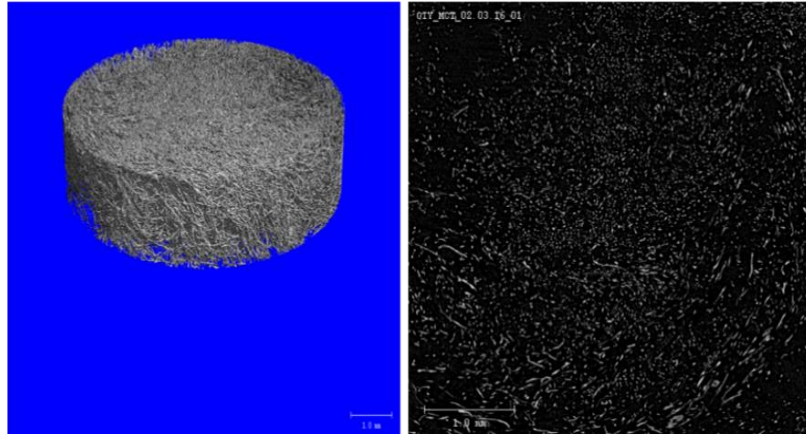
Kitosan Grupları	Açık Gözeneklilik (%)
Ultrasonik Banyo (UB)	74 ± 12
Ultrasonik Homojenizatör (Sonikatör UH) 15 Amplitude	74.3 ± 12.3
Ultrasonik Homojenizatör (Sonikatör UH) 35 Amplitude	82.7 ± 5.5
Mikrofludizer MF (5000psi-3 döngü)	76.2 ± 9.5
Mikrofludizer MF (5000psi-5 döngü)	70 ± 4.8
Mikrofludizer MF (10000psi-3 döngü)	85 ± 1.1
Mikrofludizer MF (10000psi-5 döngü)	73.8.3 ± 7
Kitosan/POSS Grupları	Açık Gözeneklilik (%)
Ultrasonik Banyo (UB)	77.5 ± 8
Ultrasonik Homojenizatör (Sonikatör UH) 15 Amplitude	75 ± 6.1
Ultrasonik Homojenizatör (Sonikatör UH) 35 Amplitude	78.3 ± 2.4
Mikrofludizer MF (5000psi-3 döngü)	76.7 ± 2.4
Mikrofludizer MF (5000psi-5 döngü)	70 ± 9.4
Mikrofludizer MF (10000psi-3 döngü)	81 ± 1.6
Mikrofludizer MF (10000psi-5 döngü)	71 ± 6.3

Mikro CT analizi ile doku iskelelerinin üç boyutlu yapısı incelenmiş ve toplam gözenek yüzdesi belirlenmiştir. Mikro tomografi analizine göre, üretilen kitosan doku iskeleleri yüksek gözeneklilikte (%87.5-89.8), birbiri ile bağlantılı gözeneklerden oluşan bir mikro yapıya sahiptir. Şekil 51’de ön işlem görmemiş saf kitosan doku iskelelerinin micro ct analizi ile elde edilen üç boyutlu yapısı ve enine kesit görüntüsü verilmiştir. İşlem görmemiş kitosan mikro Ct görüntüleri incelendiğinde yapının çevresel kısımlarında tabakalanmalar gözlenirken, iç kısımlarında daha kompakt gözenek morfolojisi elde edilmiştir. Enine kesit alanı görüntüsünde ise yapıdaki gözenekler arası bağlanmanın zayıf ve uniform olmadığı gözlenmiştir (Şekil 52).

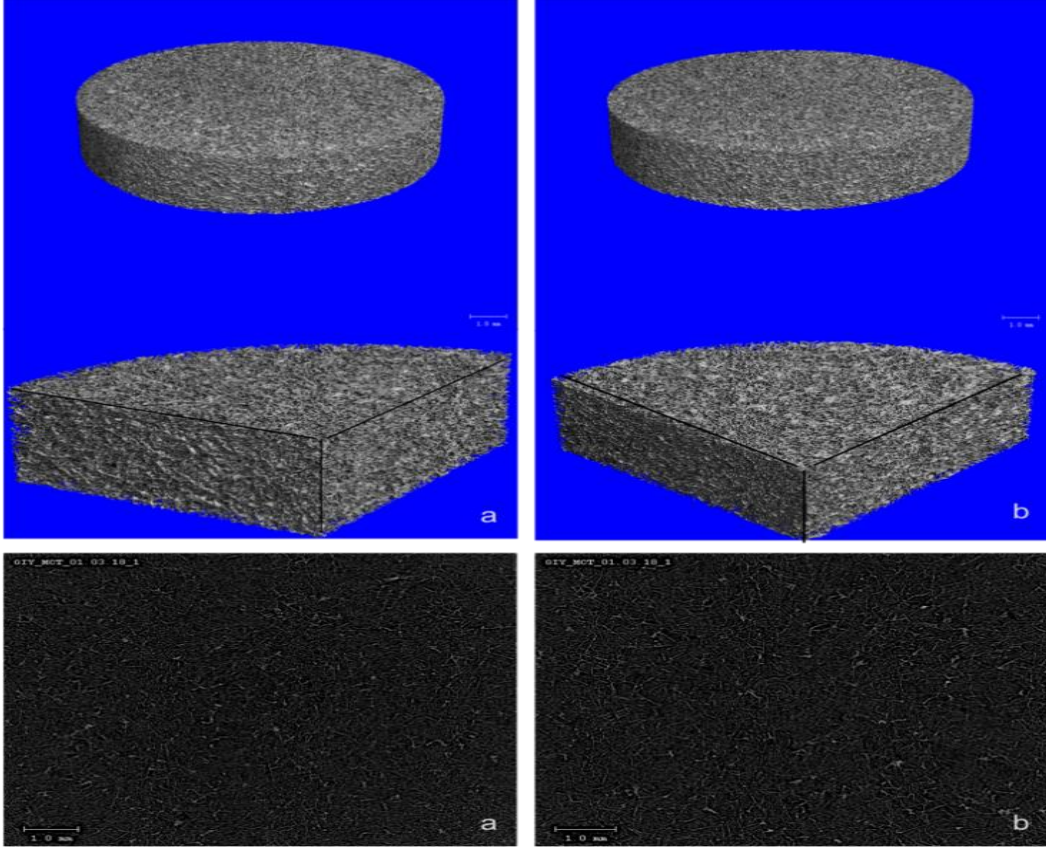
Şekil 53 ve 54’te ise homojenizasyon işlemine tabi tutulmuş kitosan doku iskelelerinin üç boyutlu yapıları, yapı içerisinde dilimlenmiş kesitler ve enine kesitleri verilmiştir. Micro CT görüntüleri incelendiğinde, farklı tekniklerle homojenize edilen doku iskelelerinin mikro yapılarının, birbiri ile bağlantılı açık gözeneklerden ve yol izlerinden oluştuğu görülmektedir. Ayrıca doku iskelesi içerisinde alınan dilim kesitlerde mikro yapının iç kısımlarda da değişmediği ve homojen yapı elde edildiği gözlenmiştir. Enine kesit görüntülerinde ise, gözenek duvarlarının bağlantılı olarak devam ettiği ve yüksek gözenekliliğe sahip bir yapı elde edildiği belirlenmiştir. Klasik sonikasyon yöntemleri ile elde edilen gruplarda gözenekler arası bağlantılar daha küçük ve zayıf iken (Şekil 53. a-b), mikrofludizer yöntemi ile homojenize edilen örneklerde bağlantılar daha belirgin ve dallanmış olarak gözlenmiştir (Şekil 54. a,b,c). Bu mikro yapı doku iskelelerinde besin–sıvı taşınımında ve damarlanma açısından avantaj sağlamaktadır. Tablo 27’de farklı homojenizasyon işlemlerine tabi tutulmuş kitosan doku iskelelerinin gözeneklilik yüzdeleri verilmiştir. Farklı homojenizasyon yöntemleri ile hazırlanan kompozit doku iskelelerinin gözeneklilik oranları kemik doku oluşumu için istenen yüksek gözeneklilik oranlarında %89-89.8 aralığında bulunmuştur. Dolayısı ile, çalışılan homojenizasyon yöntemlerinin gözeneklilik üzerinde olumsuz bir etkisi bulunmamıştır.

Tablo 27. Farklı homojenizasyon teknikleri hazırlanan kitosan doku iskelelerinin Micro CT analizi ile ölçülen gözeneklilik yüzdeleri

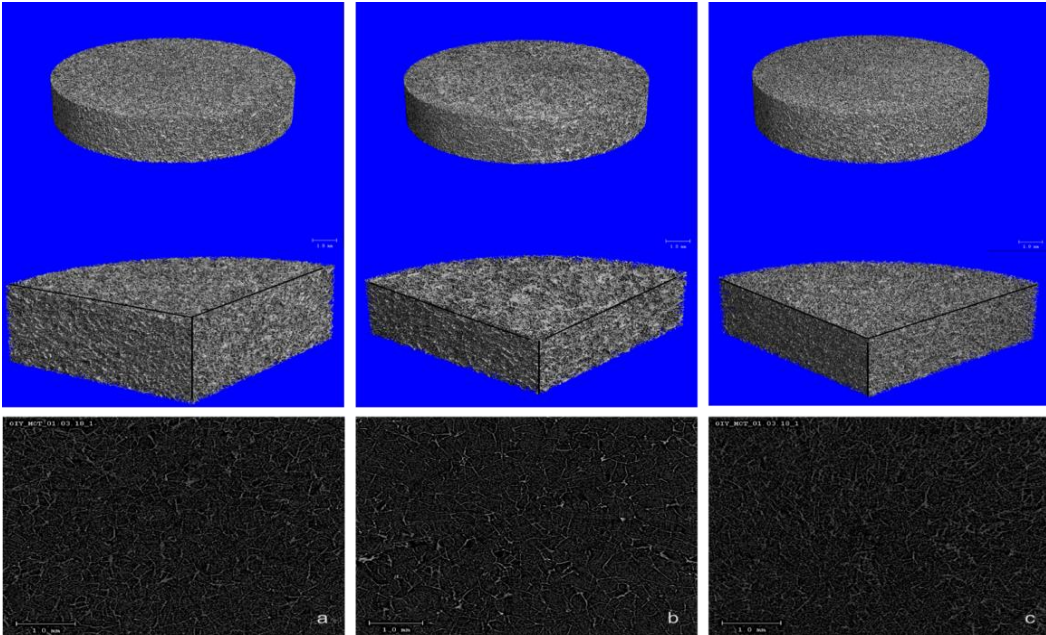
Kitosan Grupları	Toplam Gözeneklilik (%)
İşlem Görmemiş	87.5
Ultrasonik Banyo (UB)	89.3
Ultrasonik Homojenizatör (Sonikatör UH) 15 Amplitude	89.6
Mikrofludizer MF (5000psi-3 döngü)	89.8
Mikrofludizer MF (5000psi-5 döngü)	89
Mikrofludizer MF (10000psi-3 döngü)	89.5



Şekil 52. İşlem görmemiş kitosan doku iskelelerinin mikro tomografi analizi ile elde edilen üç boyutlu yapılarının görüntüleri ve kesit alanları



Şekil 53. Kitosan doku iskelelerinin mikro tomografi analizi ile elde edilen üç boyutlu yapılarının görüntüleri ve kesit alanları: kitosan ultrasonik banyo (a); sonikasyon-15Amp. (b)

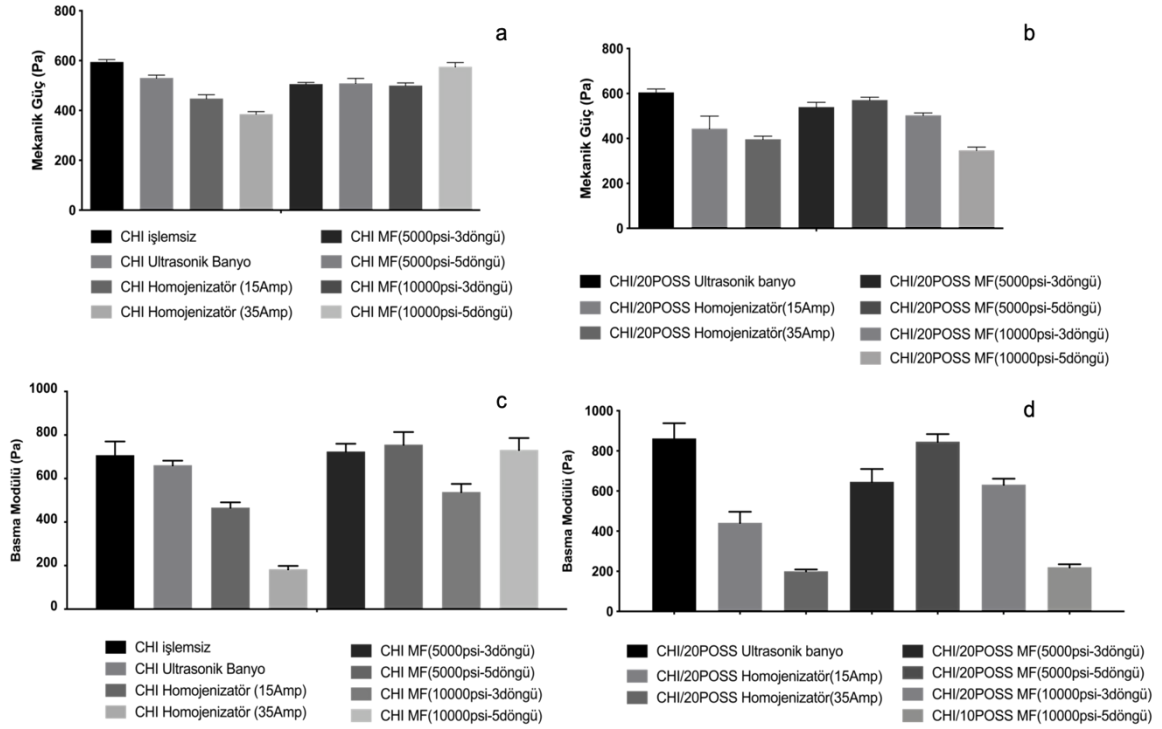


Şekil 54. Kitosan doku iskelelerinin mikro tomografi analizi ile elde edilen üç boyutlu yapılarının görüntüleri ve kesit alanları: 10000psi 3 döngü (a); 5000psi 3 döngü (b); 5000psi 5 döngü (c).

4.4.3 Mekanik Özellikler

Yapılan mekanik testler ile farklı homojenizasyon tekniklerinin doku iskelelerinin basma dayanımı ve modulus değerleri üzerindeki etkisi belirlenmiştir (Şekil 55). Homojenizasyon parametrelerinin yanısıra, POSS nanopartiküllerin kitosan polimer matriksin mekanik özelliklerini iyileştirdiği görülmüştür.

Ultrasonik banyo ile ön işlem den geçirilmiş kitosan doku iskelelerinin basma modül değerleri (661.7Pa) işlem den geçirilmemiş kitosan doku iskeleleri (707.8Pa) ile benzer mekanik özellikleri sergilemiştir. Elde edilen sonuçlara göre, farklı şiddetlerde (15-35Amp.) uygulanan sonikasyonun mekanik özellikleri olumsuz etkileyerek basma modülünde 707.8Pa'dan 466.6 Pa ve 183.2Pa'a düşmüştür. SEM analizinde belirlenen mikroyapılar mekanik test sonuçları ile paralellik göstermiştir. Ultrasonikasyon ile hazırlanan doku iskelelerinde mikroyapıdaki asimetrik dağılımın mekanik mukavemeti olumsuz yönde etkilediği gözlenmiştir. Mikrofludizer sisteminde ise 5000psi basınçta kitosan doku iskelelerinin mekanik özelliklerini ciddi bir şekilde etkilemediği basma modül değerleri (724.3-755.7Pa), 10000psi basınç değerine çıkarıldığında ise mekanik özelliklerin zayıfladığı belirlenmiştir. Her iki basınçta da döngü sayısı arttıkça yapının homojenitesi olumlu etkilendiği için basma mukavemetinde artış gözlenmiştir. Kitosan/POSS nanokompozit grupları değerlendirildiğinde, en yüksek basma mukavemeti ultrasonik banyo grubunda gözlenirken (862.4Pa) sonikasyonun mekanik özellikleri olumsuz etkilediği belirlenmiştir (441.6-200.3Pa). Bunun nedeni, sonikasyon ile viskositenin ciddi oranda düşmesi, buna bağlı olarak SEM analizinde gözlenen mikroyapıdaki düzensiz gözenek dağılımı ve duvar yapısının oluşmasıdır. Mikrofludizer çalışma parametreleri değerlendirildiğinde ise, 5000psi basınçta döngü sayısının 3'ten 5'e artışının POSS nanopartiküllerin yapı içinde dağılımını ve yapının homojenitesini sağlayarak mekanik özellikleri iyileştirdiği gözlenmiştir (645.8-846.1Pa). 10000psi basınçta ise, mekanik mukavemetin düştüğü ve döngü sayısı arttıkça mekanik özelliklerin ciddi bir şekilde zayıfladığı belirlenmiştir. POSS katkısı ve yüksek basınçta (10000psi) homojenizasyon kitosan polimer çözeltisinin viskositesini ciddi oranda düşürerek yapının mekanik özelliklerini zayıflatmıştır. 10000psi 3 döngü'de basma mukavemeti 631.7Pa iken 5 döngü'de 220.4Pa'a düşmüştür.

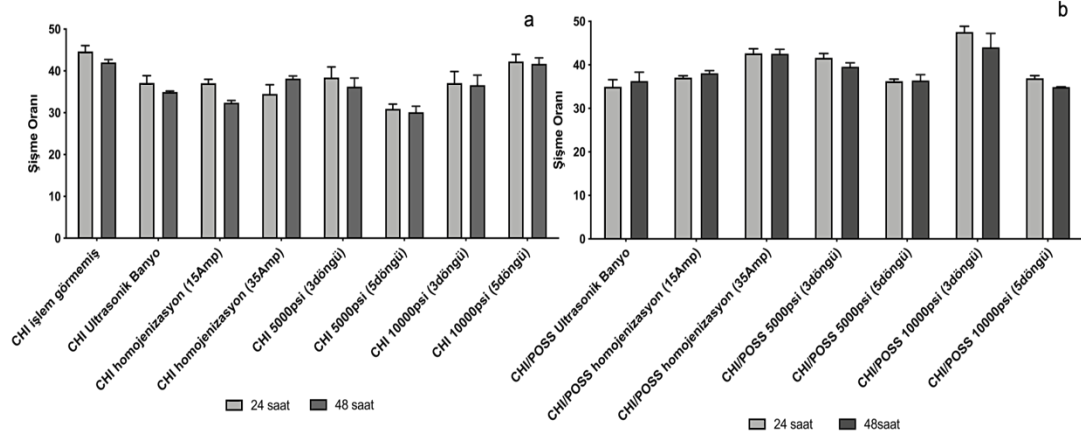


Şekil 55. Farklı homojenizasyon teknikleri ile üretilen doku iskelelerinin basma modülü ve mekanik dayanım değerleri: kitosan grupların mekanik özellikleri (a,c); POSS katkılı nanokompozit grupların mekanik özellikleri (b,d).

4.4.4 Fiziksel ve Kimyasal Özellikler

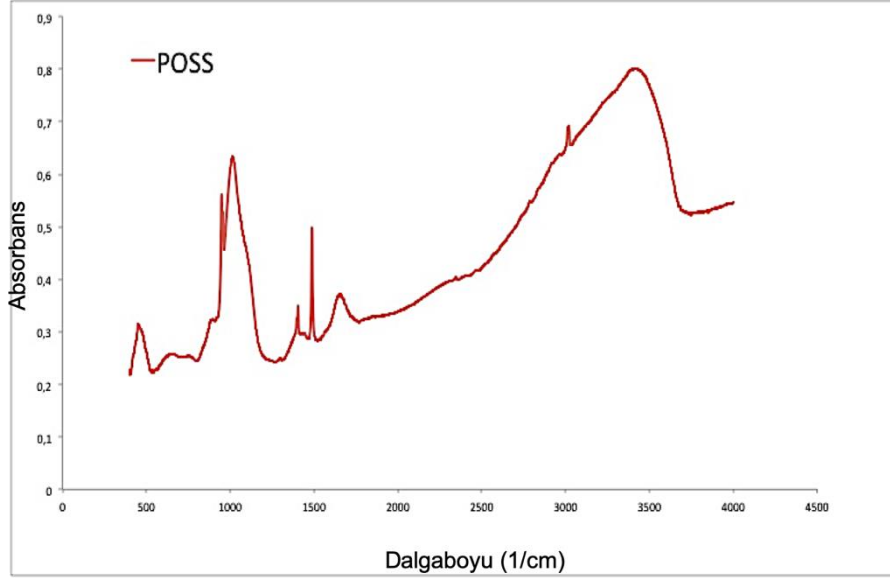
Doku iskelelerinin su tutma kapasiteleri şişme testi ile ölçülmüştür. Şekil 56'te kitosan ve kitosan/POSS doku iskelelerinin 24 ve 48 saat inkübasyon sürelerinde şişme oranları verilmiştir. İşlem görmemiş kitosanın şişme oranı 44.6 iken ultrasonik yöntemlerle doku iskelelerinin şişme oranları 37-37.5 aralığında değişmiştir. Mikrofludizer ön işlemi ile elde edilmiş doku iskelelerinde 5000psi basınçta şişme oranları 30-38.4 aralığında ölçülmüş, 10000psi basınçta ise artış göstererek 37-42.3 aralığında ölçülmüştür. Mikrofludizer sisteminde basınç ve döngü artışı ile gözenek duvarlarında meydana gelen incelmeler ile birlikte doku iskelelerinin su tutma kapasiteleri artmıştır. Kitosan/POSS doku iskelelerinde ise, ultrasonik yöntemlerle homojenize edilen gruplarda şişme oranları 35-42.6 aralığında ölçülmüştür. Şişme oranlarında saf kitosan gruplarına kıyasla gözlenen artışın nedeni, silika bazlı POSS nanopartiküllerinin kitosanın sıvı tutma kapasitesini arttırmasıdır. Mikrofludizer ön işlemi ile elde edilmiş nanokompozit doku iskelelerinde 5000psi basınçta şişme oranları 36-41.6 aralığında iken 10000psi basınçta 37-47.5 aralığında ölçülmüştür.

Doku iskelelerinin sıvı absorpsiyon kapasiteleri zamana bağlı olarak sonuç olarak ciddi oranda bir değişim göstermemiştir. Bu sebeple ilk 48 saat içinde absorplanan sıvının önemli ölçüde kaybı olmadığı belirlenmiştir.

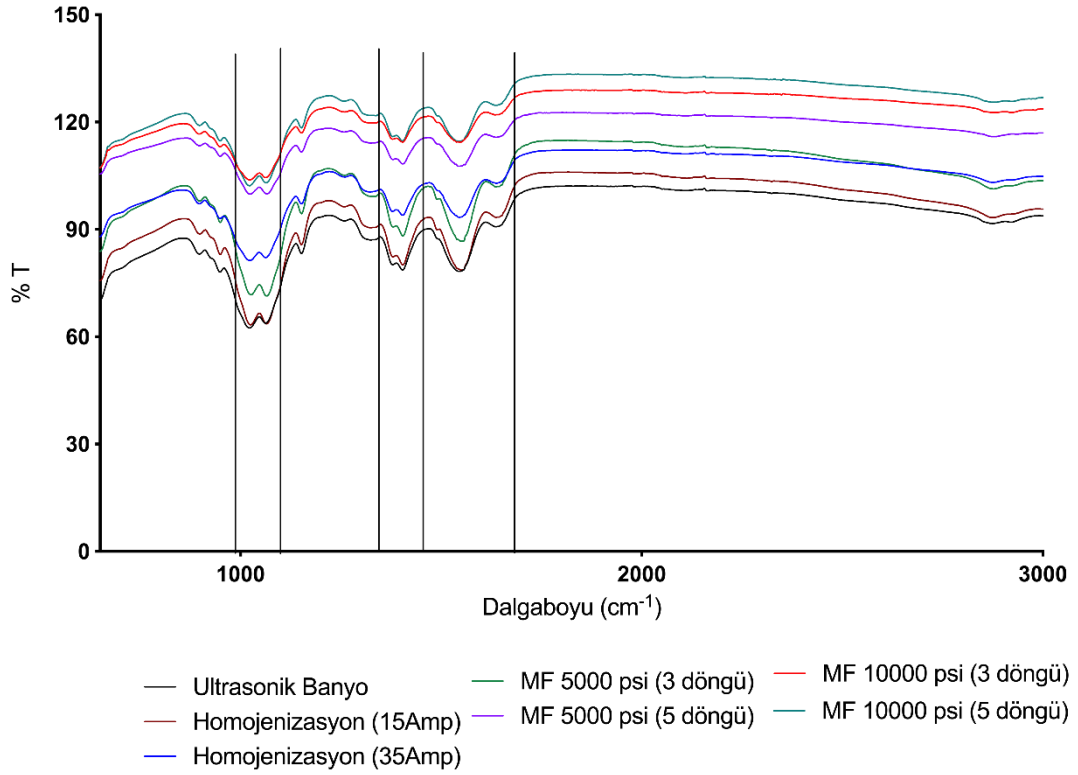


Şekil 56. Kitosan (a) ve kitosan/POSS nanokompozit (b) doku iskelelerinin 24 ve 48 saat inkübasyon sonrasında şişme oranları.

Doku iskelelerini oluşturan kitosan polimer matris ve POSS nanopartiküllerin yapı içindeki kimyasal bağlarının belirlenmesi için fourier transform infrared spektroskopisi (FTIR) analizi gerçekleştirilmiştir. Si-O kafes yapıdan oluşan ve okta metilammonyum reaktif grupları içeren POSS nanopartiküllerinin Si-O-Si gerilme bantları 1020-1070 cm^{-1} ve 1150 cm^{-1} 'de görülmüştür (Şekil 57). Reaktif metilammonyum gruplarının absorpsiyon pikleri ise 1400-1655 cm^{-1} aralığında görülmüştür. FT-IR analiz sonuçlarına göre POSS nanokafes yapıların karakteristik bantlarında uygulanan homojenizasyon işlemine göre pik şiddetlerinde değişim gözlenmiştir. Mikrofludizer sisteminde yüksek basınç ve ultrasonik sonikasyon sisteminde yüksek şiddet uygulamalarında; pik şiddetlerinin azaldığı gözlenmiştir. MF-5000psi, 15Amp sonikasyon ve ultrasonik banyo ön işlemlerinde ise POSS'un yapısındaki Si-O kafes yapı ve organik grupların yapısında olumsuz etki gözlenmemiştir (Şekil 58).



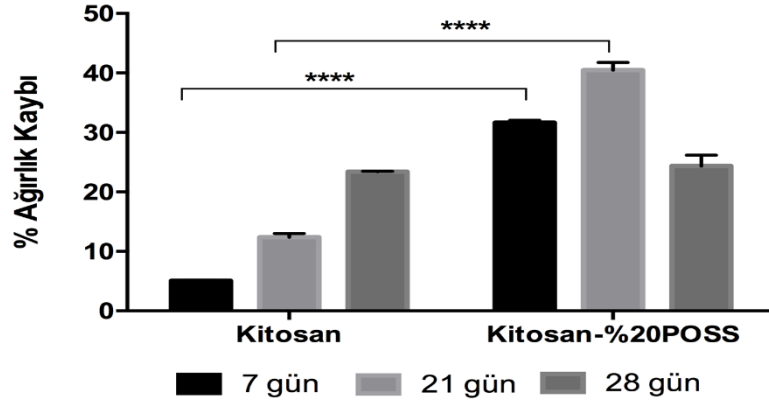
Şekil 57. Okta-TMA POSS nanokafes yapıların FT-IR analizi sonucu elde edilen özgün pikleri



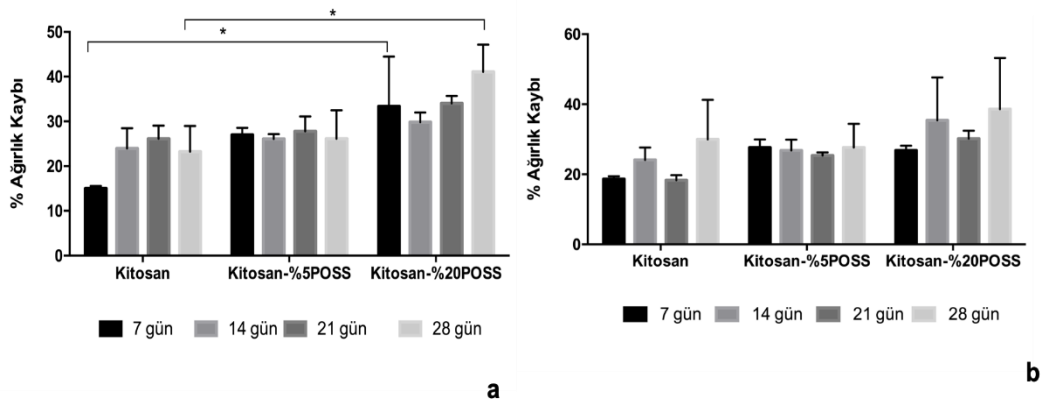
Şekil 58. Farklı homojenizasyon teknikleri ile hazırlanan doku iskelelerinin FT-IR analizi

4.4.5 Kitosan/POSS Doku İskelelerinin ve Antibiyotik Yüklü Nanoküre Kaplı Kitosan/POSS Doku İskelelerinin Biyobozunum Davranışı

Doku iskelelerinin biyobozunum sonuçları incelendiğinde, kitosan kontrol gruplarında zamana bağlı aşamalı olarak 7 günde %5, 28 günde ise-%23 ağırlık kaybı gözlenmiştir (Şekil 59). POSS katkılı kitosan gruplarında ise, ağırlık kaybı artışı daha fazla olmuştur. 7. ve 14 günün sonunda sırasıyla, %31 ve %40 ağırlık kaybı gözlenlenmiştir. Bunun nedeninin POSS nanosilika partiküllerinin yüzeyden ortama çözünerek karışması, POSS nanopartiküllerinin degradasyonu hızlandırıcı bir etki yaratması olarak değerlendirilmiştir. Ancak, 28 gün sonunda ağırlık kaybında azalan bir trend gözlenmiştir. Ortama salınan POSS nanosilika partiküllerinin yüzeyde mineral birikimini arttığı biyomineralizasyon çalışmaları ile görülmektedir ve bu nedenle ağırlık kaybı azalmasına neden olduğu düşünülmektedir. Gruplar arasındaki ağırlık kaybı farkları istatistiksel olarak anlamlı bulunmuştur.



Şekil 59. Doku iskelelerinin zamana karşı biyobozunum testi

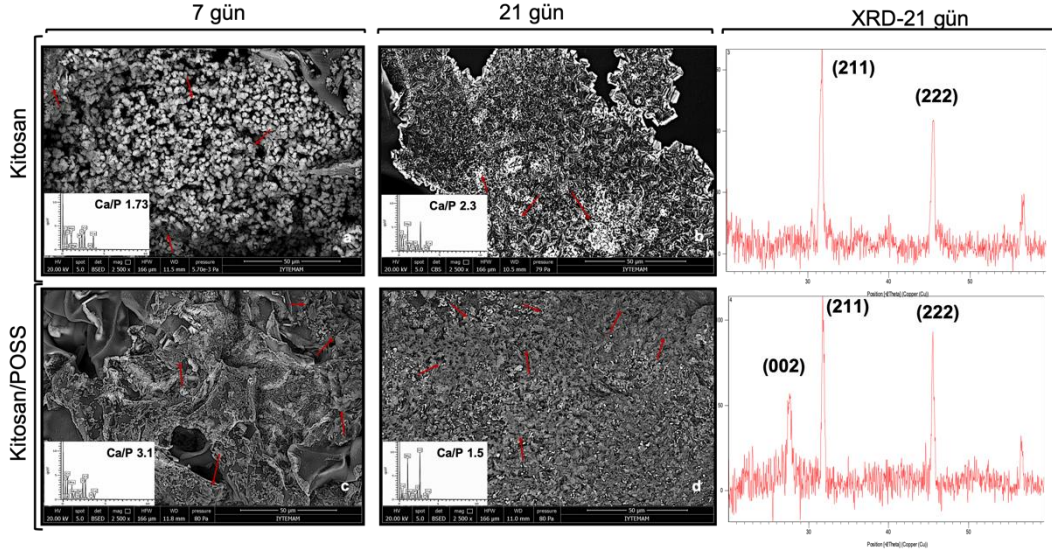


Şekil 60. Çift tabakalı doku iskelelerinin zamana karşı biyobozunum testi; a) vankomisin yüklü nanokompozit küre kaplı doku iskelesi, b) gentamisin yüklü nanokompozit küre kaplı doku iskelesi

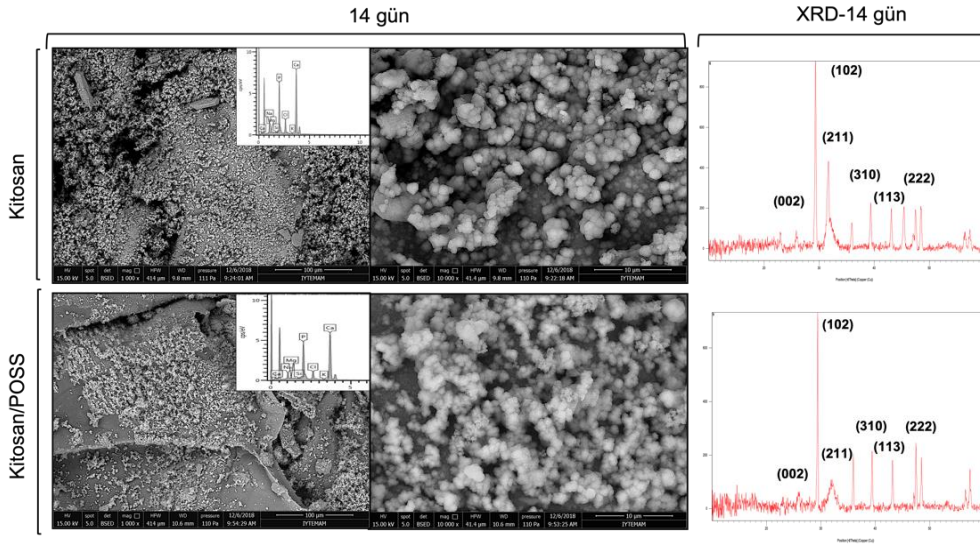
Sonuç olarak, doku iskelesi tasarımıda önemli olan fizikokimyasal parametreler incelendiğinde, (morfoloji, kimyasal yapı, gözeneklilik ve mekanik özellikler) yapılan tüm karakterizasyon çalışmaları sonucunda, mikrofludizer sisteminin homojenizasyon için uygun olduğu ve **5000psi 5 döngü** çalışma şartlarının kitosan/POSS nanokompozit doku iskelelerinin üretimi için en uygun şartları olduğu belirlenmiştir. Antibiyotik yüklü nanoküre kaplı doku iskelesi üretiminde bu şartlar göz önünde bulundurularak üretim ve karakterizasyon yapılmıştır.

4.4.6 Kitosan/POSS Doku İskeleleri Yüzeyinde Biyomineralizasyon

POSS katkılı kompozit doku iskelelerinde kitosan kontrol gruba göre daha belirgin bir mineral oluşumu gözlenmiştir. Yüzeyde kalsiyum birikimi fosfat birikimine göre daha fazla gözlenmiştir ve XRD analizi ile 21. Günde Ca-P oluşumuna ait pikler elde edilmiştir (Şekil 61). 10x SBF ile yapılan hızlandırılmış mineralizasyon çalışmasında ise 14. günde kompozit yüzeyindeki Ca/P birikiminin globüler hidroksiapatit oluşumuna dönüştüğü gözlenmiştir. XRD analizi ile hidroksiapatite ait karakteristik pikler görülmüştür (Şekil 62). Bunun nedeni, POSS nanopartiküllerinin silika kafes yapıları ile kalsiyum-silikat oluşumunu tetiklemesidir. POSS' un yapısındaki silika ağların parçalanması ile Si-OH grupları kompozit yüzeyi ile SBF sıvısı arasında apatit oluşumunu tetikleyen bir arayüzey oluşturmuştur. Bu silanol grupları kalsiyum-fosfat oluşumu için uygun bağlanma bölgelerine sahiptir ve önce kalsiyum iyonlarını bağlayıp sonrasında kritik boyutu aşarak fosfat gruplarını adsoplarlar (Sowjanya ve ark., 2013; Kavya ve ark., 2013). Benzer literatür çalışmalarında Si-OH gruplarının kalsiyum-fosfat oluşumu sağlayarak mineralizasyondaki etkisi incelenmiştir (Tanahashi et al., 1994, Alves et al., 2010; Jongwattanapisan et al., 2011; Pourhaghgouy et al., 2016). POSS katkılı dental yapıştırıcıların incelendiği bir çalışmada, POSS nanokafes yapıların yüzeyde kalsiyum-fosfat oluşumunu sağlayarak malzeme biyoaktivitesini arttırdığı gözlenmiştir (Rizk et al., 2017).



Şekil 61. Kitosan ve kitosan/POSS kompozit doku iskeleleri üzerinde 7. ve 21. günlerde gözlemlenen mineralizasyon oluşumu ve XRD pikleri.



Şekil 62. Kitosan ve kitosan/POSS kompozit doku iskeleleri üzerinde 10x SBF inkübasyonu ile 14. günde gözlemlenen mineralizasyon oluşumu ve XRD pikleri.

4.4.7 Nanoküre Kaplı Doku İskelelerinde Antimikrobiyal Aktivitenin Belirlenmesi

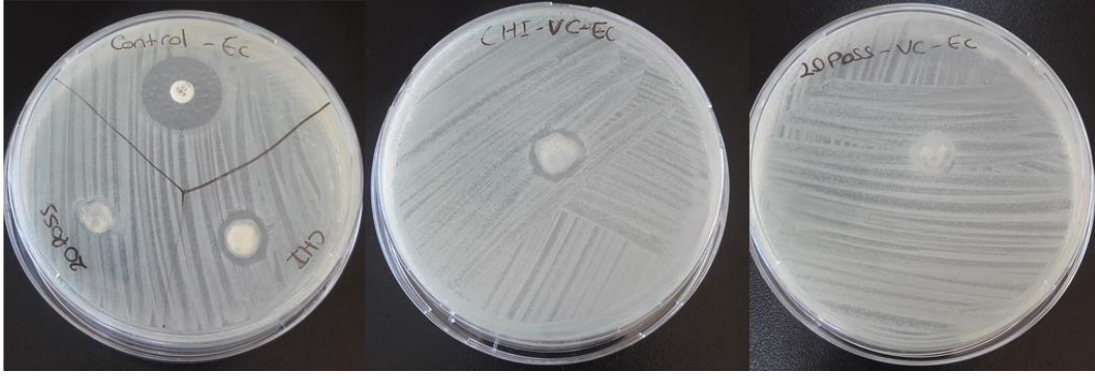
Nanoküre kaplı doku iskelelerinin antimikrobiyal aktivitesi agar difüzyon yöntemi ile incelenmiştir. 24 saatlik inkübasyon sonunda *E. coli* ve *S. aureus* bakterilerine karşı oluşan zon çapları Tablo 28 ve 29'de verilmiştir. Negatif kontrol grubu olarak küre kaplı olmayan kitosan doku iskelesi ve kitosan %20POSS katkı doku iskelesi yerleştirilmiştir. Kitosan doku iskelesi antimikrobiyel etki gösterirken, kitosan/POSS doku iskelesi antimikrobiyal etki göstermemiştir.

Vankomisin yüklü kitosan/kil nanoküre kaplı kitosan doku iskeleleri pozitif kontrol gruba kıyasla daha az zon çapı göstermiştir (Şekil 63). Negatif kontrol grubu kitosan doku iskelesi ile benzer boyutta zon çapı vermiştir. Vankomisin yüklü kitosan/kil nanoküre kaplı kitosan/POSS doku iskelesinin zon çapı ölçülemezdir. Ancak, petriye konan doku iskelesi etrafında bakteri ölümü gözlenmiştir.

Gentamisin yüklü kitosan/kil nanoküre kaplı doku iskelelerinde ise vankomisin nanoküre kaplı doku iskelelerine göre daha fazla zon çapı gözlenmiştir. Negatif kontrol grubu olan kitosan doku iskelesinden daha fazla zon çapı gözlenmiştir. **Sonuç olarak her iki antibiyotik yüklü doku iskelesi de *E. coli* bakterisine karşı antimikrobiyal etki göstermiştir (Şekil 63-64).** İnkubasyon süresinin 3. ve 7.gününde doku iskelelerinin antimikrobiyal etkinliklerini koruduğu gözlemlenmiştir. Fakat zon çaplarında artış gözlenmemiştir.

Tablo 28. Vankomisin ve gentamisin yüklü kitosan/kil nanokompozit küre kaplı kitosan ve kitosan/POSS doku iskelelerinin *E. coli* mikroorganizması üzerindeki etkisi

Gruplar	Zon Çapı(cm)
Pozitif kontrol (Amoksisilin)	0.8
Negatif kontrol 1 (Kitosan doku iskelesi)	0.2
Negatif kontrol 2 (Kitosan/POSS doku iskelesi)	-
Vankomisin yüklü kitosan/kil nanoküre kaplı kitosan doku iskelesi (CHI-VC)	0.2 ± 0.02
Vankomisin yüklü kitosan/kil nanoküre kaplı kitosan/POSS doku iskelesi (20POSS-VC)	-
Gentamisin yüklü kitosan/kil nanoküre kaplı kitosan doku iskelesi (CHI-GC)	0.4 ± 0.02
Gentamisin yüklü kitosan/kil nanoküre kaplı kitosan/POSS katkılı doku iskelesi (20POSS-GC)	0.4 ± 0.03



Şekil 63. Vankomisin yüklü kitosan/kil nanokompozit küre kaplı doku iskelelerinin *E. coli* mikroorganizması üzerindeki etkisi

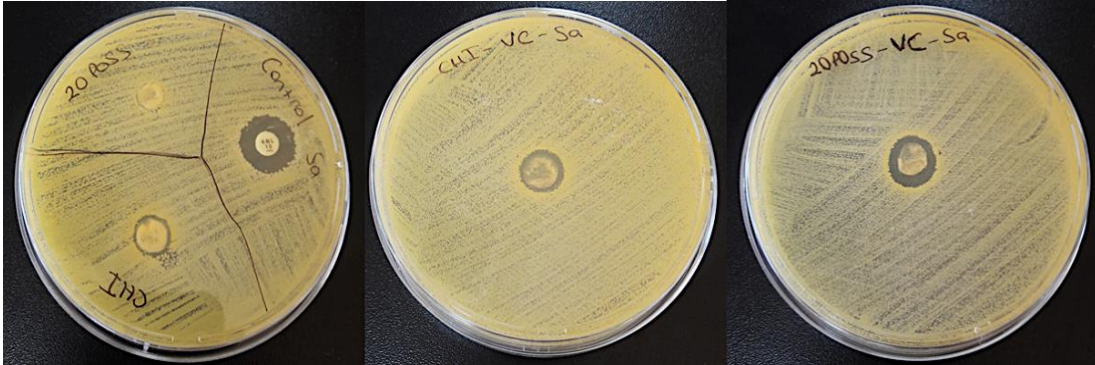


Şekil 64. Gentamisin yüklü kitosan/kil nanokompozit küre kaplı doku iskelelerinin *E. coli* mikroorganizması üzerindeki etkisi

Çalışmada pozitif kontrol grubu olarak kullanılan amoksisilin diski *E.coli* mikroorganizmasına kıyasla *S.aureus* mikroorganizmasına üzerinde daha az etki göstermiştir. *E.coli* mikroorganizmasında olduğu gibi *S.aureus* mikroorganizması da kitosan doku iskelesi antimikrobiyal etki gösterirken, kitosan/POSS doku iskelesi tek başına antimikrobiyal etki göstermemiştir. Ancak, **Vankomisin ve gentamisin yüklü kitosan/kil nanoküre kaplı doku iskeleleri *S.aureus* mikroorganizması üzerinde de antimikrobiyal etki göstermiştir (Şekil 65-66)**. Aynı şekilde, İnkubasyon süresinin 3. ve 7.gününde örneklerin antimikrobiyal etkinliklerini koruduğu gözlemlenmiştir. Zon çapında değişiklik gözlenmemiştir. Literatürde, Vankomisin içeren kitosan doku iskeleleri *S. aureus* ve *P. aeruginosa'* a karşı antimikrobiyal aktivite göstermiştir (Noel ve ark. 2008). Bir başka çalışmada, gentamisin yüklü kitosan biyomalzemeler üretilmiş ve *E.coli* , *P. aeruginosa* ve *S. aureus'* a karşı antimikrobiyal aktivite göstermiştir (Monteiro ve ark. 2015). Silk fibrin doku iskelelerine gömülmüş gentamisin yüklü gelatin mikroküreler üretilmiş ve antimikrobiyal aktivitesi incelenmiştir. İlaç yüklü mikroküre içeren doku iskeleleri *E. coli* , *S. aureus* ve *P. aeruginosa'* a karşı antimikrobiyal aktivite göstermiştir(Lan ve ark. 2014).

Tablo 29. Vankomisin ve gentamisin yüklü kitosan/kil nanoküre kaplı kitosan ve kitosan/POSS doku iskelelerinin *S. aureus* mikroorganizması üzerindeki etkisi

Gruplar	Zon Çapı(cm)
Pozitif kontrol (Amoksisilin)	0.5
Negatif kontrol 1 (Kitosan doku iskelesi)	0.1
Negatif kontrol 2 (Kitosan/POSS doku iskelesi)	-
Vankomisin yüklü kitosan/kil nanoküre kaplı kitosan doku iskelesi (CHI-VC)	0.18 ± 0.02
Vankomisin yüklü kitosan/kil nanoküre kaplı kitosan/POSS doku iskelesi (20POSS-VC)	0.23 ± 0.02
Gentamisin yüklü kitosan/kil nanoküre kaplı kitosan doku iskelesi (CHI-GC)	0.23 ± 0.03
Gentamisin yüklü kitosan/kil nanoküre kaplı kitosan/POSS doku iskelesi (20POSS-GC)	0.28 ± 0.04



Şekil 65. Vankomisin yüklü kitosan/kil nanoküre kaplı doku iskelelerinin *S.aureus* mikroorganizması üzerindeki etkisi



Şekil 66. Gentamisin yüklü kitosan/kil nanoküre kaplı doku iskelelerinin *S.aureus* mikroorganizması üzerindeki etkisi

4.4.8 Antibiyotik Yüklü Kitosan/Kil Nanoküre Kaplı Doku İskelelerinden *In Vitro* Salım Profilinin İncelenmesi

Vankomisin (4:1,8:1) ve gentamisin (10:1,20:1) için iki farklı ilaç oranında salım profilleri incelenmiştir. Her iki antibiyotik içinde düşük ilaç oranında daha yüksek enkapsülasyon verimliliği gözlemlenmiştir. Bunun nedeni ise, artan polimer:ilaç oranı ile, ilacın polimer matris yapısına dahil olması kolaylaşmakta, böylece enkapsülasyon verimi artmaktadır. Polimer:ilaç oranı, malzemelerin salım profilini etkileyen önemli özelliklerden biridir. Daha önce yapılan çalışmalarda da görüldüğü üzere enkapsülasyon verimi, malzemelerin polimer:ilaç oranındaki artış ile doğru orantılıdır (Desai ve Park, 2005; Dhakar ve ark., 2010).

İkinci aşamada, doku iskeleleri üzerine püskürtülmek için vankomisin ve gentamisin gruplarından birer ilaç konsantrasyonu seçilmiştir. Vankomisin için 8:1, gentamisin için 20:1 oranı seçilmiştir. Bu ilaç oranları ilaçların enkapsülasyon oranları ve antibiyotik yüklü kitosan-kil nanokürelerin salım profilleri incelenerek seçilmiştir. Antibiyotik içeren kitosan/nanokil çözeltileri mikroakışkanlaştırıcı prosesinden geçirildikten sonra elektrosprey yöntemi ile toz küre formunda kollektör yüzeyine yapıştırılan doku iskeleleri üzerine püskürtülerek kaplama yapılmıştır. Belirlenen periyotlarda örnek alınarak UV-VIS spektrofotometre (Varioskan) ile okutulmuş miktar tayini yapılmıştır. Salım sıvısındaki miktar tayini, antibiyotik yüklü kitosan/kil nanokompozit küre salımında olduğu gibi hazırlanan kalibrasyon eğrilerine göre belirlenmiştir. Salım profili incelenen gruplar Tablo 30.'te verilmiştir.

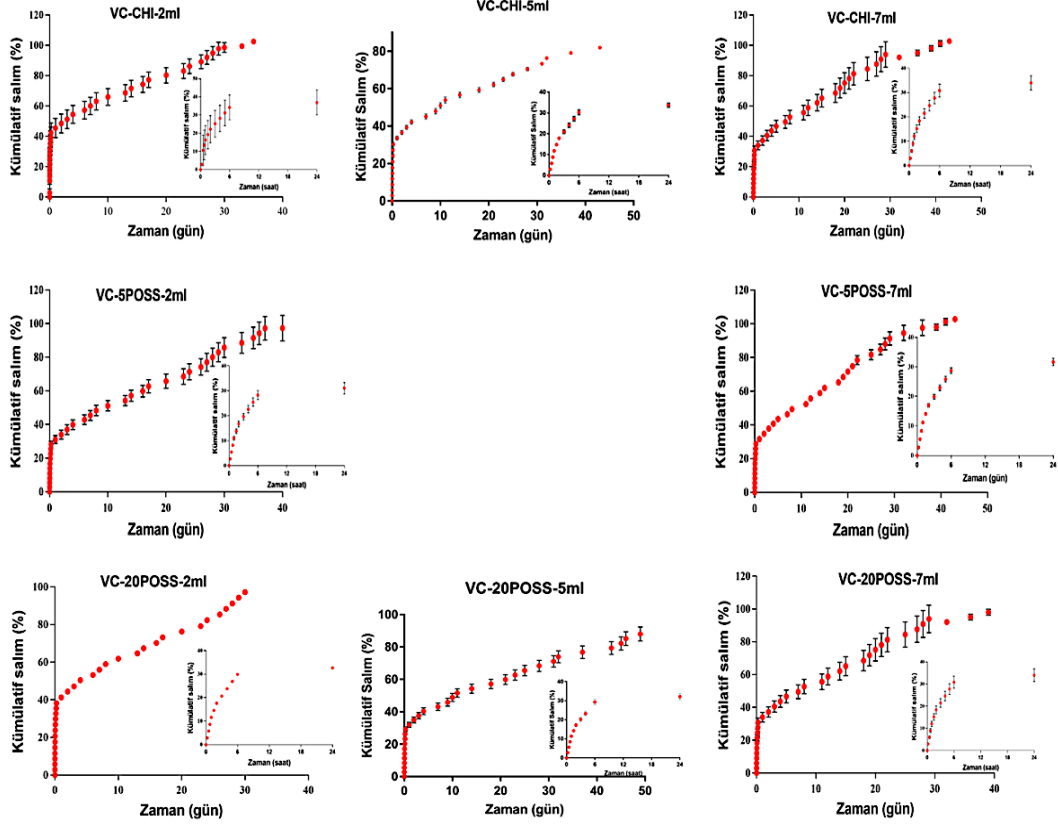
Tablo 30. Salım profili incelenen, farklı hacimlerde antibiyotik yüklü kitosan/kil nanoküre kaplanan doku iskelesi grupları

Gruplar	Vankomisin (VC)	Gentamisin (GC)
Nanoküre kaplı Kitosan (CHI) doku iskelesi	2ml-5ml-7ml	2ml-7ml
Nanoküre kaplı Kitosan (CHI)-5%POSS doku iskelesi	2ml-7ml	2ml-7ml
Nanoküre kaplı Kitosan (CHI)-20%POSS doku iskelesi	2ml-5ml-7ml	2ml-7ml

Vankomisin yüklü kitosan-kil nanokompozit küre yüklenen doku iskelelerinden salım incelendiği zaman, tüm gruplarda kısa zamanda doku iskeleleri üzerindeki nanokürelerin yüzeye yakın bulunan ilaç kristallerinden ilk 6 saatte %30 luk kısmı salınmıştır. Farklı hacimlerde püskürtülen kompozit çözeltilerinden elde edilen nanoküre kaplı doku iskelelerinin salımları incelenmiştir. 2ml hacminde vankomisin yüklü kitosan-kil nanokompozit çözeltileri püskürtülerek elde edilen nanoküre kaplı doku iskelelerinden salınan süreler sırasıyla, kontrol grubu olan kitosan doku iskeleleri 36 günde, 5POSS içeren doku iskeleleri 37 günde, 20POSS içeren doku iskeleleri ise 37 günde %100 kümülatif salıma ulaşmıştır. POSS miktarı salımı etkilemediği gözlenmiştir. 7ml hacminde vankomisin yüklü kitosan/kil nanokompozit çözeltileri püskürtülerek elde edilen nanoküre kaplı doku iskelelerinin salım süreleri, kontrol grubu kitosan doku iskelesinden 37 günde, 5POSS içeren doku iskelelerinden 39 günde, %20 POSS içeren doku iskelelerinden 43 günde %100 kümülatif salıma ulaşmaktadır. 5ml hacminde vankomisin yüklü kitosan/kil nanokompozit çözeltileri püskürtülerek elde edilen nanoküre kaplı doku iskelelerinden kontrol grubu kitosan %83 salıma 43 günde ulaşmış, %20 POSS içeren doku iskelelerinde ise 43 günde %82 kümülatif salım gözlemlendi (Şekil 67). Vankomisin yüklü kitosan/kil nanoküre salımı ile karşılaştırıldığında, vankomisin yüklü kitosan/kil nanokürelerin 30 günün sonunda %94 kümülatif salıma ulaştığını gözlemlendi. Küreler doku iskeleleri üzerine toplandığında daha geç bir salım gerçekleşmektedir. Çünkü antibiyotik yüklü kitosan/kil çözeltisi doku iskelesi üzerine püskürtüldüğü için sadece gözenek yüzeyi değil gözeneklerin iç duvarları da nanokürelerle kaplandığı için, nanoküre salımına göre daha yavaş bir salım gerçekleşmiştir. Literatüre bakıldığında, Zhou ve arkadaşları enfekte kemik defektlerinin tedavisine yönelik vankomisin yüklü gözenekli silika nanoparçacıklar üreterek jelatin bir matriksin içerisine dahil etmiştir. Kontrol grubu olarak jelatin matriksin içine vankomisin yüklenerek salımı profili incelenmiştir. Jelatin matriksin içerisine yüklenen vankomisin salımı daha hızlı gerçekleşirken, ilaç

yüklü gözenekli silika nanoparçacıkları içeren jelatin matriksten daha kontrollü bir salım gerçekleşmiştir. 28 günün sonunda ilaç yüklü mezo gözenekli silika nanoparçacıkları içeren jelatin matriks %80 kümülatif salıma ulaşırken, ilaç yüklü jelatin matriks %95 e yakın salım sergilemiştir. Gözenekli silika nanoparçacıkların ilaç salımını yavaşlattığı gözlenmiştir.

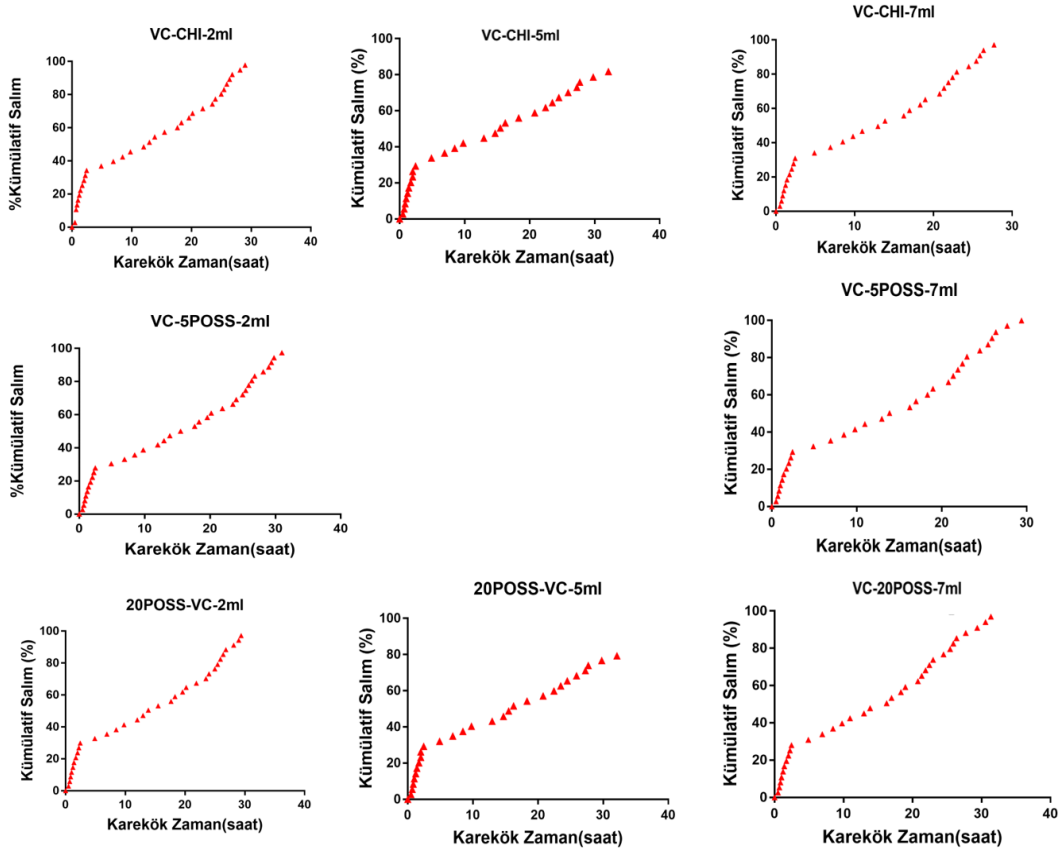
Yang C.C. ve arkadaşları, hidrojen bağları ve deprotonasyonu (asit tepkimesinde bir Brønsted–Lowry asitinden bir protonun ayrılması süreci) ile kitosan/vankomisin Ti6Al4V üzerine kaplanmıştır. Kontrollü salım elde etmek için kitosan/vankomisinden önce hidroksiapatit kaplanmıştır. Salımı incelenen hidroksiapatit/kitosan/vankomisin kaplı Ti6Al4V implantları yaklaşık 35 gün sürmüştür. Hidroksiapatit patlama salımını yavaşlatarak salım süresini uzatmıştır (Yang ve ark., 2013). Bir başka çalışmada vankomisin kontrollü salımı için biyoaktif cam bazlı süngerler ilk önce polikaprolaktan ile daha sonra vankomisin yüklü kitosan ile kaplanarak sert doku mühendisliği için hazırlanmıştır. Salım sürelerine bakıldığında kontrol olarak biyoaktif cam süngerlerin içerisine yüklenen vankomisinin 24 saat içerisinde neredeyse ilacın tamamını bıramıştır. Polimer kaplı bioaktif cam süngerlerin salım sürelerinin 11 güne uzadığı gözlenmiştir (Yao ve ark, 2013). Ayrıca ilaç salımları incelenen grupların salım mekanizması incelenmiştir. Higuchi salım modeli deneysel verilere uygulanmıştır (Şekil 68). R^2 (0.9436-0.9767) değerleri göz önünde bulundurulduğunda deneysel verilerin Higuchi Salım modeline uyum sağladığı görülmektedir. Farklı hacimlerde antibiyotik yüklü nanoküre kaplı doku iselelerinin Higuchi salım katsayıları Tablo 31’te verilmiştir. Materyal-metod kısmında da belirtildiği gibi Higuchi modeli polimer matris salma sistemlerinde en çok kullanılan modeldir. Bu modelin varsayımlarına göre, ilaç parçacıklarının taşıyıcının kalınlığından daha küçük olduğu söylenebilir. Sezer ve ark. (2017), levan mikropartiküllerinden Vancomycin salınımı 0.98-0.99'luk bir R^2 ile Higuchi modeline uyuyordu (Sezer ve ark., 2017). Kurczewska J. ve arkadaşları ise anjimat/jelatin/hallosit nanotüp kompozit yara sargısından vankomisin salımını, higucci modeline çok iyi uyum sağlamıştır. (R^2 0.940-0.997). Bu model polimerik matris sistemi, modifiye salımlı farmasötik dozaj formları ve bazı transdermal sistemlerde uygun bulunmaktadır. Higuchi salım modeli ilaç salımını difüzyon süreci olarak tanımlamaktadır (Kurczewska ve ark., 2017).



Şekil 67. Farklı hacimlerde vankomisin içeren kitosan/kil nanokürelerin doku iskelesinden salım profillerinin incelenmesi

Tablo 31. Farklı hacimlerde vankomisin içeren kitosan/kil nanoküre ile kaplı doku iskelelerinin Higuchi Salım Katsayıları

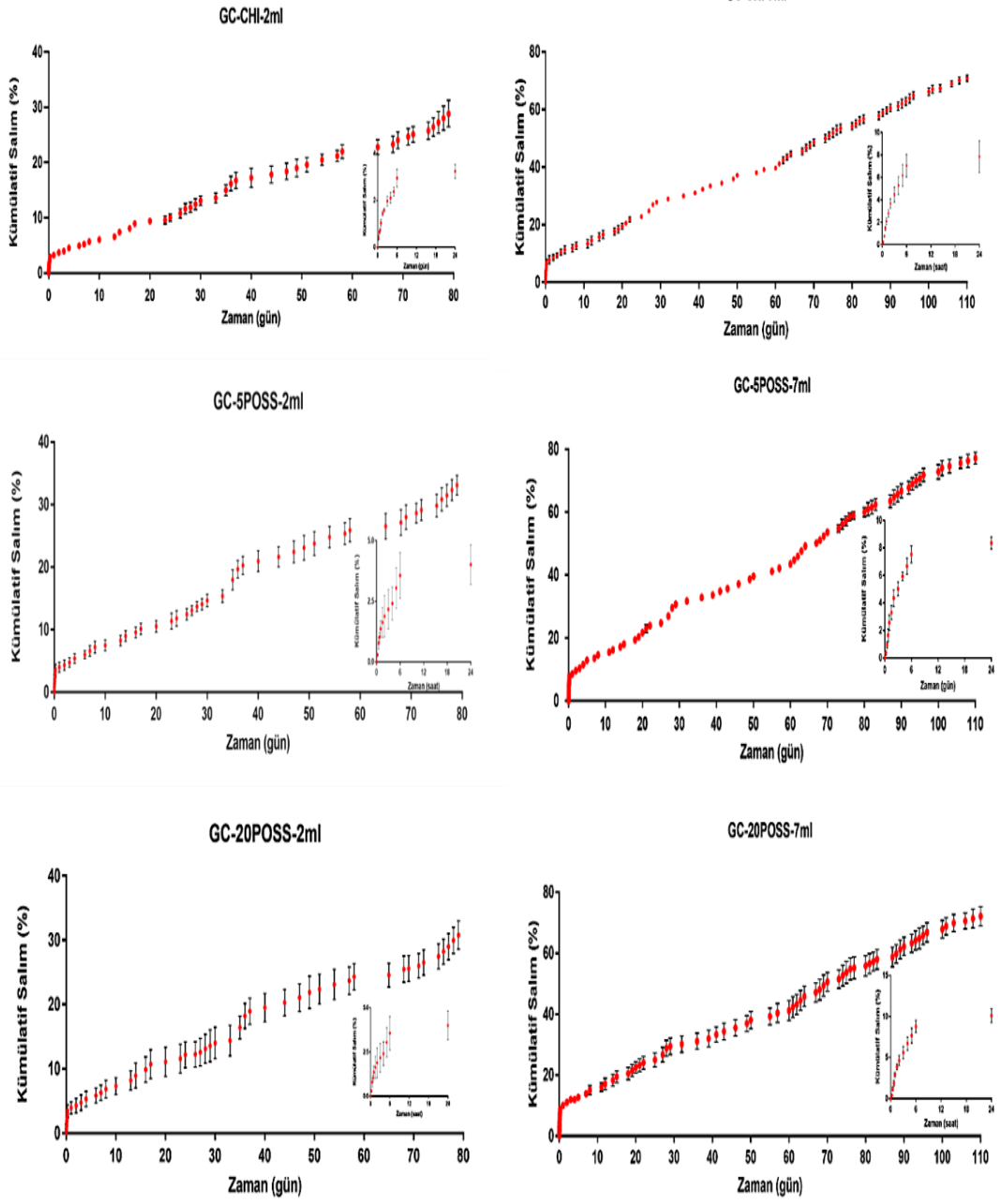
İlaç	Kaplama kalınlığı	Higuchi	
		k	R ²
VC-CHI	2ml	2.7264	0.9613
	5ml	2.2303	0.9436
	7ml	2.9645	0.9703
VC-5POSS	2ml	2.6406	0.9735
	7ml	2.9673	0.9714
VC-20POSS	2ml	2.7531	0.9691
	5ml	2.1605	0.9441
	7ml	2.7134	0.9767



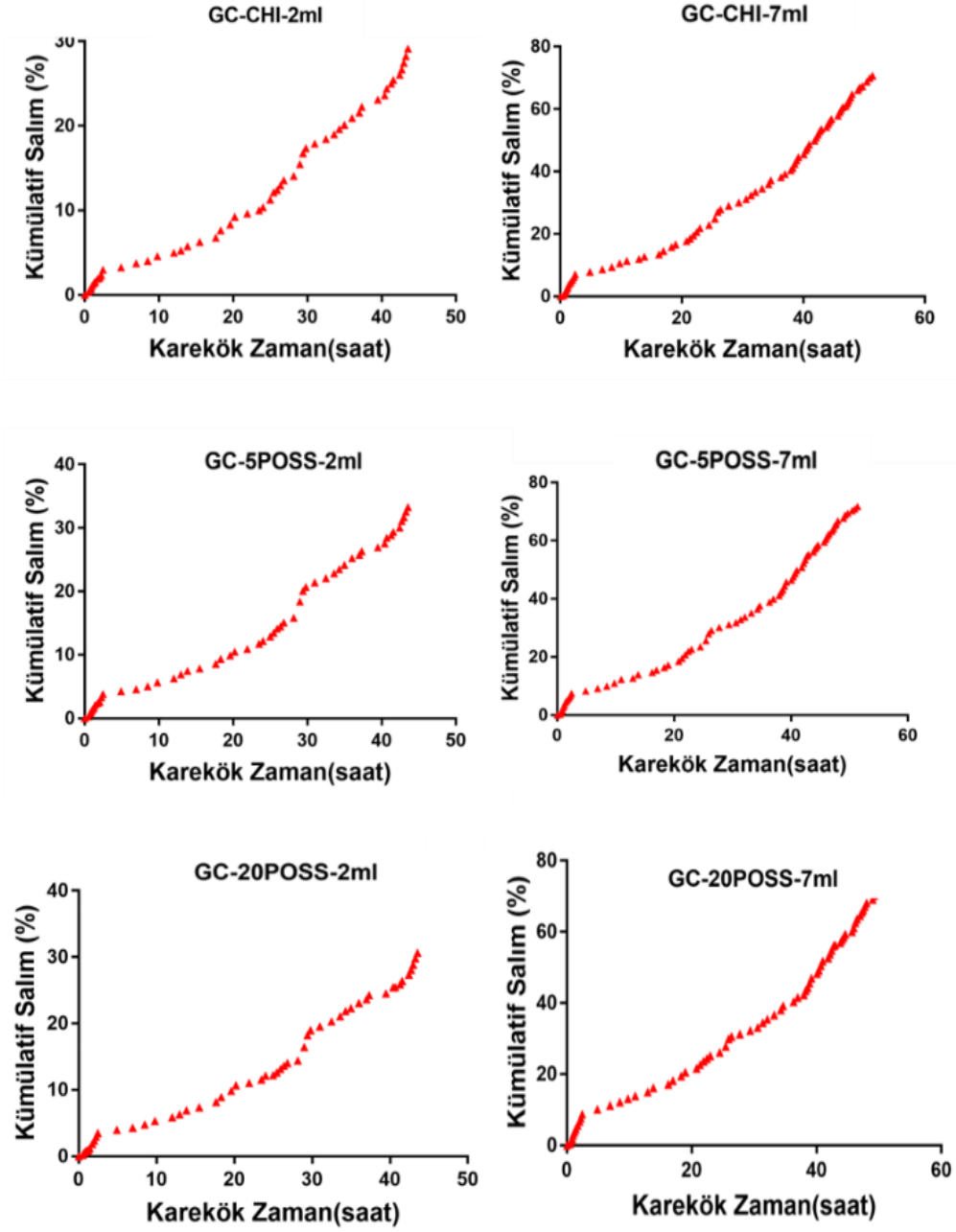
Şekil 68. Farklı hacimlerde vankomisin içeren kitosan/kil nanokompozit çözeltisi ile kaplanan doku iskelelerinin Higuchi Salım Modeli

Gentamisin yüklü kitosan-kil nanokompozit küre yüklenen doku iskelelerinden salım incelendiğinde, kısa zamanda doku iskeleleri üzerindeki nanokürelerden yüzeye yakın bulunan ilaç kristallerinden ilk 6 saatte 2ml hacimde püskürtülen grupta %4, 7ml hacimde püskürtülen grupta %8'lik kısmı salınmıştır. Farklı hacimlerde püskürtülen kompozit çözeltilerinden elde edilen nanoküre yüklü doku iskelelerinden salım karşılaştırıldığında salım sürelerinin biraz uzadığı gözlemlenmiştir. 2ml haciminde gentamisin yüklü kitosan-nanokil nanokompozit çözeltileri püskürtülerek elde edilen nanoküre yüklü doku iskelelerinden salınan süreler, kontrol grubu kitosan, %5 POSS ve %20 POSS içeren doku iskeleleri ise 80 günde yaklaşık %33 kümülatif salıma ulaşmıştır. 7ml haciminde gentamisin yüklü kitosan-nanokil nanokompozit çözeltileri püskürtülerek elde edilen nanoküre yüklü doku iskelelerinin salım süreleri kontrol grubu kitosan %70 %5 POSS içeren doku iskelelerinde %77 ve 20POSS içeren doku iskelelerinden %72 kümülatif salıma 110 günde ulaşılmıştır (Şekil 69). 2ml ve 7ml gentamisin yüklü doku iskelelerinin salımları karşılaştırıldığında, kaplama kalınlığının artması ile birlikte salım miktarı ve zamanı artmıştır. Gentamisin yüklü kitosan-nanokil nanoküre salımı ile karşılaştırıldığında, gentamisin yüklü kitosan-nanokil nanoküreler 30 gün sonunda %84 kümülatif salıma ulaştığını gözlemlemiştik.

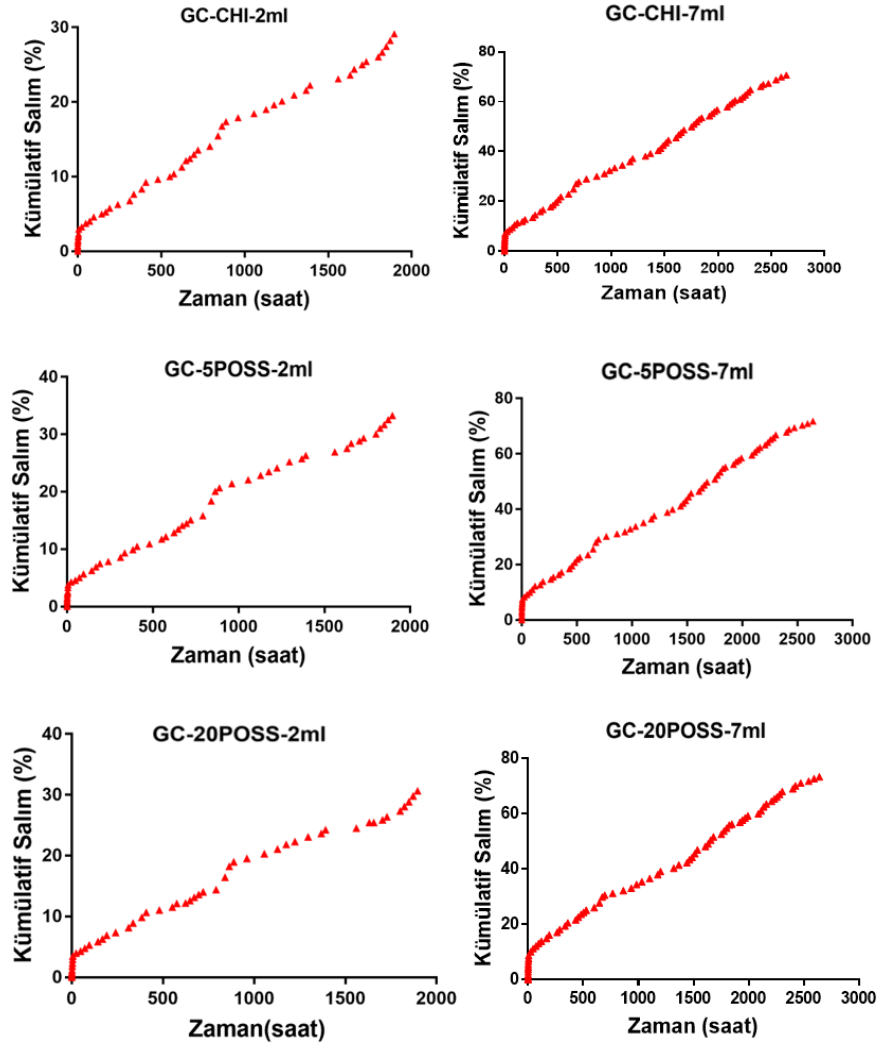
Nanoküreler doku iskelesi üzerine toplandığında kümülatif salımda çok fazla yavaşlanma gözlenmiştir. Vankomisin kaplı ve gentamisin kaplı doku iskelelerinin kümülatif salım süreleri karşılaştırıldığında, vankomisin gentamisine göre daha kısa zamanda ilacın tamamını bırakırken, gentamisin yüklü doku iskeleleri ilacın belli bir kısmını daha uzun sürede bırakmıştır. Yapılan bir çalışmada ostomiyelit tedavisine yönelik gentamisin yüklü jelatin/genipin ile güçlendirilmiş beta-trikalsiyum fosfat (TCP) doku iskeleleri üretilmiştir. Kontrol grubu olarak gentamisin yüklü TCP grupları kullanılmıştır. Gentamisin bir gün içerisinde TCP içerisinde salınırken, jelatin/genipin-TCP doku iskelelerinde antibiyotik salımı 28 gün devam etmiştir. Gentamisinin yaklaşık %17'si ilk gün salınmıştır. Jelatin/genipin tabakası doku iskelelerinde ilaç salımını önemli ölçüde yavaşlatmıştır (Wu ve ark., 2013). Shi P. ve arkadaşları gentamisin emdirilmiş kitosan/nanohidroksiapatit/etil selüloz mikro-küreleri kronik osteomiyelit tedavisi için hazırlamışlar ve salımını incelemişlerdir. Polimer kompozitten gentamsin salımı 50 gün boyunca devam etmiştir (Shi ve ark., 2010). Bir başka çalışmada, ortopedik implantlarda kullanılmak üzere, gentamisin antibiyotik yüklü kitosan/biyocam kompozit çözeltisi 316L paslanmaz çelik yüzey üzerine elektroforetik biriktirme metodu ile elde edildi. Kompozit malzemeden gentamisin salımına bakıldığında, 57 günde yaklaşık %66'lık kısmı salınmıştır. Bilindiği üzere, polimer matrisinden ilaç salma kinetiğine bakıldığında, polimerin şişmesi ve erozyonu, ilacın matris içindeki ilaç dağılımı matris gözenekliliği gibi faktörlere bağlıdır. Polimer içeren bir matristen gelen ilaç salma kinetiği, polimer şişmesi ve erozyonu, matris içindeki ilaç dağılımı ve matris gözenekliliği gibi çeşitli faktörlere bağlıdır. Ayrıca, homojen bir ilaç dağılımı elde edilen gözenekli bir polimer matrisi ilaç salımını yavaşlamasına neden olmaktadır (Pishbin ve ark., 2014). Nanoküre kaplı doku iskelelerinde, ilaç salımları incelenen grupların salım mekanizmaları da incelenmiştir. Higuchi ve sıfıncı derece salım modeli deneysel verilere uygulanmıştır (Şekil 70-71). Gentamisin yüklü kitosan/nanokil nanoküre kaplı doku iskelelerinin salımının Higuchi (R^2 : 0.9592-0.983) ve Zero order (R^2 : 0.9759-0.9918) salım modellerine uyduğu belirlenmiştir. Farklı hacimlerde antibiyotik yüklü nanoküre kaplı doku iskelelerinin Higucci ve sıfıncı derece salım katsayıları Tablo 32'te verilmiştir. Higuchi modelinin polimer matris sistemlerinde ve biyomedikal uygulamalarda kullanıldığı bilinmektedir. Doku iskeleleri üzerine kaplı gentamisin yüklü kitosan/nanokil nanokürelerden salım miktarının zamanla değişmediği gözlenmiştir.



Şekil 69. Farklı hacimlerde gentamisin içeren kitosan/kil nanoküre kaplı doku iskelelerinin salım profillerinin incelenmesi



Şekil 70. Farklı hacimlerde gentamisin içeren kitosan/kil nanoküre kaplı doku iskelelerinin Higuchi Salım Modeli



Şekil 71. Farklı hacimlerde gentamisin içeren kitosan/kil nanoküre kaplı doku iskelelerinin Zero order Salım Modeli

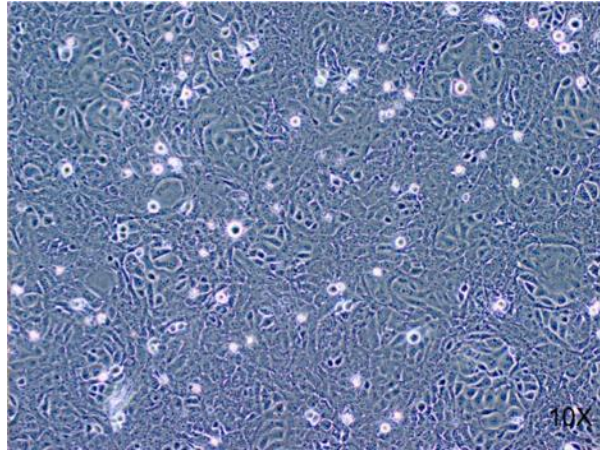
Tablo 32. Farklı hacimlerde gentamisin içeren kitosan/kil nanoküre kaplı doku iskelelerinin Higuchi Salım Katsayıları

İlaç	Kaplama kalınlığı	Zero Order		Higuchi	
		K	R ²	k	R ²
GC-CHI	2ml	0.0139	0.9846	1.2917	0.9608
	7ml	0.0251	0.9918	0.6023	0.962
GC-%5 POSS	2ml	0.016	0.981	1.3177	0.9592
	7ml	0.257	0.9908	0.6693	0.983
GC-%20 POSS	2ml	0.0146	0.9759	1.3184	0.9649
	7ml	0.0255	0.9859	0.6385	0.9694

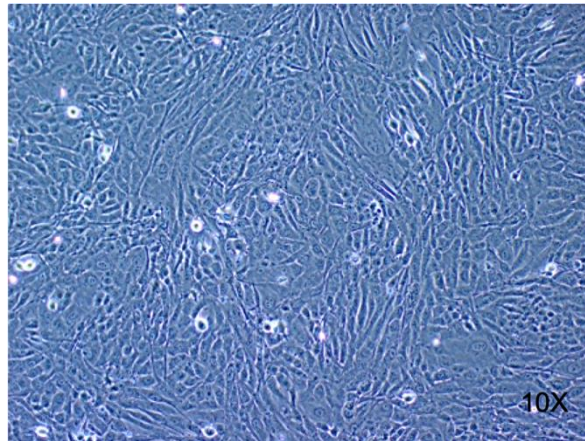
4.5 *In Vitro* Hücre Kültürü Çalışmaları

4.5.1 Saos-2 ve SW 1353 Hücrelerinin Kültivasyonu

In vitro hücre kültürü çalışmalarında, antibiyotik kaplı kitosan/POSS doku iskelelerinin kemik doku rejenerasyonu üzerindeki etkilerini belirlemek için model hücre olarak Saos-2 hücre hattı kullanılmıştır (Şekil 72). Doku iskelelerinin kırıldak doku üzerindeki etkilerinin incelenmesinde model hücre olarak SW 1353 hücre hattı kullanılmıştır (Şekil 73). Hücreler %10 FBS içeren DMEM ortamında 37°C'de ve %5 CO₂'li inkübatörde kùltive edilerek 2. pasajlarında deneyler için kullanılmıştır.



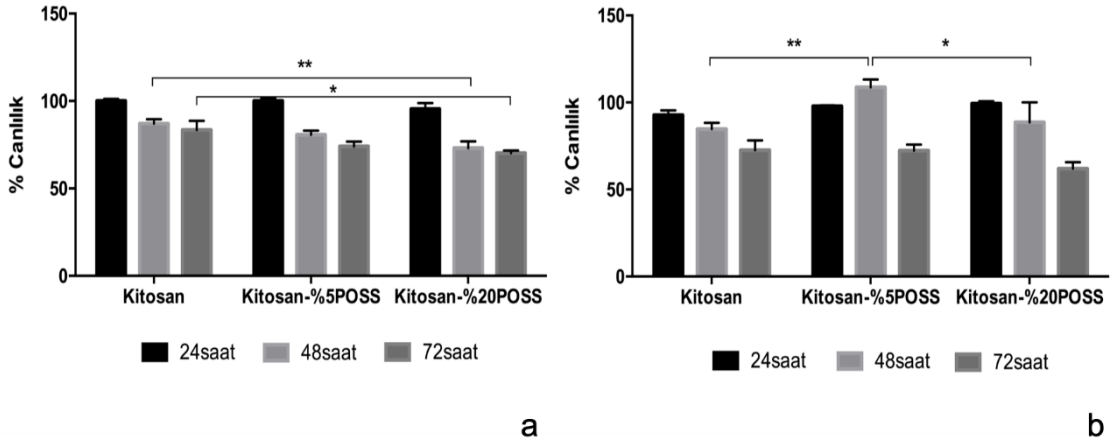
Şekil 72. Saos-2 hücrelerinin 2. pasajda inverted ışık mikroskobu görüntüsü



Şekil 73. SW 1353 hücrelerinin 2. pasajda inverted ışık mikroskobu görüntüsü

4.5.2 Kitosan/kil Nanoküre Kaplı Doku İskelelerinin *In vitro* Sitotoksitesinin Belirlenmesi

In vitro sitotoksitesite sonuçları incelendiğinde, indirekt ekstraksiyon yöntemli ile



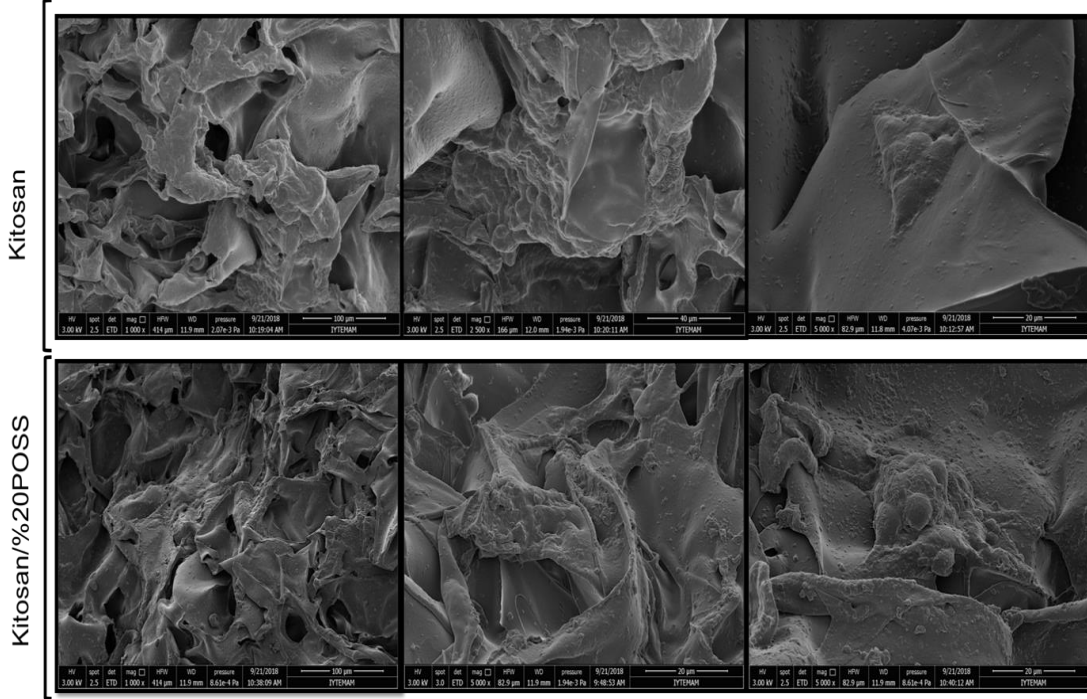
Şekil 75. In vitro sitotoksosite testlerinde SW 1353 hücreleri ile elde edilen % canlılık sonuçları: Vankomisin yüklü kitosan/MMT nanoküre kaplı doku iskeleleri (a); gentamisin yüklü kitosan/MMT nanoküre kaplı doku iskeleleri (b)

Literatür çalışmaları incelendiğinde, Pankongadisak ve arkadaşları PLLA (polilaktik asit)-serisin hibrit doku iskelelerine gentamisin yükleyerek kontrollü bir salım sistemi tasarlamış, gentamisin salımı yapan bu doku iskelelerinin in vitro koşullarda sitotoksik etkisini incelemiştir. MC3T3-E1 hücreleri ile yaptıkları sitotoksosite çalışmasında gentamisin yüklemesi ile toksik etki gözlenmemiştir (Pankongadisak ve ark., 2019). Başka bir çalışmada vankomisin yüklü nanopartiküller içeren zein doku iskeleleri üretilmiş ve bu doku iskelelerinin in vitro sitotoksitesini incelenmiştir. Elde edilen sonuçlara göre vankomisin yüklü nanoküreleri içeren zein doku iskeleleri MG-63 osteosarkom hücreleri üzerinde herhangi bir toksik etki göstermemiştir (Babaei ve ark., 2019).

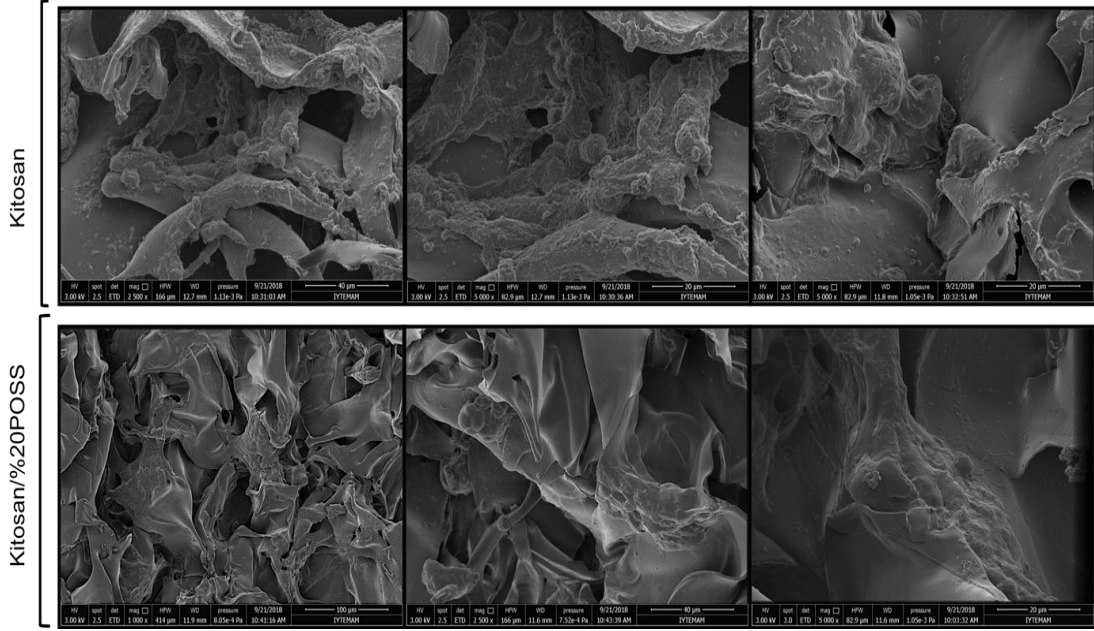
4.5.3 Saos-2 ve SW 1353 Hücrelerinin Kitosan/kil Nanoküre Kaplı Doku İskelelerinde Tutunumu

Biyomalzeme yüzeyi ile hücre arasındaki etkileşim malzeme yüzeyinin topografisi, pürüzlülüğü, hidrofiliği gibi yüzey özellikleri ile doğrudan ilişkilidir. Bu yüzden antibiyotik yüklü nanoküre kaplı ve POSS katkılı kitosan doku iskelesi yüzeyinin özelliklerinin hücre tutunumunu etkileyeceği düşünülmektedir. Doku iskelelerine ekilen Saos-2 ve SW1353 hücrelerinin malzeme yüzeyindeki tutunumu ve yayılımı 7 günde SEM ve floresans mikroskobu ile gözlenmiştir. SEM görüntülerinde hücrelerin doku iskelesi yüzeyindeki tutunumunun nanoküre kaplamasından olumsuz yönde etkilenmediği, hücrelerin doku iskelesi duvarlarında yayılarak kolonize olduğu görülmüştür (Şekil 76-77). Floresans mikroskop görüntülerinde de antibiyotik yüklü nanoküre ile kaplanmış doku iskelelerinin gözenek duvarlarında hücrelerin sağlıklı bir şekilde tutunum gösterdiği ve yayılarak kolonize olduğu gözlenmiştir. Alexa fluor 555

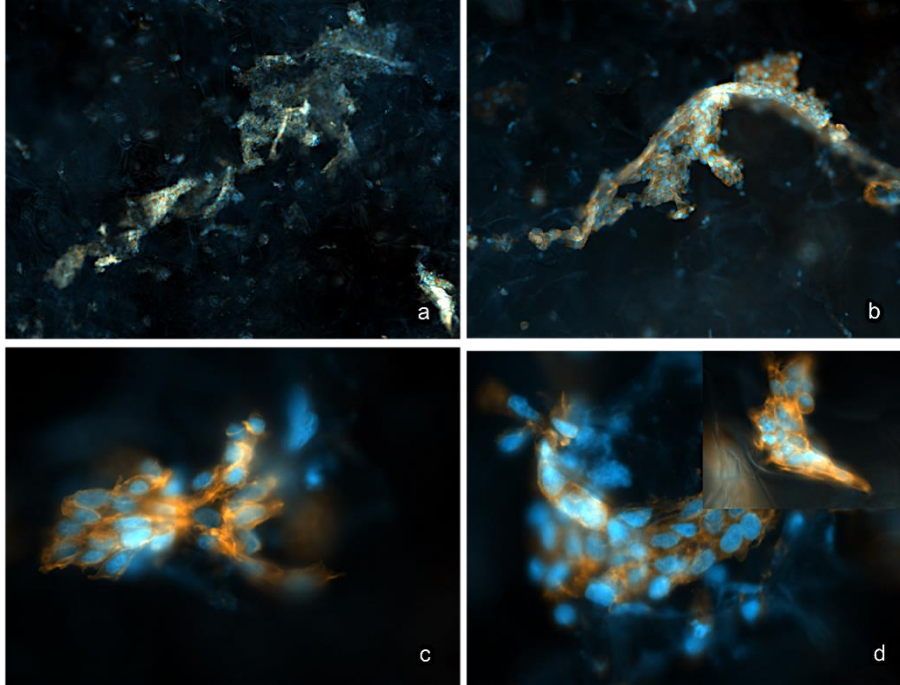
boyaması ile Saos-2 hücrelerinin gözenek duvarlarında sitoplazmik uzantıları ve filopodları aracılığı ile tutunarak osteoblastik bir fenotiple yayılım gösterdiği gözlenmiştir (Şekil 78-79). Literatürde araştırmalarında, yapılan bir çalışmada POSS katkılı PLLA doku iskelelerinin biyoaktivitesi doku iskelesi üzerinde MC3T3-E1 hücrelerinin tutunumu ile incelenmiştir. Floresan mikroskop görüntülerinde hücrelerin nanokompozit yapı üzerinde sağlıklı bir şekilde tutunarak aktin filamentleri ile yayılım gösterdiği görülmüştür (Huang ve ark., 2019).



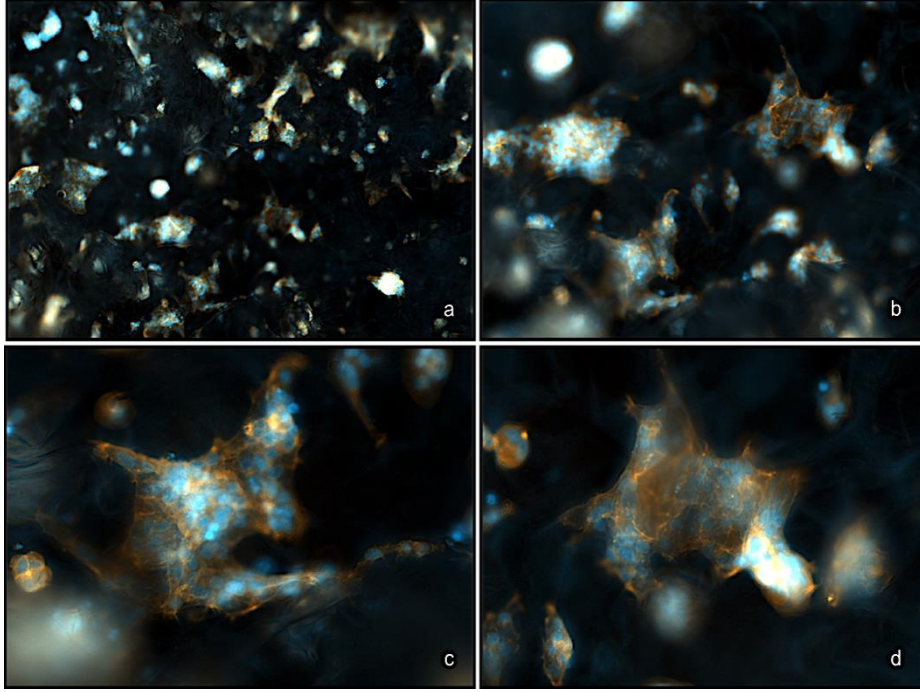
Şekil 76. Vankomisin yüklü nanoküre kaplı doku iskelelerinde Saos-2 hücrelerinin 7 gün sonunda tutunumu ve yayılması



Şekil 77. Gentamisin yüklü nanoküre kaplı doku iskelelerinde Saos-2 hücrelerinin 7gün sonunda tutunumu ve yayılması

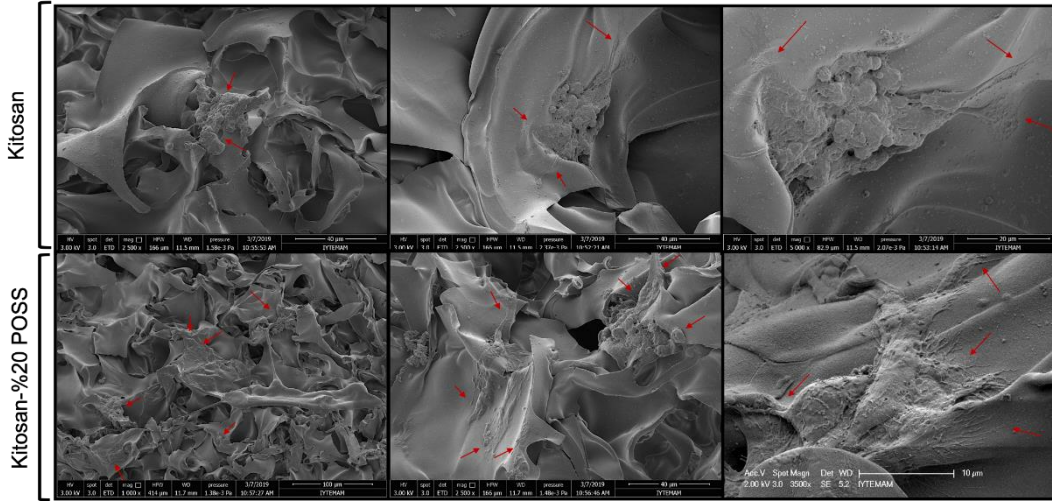


Şekil 78. Vankomisin yüklü nanoküre kaplı Kitosan-%20POSS doku iskelelerinde Saos-2 hücrelerinin 7. gün sonunda farklı büyütmelerde (5x, 10x ve 20x) floresans mikroskop görüntüleri

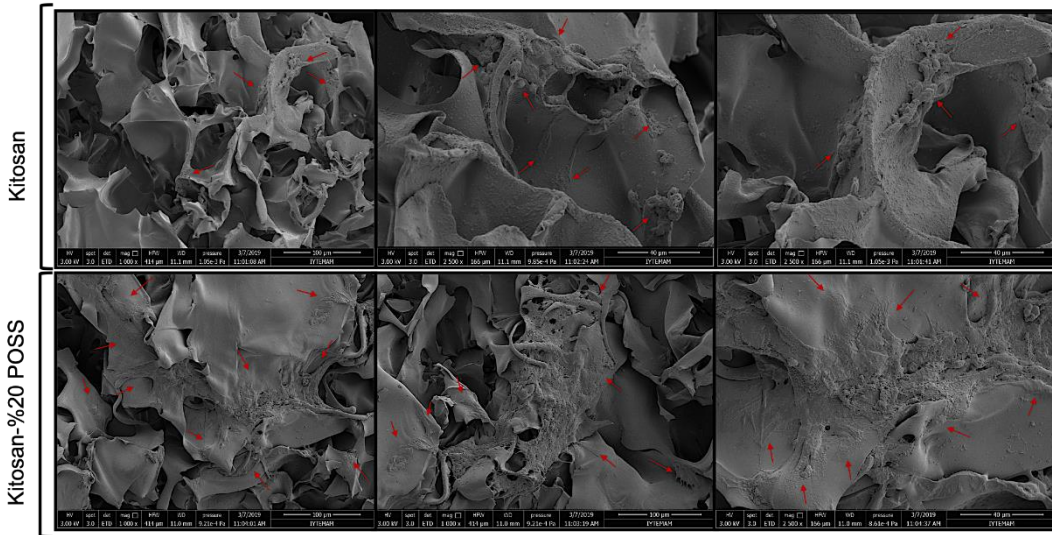


Şekil 79. Gentamisin yüklü nanoküre kaplı Kitosan-%20POSS doku iskelelerinde Saos-2 hücrelerinin 7 gün sonunda farklı büyütmelerde (5x,10x, ve 20x) floresans mikroskop görüntüleri

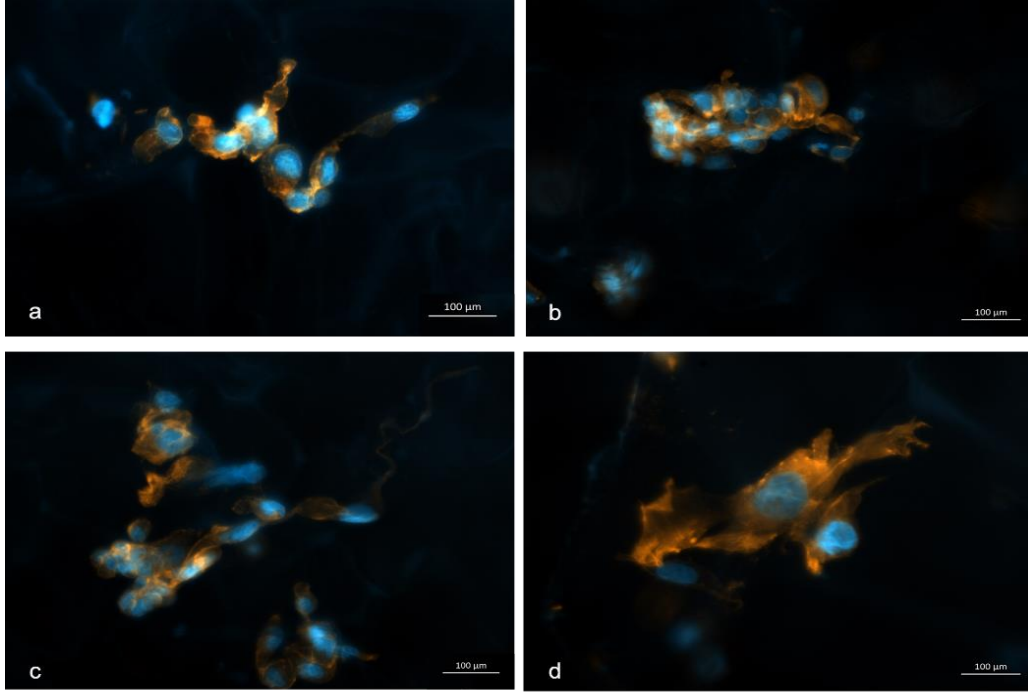
SEM görüntüleri incelendiğinde SW1353 hücrelerinin gentamisin yüklü nanoküre kaplı kitosan ve kitosan/POSS doku iskelelerinde istenen şekilde üç boyutlu yapısını sergileyerek tutunup yayıldığı gözlenmiştir. SW 1353 hücreleri nanoküre kaplı yüzeyden olumsuz etkilenmemiş, aynı zamanda doku iskelesi duvarlarında aktin filamentleri ve filipodia uzantıları ile tutunarak kolonize olmuştur. Kolonize olan hücreler ve tutunma noktaları kırmızı oklarla gösterilmiştir (Şekil 80-81). Floresan mikroskop görüntülerinde de 10x ve 20x büyütmelerde SW 1353 hücrelerinin doku iskelesi duvarlarına tutunarak yayıldıkları görülmektedir (Şekil 82-83). POSS nano katkının kıkırdak doku rejenerasyonuna etkisinin incelendiği bir çalışmada, POSS-polikaprolakton üretan (PCU) doku iskeleleri üzerinde kıkırdak hücreleri kültive edilmiş ve floresan mikroskop görüntüleri ile hücrelerin doku iskelesi yüzeyindeki tutunumu gözlenmiştir. Floresan mikroskop görüntülerine göre POSS katkılı polikaprolakton üretan doku iskelelerinde kıkırdak hücreleri başarılı bir şekilde tutunarak kaviteler arasına yayılmıştır (Guasti ve ark., 2014).



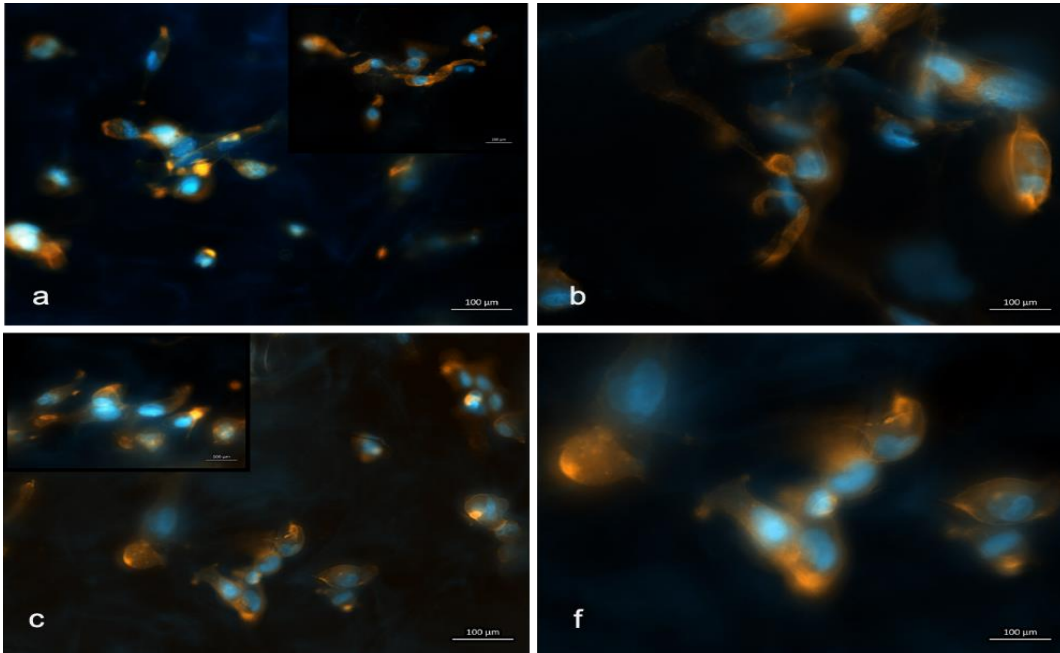
Şekil 80. Vankomisin yüklü nanoküre kaplı doku iskelelerinde SW 1353 hücrelerinin 7 gün sonunda tutunumu ve yayılması



Şekil 81. Gentamisin yüklü nanoküre kaplı doku iskelelerinde SW 1353 hücrelerinin 7 gün sonunda tutunumu ve yayılması



Şekil 82. Vankomisin yüklü nanoküre kaplı Kitosan/%20POSS doku iskelelerinde SW 1353 hücrelerinin 7. gün sonunda farklı büyütmede (10x ve 20x) floresans mikroskop görüntüleri



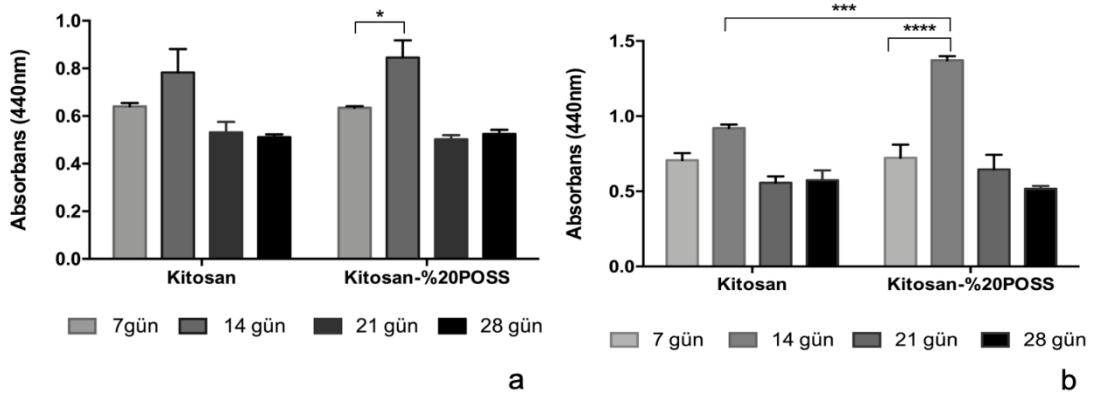
Şekil 83. Gentamisin yüklü nanoküre kaplı Kitosan-%20POSS doku iskelelerinde Saos-2 hücrelerinin 7 gün sonunda farklı büyütmede (10x ve 20x) floresans mikroskop görüntüleri

Literatürde yapılan bir çalışmada, simvastatin yüklü nanopartiküller kitosan doku iskelesi yapısına entegre edilerek kontrollü bir salım sistemi tasarlanmış ve bu

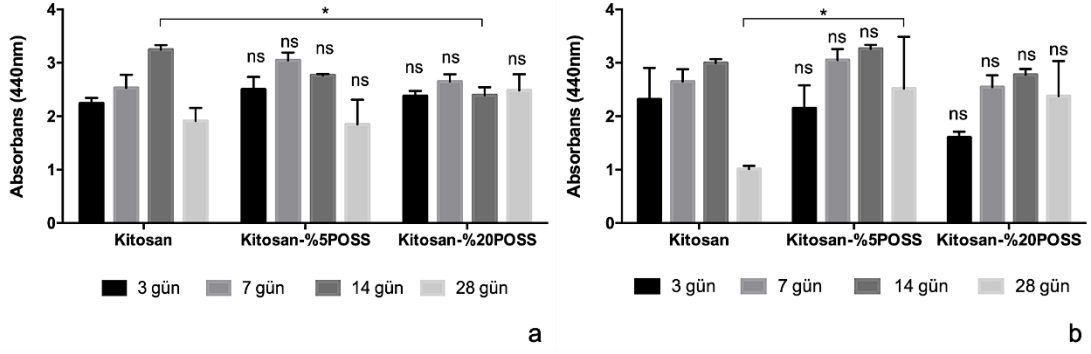
doku iskelesinin kemik kök hücreleri ile etkileşimi incelenmiştir. Xue ve arkadaşları simvastatin yüklü nanopartikül içeren kitosan doku iskeleleri üzerinde hücre tutunumunu incelemiş, farklı oranlarda ilaç içeren nanopartikül yüklü kitosan doku iskelelerinin hücreler için uygun ortamı sağladığı gözlenmiştir (Xue ve ark., 2019).

4.5.4 Saos-2 ve SW 1353 Hücrelerinin Kitosan/kil Nanoküre Kaplı Doku İskelelerinde Proliferasyonu

Saos-2 hücrelerinin doku iskeleleri üzerindeki 28 günlük inkübasyonunda, hücreler sağlıklı bir şekilde üremeye devam etmiştir. WST-1 canlılık kiti ile yapılan ölçümler Şekil 84'de verilmiştir. Sonuçlar incelendiğinde, Saos-2 hücrelerinin 14. güne kadar proliferasyonunda artış gerçekleşmiştir. Bu artış özellikle kitosan/POSS kompozit doku iskelelerinde daha belirgin olarak gözlenmiştir. 21.günden sonra proliferasyonda gözlenen azalmanın, hücrelerin farklılaşma aşamasına geçmesine bağlı gözlendiği düşünülmektedir. Gentamisin varlığında doku iskelesi grupları arasındaki artış farkı istatistiksel olarak anlamlı bulunmuştur. SW 1353 hücrelerinin doku iskeleleri üzerinde çoğalması 21 güne kadar incelenmiş, POSS katkısının kıkırdak hücre çoğalması üzerinde istatistiksel olarak anlamlı bir etkisi gözlenmemiştir.



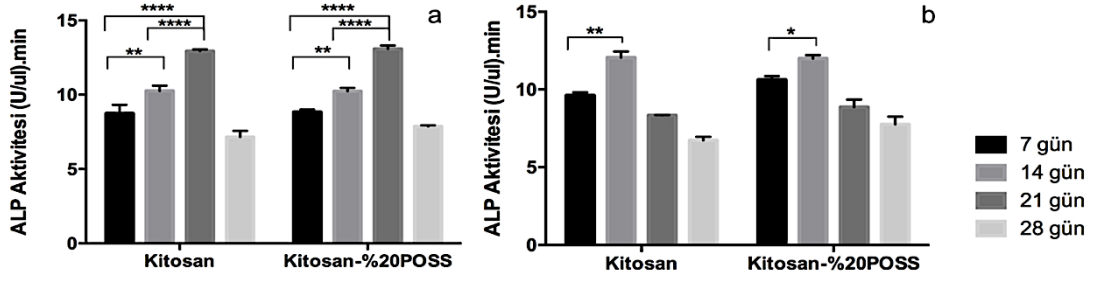
Şekil 84. Vankomisin (a) ve Gentamisin (b) yüklü kitosan/kil nanoküre kaplı doku iskelelerinde kültive edilen Saos-2 hücrelerinin proliferasyonu



Şekil 85. Vankomisin (a) ve Gentamisin (b) yüklü kitosan/kil nanoküre kaplı doku iskelelerinde kültive edilen SW 1353 hücrelerinin proliferasyonu

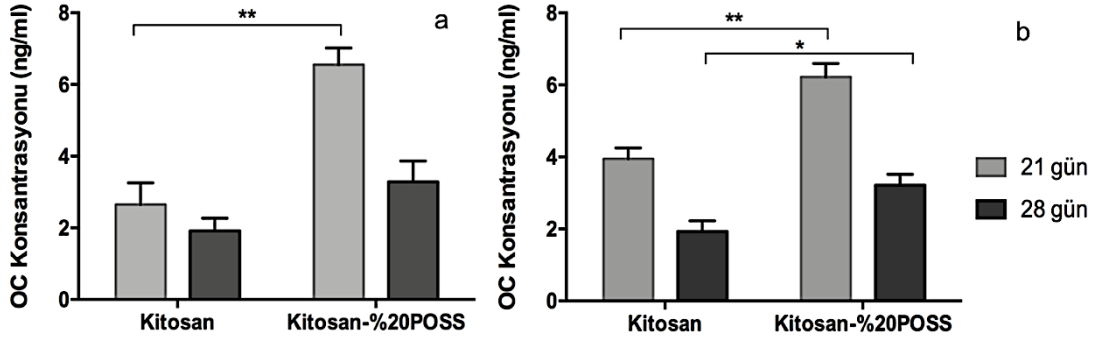
4.5.5 Doku İskelelerinde Saos-2 hücrelerinin farklılaşması: ALP Aktivitesi, Osteokalsin Sekresyonu ve Biyomineralizasyon

Alkalin fosfataz enzim aktivitesi, osteoblastik hücrelerde kemik doku oluşumunu tetikleyen ve erken dönemde gözlenen önemli bir farklılaşma faktörüdür. Bu yüzden doku iskelelerinde kültive edilen Saos-2 hücrelerinin ALP aktivitesi ölçülmüştür (Şekil 86). Sonuçlar gözönünde bulundurulduğunda, vankomisin yüklü nanoküre kaplı doku iskelelerinde antibiyotik ALP aktivitesi 21. güne kadar artmaya devam etmiş, sonrasında düşüş gözlenmiştir. Gentamisin yüklü nanoküre kaplı doku iskelelerinde ise ALP aktivitesinde 14. günden sonra düşüş gözlenmiştir. ALP aktivitesi erken dönemde artış gösterdiği için bu düşüş beklenmektedir. Geç inkübasyon dönemlerinde, osteokalsin gibi glikoprotein seviyeleri artarken ALP ekspresyonu azalmaktadır. ALP sonuçlarına göre, Saos-2 hücreleri her iki doku iskelesi grubunda da benzer bir ALP aktivite trendi göstermiştir. Bu trend değerlendirildiğinde, inkübasyon zamanına bağlı olarak gözlenen artış istatistiksel olarak anlamlı bulunmuştur.



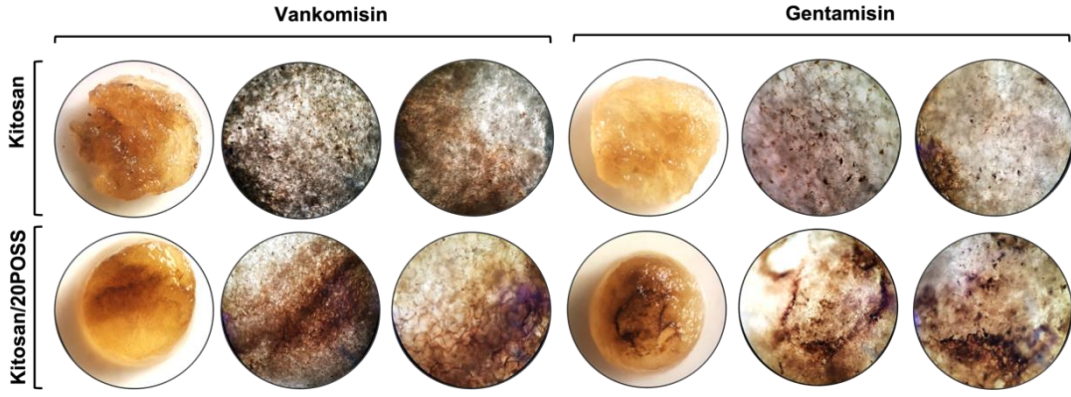
Şekil 86. Vankomisin (a) ve Gentamisin (b) yüklü kitosan/kil nanoküre kaplı doku iskelelerinde kültüre edilen Saos-2 hücrelerinin ALP aktiviteleri

Kemik doku oluşumunda, ALP aktivitesinin ardından gerçekleşen biyomineralizasyon prosesinde geç dönemde etkili olan faktörlerden biri de glikoprotein yapıdaki osteokalsinin sekresyonudur. Bu sebeple kültivasyonun 21 ve 28. Günlerindeki ortama salınan osteokalsin miktarı ELISA testi kullanılarak ölçülmüştür (Şekil 87). Elde edilen sonuçlara göre, kitosan doku iskelelerinde daha düşük seviyede osteokalsin sekresyonu gerçekleştiren Saos-2 hücrelerinin, POSS katkılı doku iskelelerinde osteokalsin sekresyonu artmıştır. Her iki antibiyotik varlığında hücrelerin 21. günde osteokalsin sekresyonu yüksek iken 28. günde düşüş gözlenmiştir. Doku iskelesi grupları arasında elde edilen istatistiksel olarak anlamlı farklar grafik üzerinde gösterilmiştir. Literatür incelendiğinde, Tamburacı ve Tihminlioğlu'nun yaptığı bir çalışmada POSS nanokafes yapıların kitosan matriks içine dahil edildiği ve biyoaktivitesinin incelendiği görülmüştür. *In vitro* çalışma sonuçlarında, Saos-2 osteoblastik hücrelerin POSS katkılı kitosan membranlar üzerinde çoğalarak yüksek ALP aktivitesi gösterdiği belirlenmiştir (Tamburacı& Tihminlioglu, 2018).

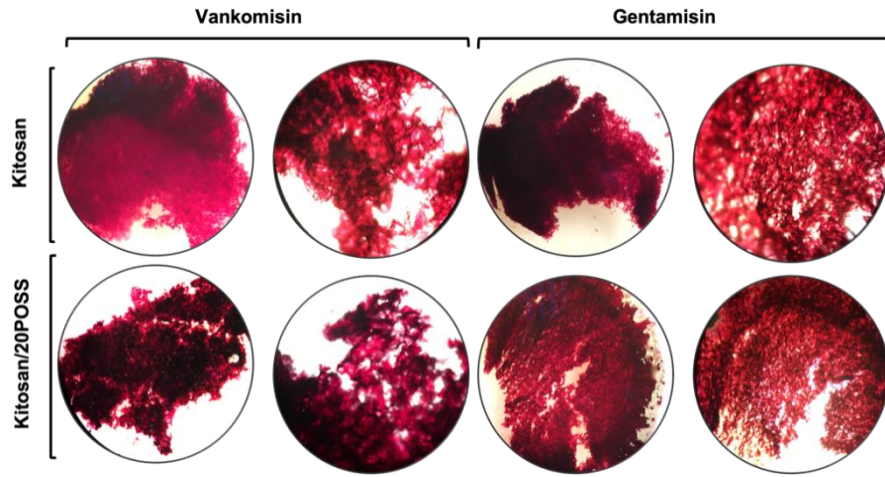


Şekil 87. Vankomisin (a) ve Gentamisin (b) yüklü kitosan/kil nanoküre kaplı doku iskelelerinde kültüre edilen Saos-2 hücrelerinin osteokalsin sekresyonu

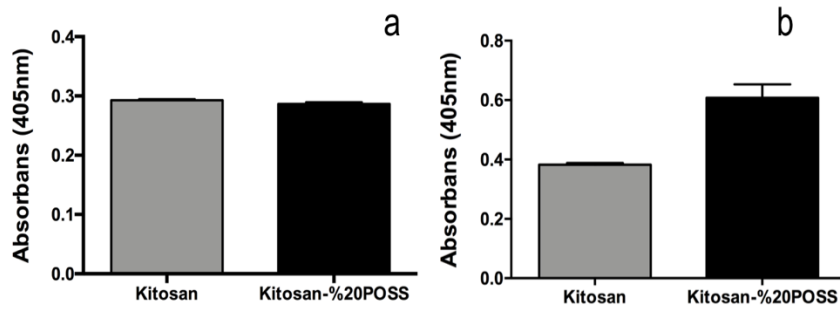
Antibiyotik yüklü nanoküre kaplı doku iskeleleri üzerinde oluşan kalsiyum fosfat birikimi Alizarin Red S (ARS) ve von Kossa (VK) boyamaları yapılarak belirlenmiştir. Kalsiyum boyaması ARS ile, fosfat boyaması ise VK ile yapılmıştır. 28 günlük kültürasyon sonunda boyanan doku iskeleleri stereomikroskop ve ışık mikroskobu ile gözlemlenmiş, doku iskelesi yüzeyindeki mineral oluşumları belirlenmiştir ve Şekil 88 ve Şekil 89’de mikroskop görüntüleri verilmiştir. VK boyama görüntülerine göre, POSS katkılı doku iskelelerinde belirgin bir kalsiyum fosfat birikimi gözlenirken kitosan doku iskelelerinde daha az yoğunlukta mineralizasyon gözlenmiştir. Önceki çalışmamızda da yer alan sonuçlarımızda, POSS katkılı karboksimetil selüloz/kitosan doku iskelelerinde biyomineralizasyonu artırdığı belirlenmiştir (Tamburacı ve ark., 2019) Bu durum negatif yüklü Si-O radikallerinin elektrostatik olarak pozitif kalsiyum iyonlarının ile biraraya gelmesi ve kalsiyum silikat oluşmasından kaynaklanmaktadır. Daha sonra kalsiyum silikat fosfat grupları ile etkileşime girerek amorf kalsiyum fosfat gruplarının oluşmasına neden olur. En son aşamada bu yapılar apatit kristallerine dönüşerek biyomineralizasyona sebep olur (Tananashi ve ark., 1994). ARS boyamasında ise tüm gruplarda kalsiyum birikimi gözlenirken, gruplar arasında belirgin bir fark mikroskop görüntülemesi ile elde edilememiştir. Bu nedenle, doku iskelelerindeki boyanmış kalsiyum mineralleri asetik asit ekstraksiyonu ile yüzeyden ayrılarak semi-kantitatif olarak absorbans değerleri ölçülmüştür (Şekil 90). Vankomisin yüklü nanoküre kaplı gruplar arasında fark görülmemiş, gentamisin yüklü nanoküre kaplı gruplarda ise POSS katkılı kitosan doku iskelelerinde kalsiyum birikimi daha fazla çıkmıştır.



Şekil 88. Vankomisin (a) ve Gentamisin (b) yüklü kitosan/kil nanoküre kaplı doku iskelelerinde kültür edilmiş Saos-2 hücrelerinin biyomineralizasyonu: ARS boyama sonrasında görüntülenmiş doku iskeleleri



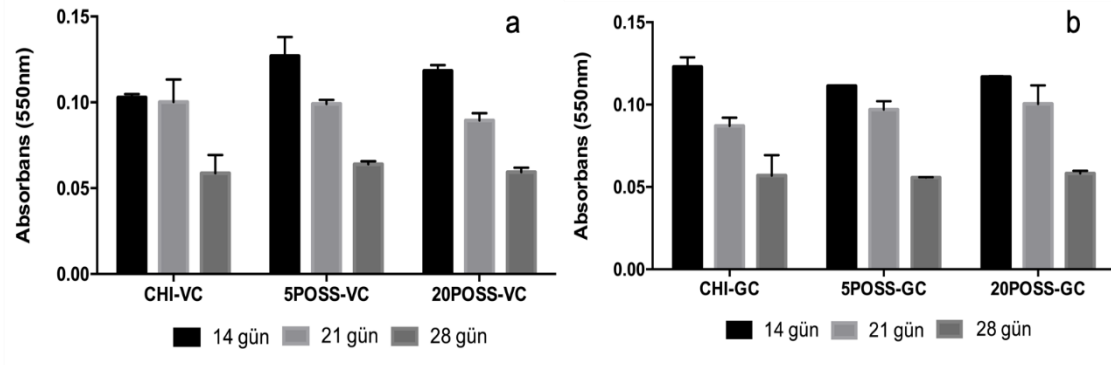
Şekil 89. Vankomisin (a) ve Gentamisin (b) yüklü kitosan/kil nanoküre kaplı doku iskelelerinde kültür edilmiş Saos-2 hücrelerinin biyomineralizasyonu: ARS boyama sonrasında görüntülenmiş doku iskeleleri



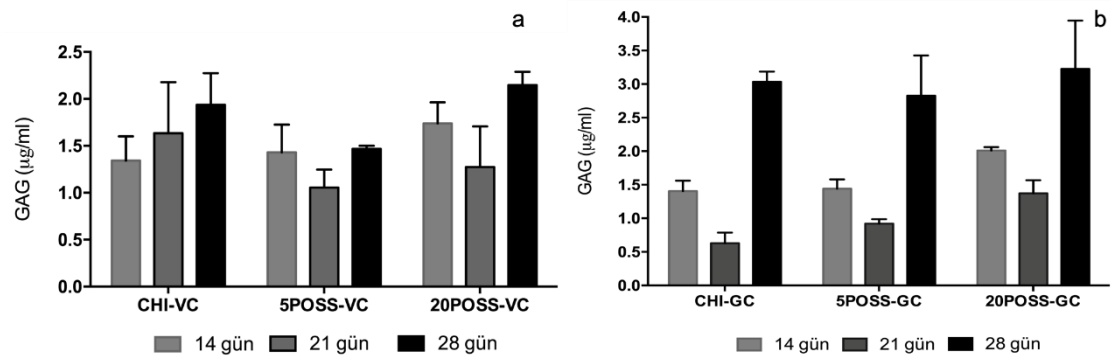
Şekil 90. Doku iskelelerindeki kalsiyum birikiminin ARS ekstraksiyon yöntemi ile semikantitatif ölçümü: Vankomisin yüklü nanoküre kaplı doku iskeleleri (a), Gentamisin yüklü nanoküre kaplı doku iskeleleri (b)

44.5.6 Doku İskelelerinde SW 1353 hücrelerinin farklılaşması: Hidroksiprolin ve GAG Sekresyonu

Kolajen hidrolizatları oligopeptid ve peptidlerden oluşmaktadır. Bunların arasında en yaygın olanı hidroksiprolindir (Nakatani ve ark., 2009). Bu nedenle, hidroksiprolin analizi birçok dokularda total kolajen miktarının belirlenmesinde kullanılmaktadır. Bunun yanısıra, kıkırdak dokuda kondrositler ekstraselüler matriks komponentlerinden olan proteoglikanları üretmektedir. Yapılan *in vitro* çalışmada doku iskeleleri üzerine ekilen SW 1353 hücreleri tarafından sentezlenen total kolajen miktarındaki değişim hidroksiprolin analizi ile belirlenmiştir. Bunun yanısıra, kıkırdak dokuda önemli bir rol oynayan ve ekstraselüler matriksin önemli bir bileşeni olan glikozaminoglikan (GAG) miktarı metakromatik bir boya olan 1,9 dimetilmetilen mavisi ile boyanarak gruplar arasındaki farklar spektrofotometrik olarak ölçülmüştür. Şekil 91'de SW1353 hücrelerinin antibiyotik yüklü nanoküre kaplı doku iskelelerinde kolajen sentezinin 14. günde en yüksek seviyede olduğu, inkübasyonun 21. ve 28. günlerinde ise total kolajen sentezinde azalma gözlenmiştir. Bu azalma proliferasyon dataları ile benzer bir trend göstermektedir. Farklı antibiyotik yüklü nanoküre kaplamalarının kolajen sentezini herhangi bir şekilde etkilemediği, POSS katkısının da hücreler üzerinde istatistiksel olarak anlamlı bir fark yaratmadığı görülmüştür. SW 1353 hücreleri vankomisin ve gentamisin yüklü nanoküre kaplı doku iskelelerinde inkübasyonun erken döneminde yüksek seviyede GAG sekresyonu sağlarken inkübasyonun 28. Gününe doğru GAG üretiminde azalma gözlenmiştir (Şekil 92). Vankomisinli gruplarda POSS katkılı doku iskelelerinde daha yüksek GAG üretimi gözlenmiştir. Gentamisin yüklü doku iskelelerinde ise tüm gruplar benzer bir trend sergilemiştir. Gomez-Sanchez ve arkadaşları yaptıkları çalışmada, Polilaktik asit/POSS nanokompozit doku iskelelerinde POSS nanokafes yapıların kıkırdak hücrelerinin biyoaktivitesi üzerindeki etkilerini incelemiştir. Hücrelerin POSS katkılı doku iskeleleri üzerinde kolajen 2 gen ekspresyonlarında artış gözlenmiştir. Fakat glikozaminoglikan (GAG) sekresyonlarında ciddi bir artış elde edilmemiştir (Gomez-Sanchez ve ark., 2014).



Şekil 91. Vankomisin ve Gentamisin Yüklü Nanoküre Kaplı Doku İskeleleri üzerinde İnkübe Edilmiş SW1353 Hücrelerinin Hidroksiprolin Sekresyonu



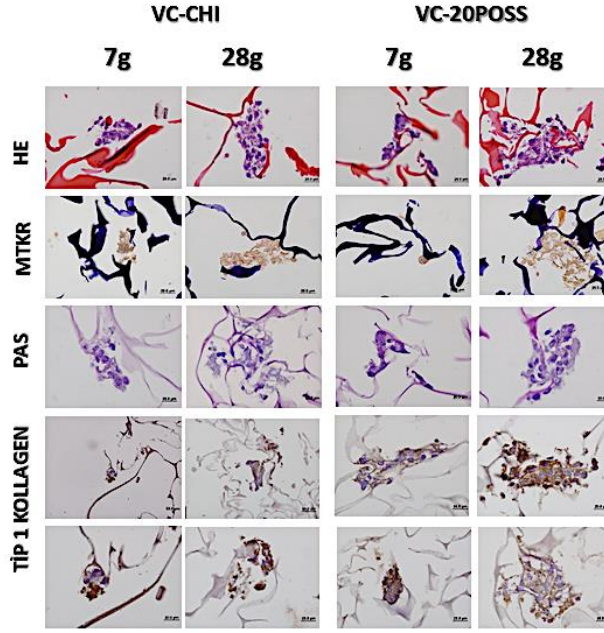
Şekil 92. Vankomisin ve Gentamisin Yüklü Nanoküre Kaplı Doku İskeleleri üzerinde İnkübe Edilmiş SW1353 Hücrelerinin GAG Sekresyonu

4.5.7 Histoloji Boyamaları

Histolojik analizler sonucunda Saos-2 ve SW 1353 hücrelerinin vankomisin ve gentamisin yüklü nanoküre kaplı kitosan ve kitosan/POSS doku iskelelerinde çoğalmaları ve farklılaşmaları incelenmiştir. 7 ve 28 günlük inkübasyon süreleri sonunda doku iskelelerinden alınan kesitler Hematoksin eozin, masson trikrom, PAS, Tip 1 kolajen ve Tip 2 kolajen boyamaları ile incelenmiştir. Şekil 93 ve 94'te Saos-2 hücrelerinin vankomisinli ve gentamisinli doku iskelesi gruplarında 7-28 gün'de çoğalmaları ve Tip 1 kolajen sekresyonları gösterilmiştir. Şekil 95 ve 96'da ise SW 1353 hücrelerinin vankomisinli ve gentamisinli doku iskelesi gruplarında 7-28 günlük inkübasyon periyotlarında çoğalmaları ve Tip 2 kolajen sekresyonları verilmiştir. Antibiyotik kaplı kitosan/POSS doku iskelelerinden elde edilen seri kesitler incelendiğinde Saos-2 ve SW-1353 hücrelerinin her iki doku iskelesinde de yerleştiği ve canlılığını sürdürdüğü ancak zamana bağlı olarak da histomorfolojik olarak farklılıklar gösterdiği izlenmiştir. Kesitler histokimyasal ve immunohistokimyasal

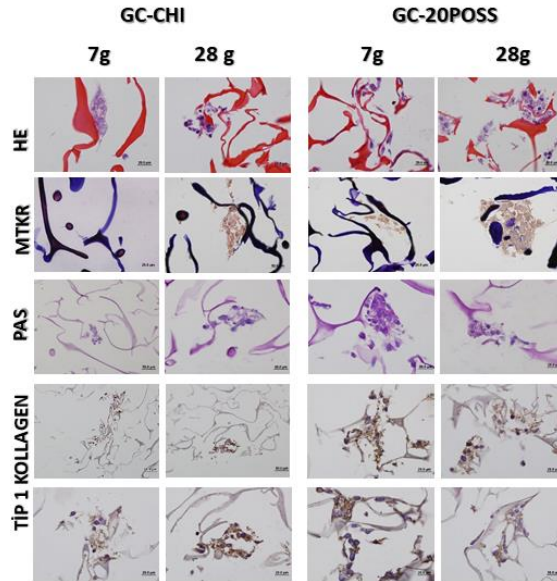
olarak boyandığında; hematoksilin-eosin boyamasında (H&E) hücrelerin genel morfolojisi ve ekstrasellüler matriksi, masson trikrom (MTKR) boyamasında matriksdeki kollajen içeriği, periodik asid schiff boyamasında (PAS) ise glikojen, glikoproteinler ve proteoglikanlar gibi karbonhidrat içeriği incelenmiştir. Tip 1 ve Tip 2 kollajen immunhistokimyasal boyamalarında da kollajen immunpozitiflikleri değerlendirilmiştir. H&E, MTKR ve PAS boyamalarında doku iskelelerinde hücrelerin çoğaldığı ve matriks oluşturduğu görülmüştür. Farklı bölgelerden kesitler alındığında, hücre kümelerinin daha çok doku iskelelerinin yüzey dış kısmında daha yoğun oldukları gözlenmiştir. Saos-2 hücrelerinin POSS doku iskelelerine tutunduğu, özellikle 28 günlük VC-20 POSS gruplarında diğer gruplara göre çoğalma ve matriks oluşturmalarının daha fazla olduğu bulunmuştur. Bu grupta Saos-2 hücreleri bir araya gelerek kümelenmeler oluşturmuş ve doku iskelesinin iç kısımlarında da hücre toplulukları oluşturduğu görülmüştür. GC/CHI ve GC-20POSS gruplarında ise VC-20 POSS grubuna göre hücre çoğalmalarının 28 günde azaldığı izlenmiştir. MTKR boyamasında ise POSS içeren doku iskelesinde kollajen içeriğinin arttığı, ayrıca PAS boyamalarında da daha yüksek mukopolisakkarit, glikoprotein ve proteoglikan içeriği olduğu gözlenmiştir. İmmuno-histokimyasal boyamalarda ise kollajen Tip 1 oluşumunun özellikle POSS içeren doku iskelesinde daha yoğun olduğu izlenmiştir. SW 1353 hücrelerinde ise Saos-2 hücreleri ile karşılaştırıldığında doku iskelesindeki proliferasyon ve kümeleşmelerinin sadece yüzeyde bazı alanlarda sınırlı kaldığı nadiren doku iskelesinin iç kısımlarında yerleştiği gözlenmiştir. Özellikle %20 POSS içerikli doku iskelesinde SW 1353 hücrelerinin daha iyi tutunduğu, çoğaldığı ve matriks oluşturduğu gözlenmiştir. Ancak, GC ile VC grupları karşılaştırıldığında GC gruplarında inkübasyon süresinin artmasıyla doku iskelesindeki hücre içeriği ve morfolojinin bozulduğu görülmüştür. MTKR boyamasında ise POSS içeren doku iskelelerinde kollajen içeriğinin arttığı, ayrıca PAS boyamalarında da daha fazla mukopolisakkarit, glikoprotein ve proteoglikan içeriği olduğu gözlenmiştir. İmmuno-histokimyasal boyamalarda ise kollajen Tip 2 immunpozitifliğinin özellikle VC-5POSS ve VC-20POSS doku iskelelerinde daha yoğun olduğu izlenmiştir.

Saos-2



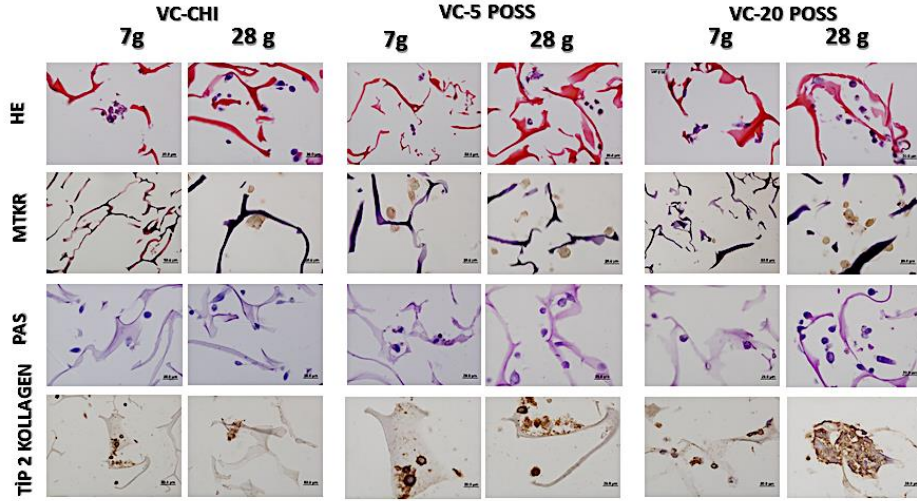
Şekil 93. Vankomisin yüklü nanoküre kaplı doku iskelelerinde inkübe edilen Saos-2 hücrelerinin histolojik analizleri

Saos-2



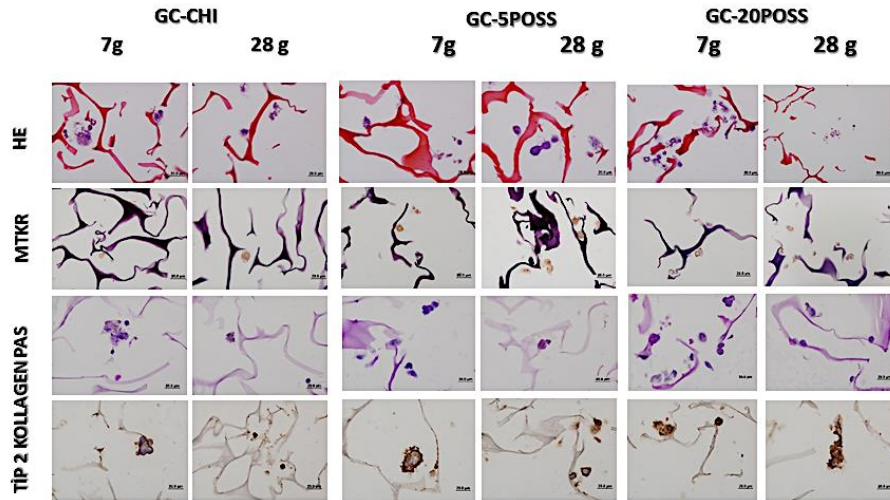
Şekil 94. Gentamisin yüklü nanoküre kaplı doku iskelelerinde inkübe edilen Saos-2 hücrelerinin histolojik analizleri

SW-1353



Şekil 95. Vankomisin yüklü nanoküre kaplı doku iskelelerinde inkübe edilen SW 1353 hücrelerinin histolojik analizleri

SW-1353



Şekil 96. Gentamisin yüklü nanoküre kaplı doku iskelelerinde inkübe edilen SW 1353 hücrelerinin histolojik analizleri

5. GENEL SONUÇLAR

Tasarlanan kontrollü antibiyotik salımı yapan nanoküreler ve doku iskelelerinde nanokatıkların dağılımı için kullanılan yüksek basınçlı homojenizasyon sistemi (mikrofludizer) kullanılarak polimer yapı üzerindeki etkiler belirlenmiş ve ilk kez bir biyomalzeme üretim prosesi optimize edilmiştir.

Sonraki aşamada, elektrosprey yöntemi ile elde edilen kitosan/montmorillonit nanokürelere iki farklı bakteri türüne (gram negatif ve pozitif) etki eden antibiyotikler (gentamisin ve vankomisin) başarılı bir şekilde yüklenmiş ve yüksek enkapsülasyon kapasitesine sahip, düzgün morfolojiye ve partikül dağılımına sahip nanoküreler elde edilmiştir. Vankomisin yüklü nanoküreler %86, gentamisin yüklü nanoküreler ise %95 enkapsülasyon verimi ile elde edilmiştir. DLS analizi sonuçlarına göre gentamisin yüklü nanokürelerin hidrodinamik çapı 182 nm iken vankomisin yüklü nanokürelerde ise hidrodinamik çap 351 nm olarak ölçülmüştür.

Antibiyotik yüklü kitosan/montmorillonit nanoküreler in vitroda 30 gün salım yapmıştır. Bu kürelerin kemik enfeksiyonlarının uzun dönem tedavisinde kullanılabilecekleri düşünülmektedir. Elde edilen salım sıvıları disk difüzyon yöntemi ile incelenmiş ve antimikrobiyal etki göstermiştir.

Kontrollü ilaç salım sistemini immobilize etmek için kullanılan kitosan/POSS doku iskeleleri dondurarak kurutma yöntemi ile yüksek gözeneklilikte (%89) ve 221-234 um gözenek çapı aralığında homojen yapıda elde edilmiştir. POSS katkısı ile kitosan doku iskelesinde biyomineralizasyonu tetikleyen bir yüzey yapısı elde edilmiştir.

Elde edilen ilaç yüklü nanoküreler başarılı bir şekilde kitosan/POSS nanokompozit doku iskeleleri üzerine kaplanarak elektropüskürtme yöntemi ile immobilize edilmiştir. Nanoküre kaplı doku iskeleleri *E. coli* ve *S. aureus* bakterilerine karşı antimikrobiyal özellik göstermiştir. Doku iskelelerine immobilize edilen nanokürelerin in vitro ilaç salım profili incelenmiştir. Nanokürelerin doku iskelelerine sabitlenmesi salım süresini uzatmıştır. Vankomisin yüklü nanoküre-doku iskelesi sisteminde 43 gün olan salım süresi gentamisin yüklü nanoküre-doku iskelesi sisteminde 110 gün olarak belirlenmiştir.

Üretilen nanoküre kaplı doku iskelelerinin in vitro biyoaktivitesi kemik ve kırık hücreleri ile incelenmiştir. Nanoküre kaplı doku iskeleleri kemik ve kırık hücreleri üzerinde sitotoksik etki göstermemiştir. Bununla birlikte, malzeme yüzeyi kemik ve kırık hücrelerinin tutunumu için uygun bulunmuştur. Antibiyotik yüklü doku iskelelerinde yüksek ALP aktivitesi ve biyomineralizasyon kapasitesi



gözlenmiştir. Bu sebeple kemik hücreleri için uygun bir yapı olarak değerlendirilmiştir. Kıkırdak hücreleri ile yapılan çalışmalarda ise POSS katkılı nanoküre kaplı doku iskelelerinin ciddi bir etkisi gözlenmemiştir.

REFERANSLAR

Albuhairan, B., D. Hind, and A. Hutchinson (2008). Antibiotic prophylaxis for wound infections in total joint arthroplasty: a systematic review. *Bone & Joint Journal* 90(7), 915-919.

Anal, A. K., and W. F. Stevens (2005). Chitosan-Alginate Multilayer Beads for Controlled Release of Ampicillin. *International Journal of Pharmaceutics* 290(1–2), 45–54.

Arca, H.Ç., and S. Şenel (2008). Chitosan Based Systems for Tissue Engineering Part 1: Hard Tissues. *Fabad Journal of Pharmaceutical Sciences* 33(1), 35–49.

Babaei, M., Ghaee, A., & Nourmohammadi, J. (2019). Poly (sodium 4-styrene sulfonate)-modified hydroxyapatite nanoparticles in zein-based scaffold as a drug carrier for vancomycin. *Materials Science and Engineering: C*, 100, 874-885.

Bao, H., Y. Pan, Y. Ping, N. G. Sahoo, T. Wu, L. Li, J. Li, and L. H. Gan (2011). Chitosan-Functionalized Graphene Oxide as a Nanocarrier for Drug and Gene Delivery. *Small* 7(11), 1569–1578.

Baxter, A., Dillon, M., Taylor, K. A., & Roberts, G. A. (1992). Improved method for ir determination of the degree of N-acetylation of chitosan. *International journal of biological macromolecules*, 14(3), 166-169.

Bonilla, J., Atarés, L., Vargas, M., & Chiralt, A. (2012). Effect of essential oils and homogenization conditions on properties of chitosan-based films. *Food hydrocolloids*, 26(1), 9-16.

Bose, S., Roy, M., & Bandyopadhyay, A. (2012). Recent advances in bone tissue engineering scaffolds. *Trends in biotechnology*, 30(10), 546-554.

Chen, J., R. H. Liang, W. L., C. M. L., T. Li, Z. C. Tu, and J. Wan (2012). Degradation of High-Methoxyl Pectin by Dynamic High Pressure Microfluidization and Its Mechanism. *Food Hydrocolloids* 28(1), 121–129.



Chen, R.H. (2005). Manipulations of the Molecular Weight and/or the Degree of Deacetylation of Chitosan by Mechanical Treatments. *Journal of Metals, Materials and Minerals*, 15(1), 7-11.

Chen, Y., A. Zhou, B. Liu, and J. Liang (2010). Tramadol Hydrochloride/Montmorillonite Composite: Preparation and Controlled Drug Release. *Applied Clay Science* 49(3), 108–112.

Cheung, H. Y., Lau, K. T., Lu, T. P., & Hui, D. (2007). A critical review on polymer-based bio-engineered materials for scaffold development. *Composites Part B: Engineering*, 38(3), 291-300.

Costa-Pinto, A. R., Reis, R. L., & Neves, N. M. (2011). Scaffolds based bone tissue engineering: the role of chitosan. *Tissue Engineering Part B: Reviews*, 17(5), 331-347.

Croisier, F., and C. Jérôme (2013). Chitosan-Based Biomaterials for Tissue Engineering. *European Polymer Journal* 49(4), 780–792.

Darder, M., M. Colilla, and E. Ruiz-Hitzky (2005). Chitosan-Clay Nanocomposites: Application as Electrochemical Sensors. *Applied Clay Science* 28(1–4), 199–208.

Dash, M., F. Chiellini, R. M. Ottenbrite, and E. Chiellini (2011). Chitosan - A Versatile Semi-Synthetic Polymer in Biomedical Applications. *Progress in Polymer Science* 36(8), 981–1014.

Depan, D., A. P. Kumar, and R. P. Singh (2009). Cell Proliferation and Controlled Drug Release Studies of Nanohybrids Based on Chitosan-g-Lactic Acid and Montmorillonite. *Acta Biomaterialia* 5(1), 93–100.

Draget, K. I. (1996). Associating phenomena in highly acetylated chitosan gels. *Polymer Gels and Networks*, 4(2), 143-151.

Dodiuk-Kenig, H., Maoz, Y., Lizenboim, K., Eppelbaum, I., Zalsman, B., & Kenig, S. (2006). The effect of grafted caged silica (polyhedral oligomeric silsesquioxanes) on the properties of dental composites and adhesives. *Journal of adhesion science and technology*, 20(12), 1401-1412.

Esmaeili, F., Ghahremani, M. H., Ostad, S. N., Atyabi, F., Seyedabadi, M., Malekshahi, M. R., ... & Dinarvand, R. (2008). Folate-receptor-targeted delivery of docetaxel nanoparticles prepared by PLGA–PEG–folate conjugate. *Journal of drug targeting*, 16(5), 415-423.

Ghanbari, H., Marashi, S. M., Rafiei, Y., Chaloupka, K., & Seifalian, A. M. (2011). Biomedical application of polyhedral oligomeric silsesquioxane nanoparticles. In *Applications of polyhedral oligomeric silsesquioxanes* (pp. 363-399). Springer, Dordrecht.

Gomez-Sanchez, C., Kowalczyk, T., Ruiz De Eguino, G., Lopez-Arraiza, A., Infante, A., Rodriguez, C. I., Kowalewski T.A., Sarrionandia M. & Aurrekoetxea, J. (2014). Electrospinning of poly (lactic acid)/polyhedral oligomeric silsesquioxane nanocomposites and their potential in chondrogenic tissue regeneration. *Journal of Biomaterials Science, Polymer Edition*, 25(8), 802-825.

Guasti, L., Vagaska, B., Bulstrode, N. W., Seifalian, A. M., & Ferretti, P. (2014). Chondrogenic differentiation of adipose tissue-derived stem cells within nanocaged POSS-PCU scaffolds: a new tool for nanomedicine. *Nanomedicine: Nanotechnology, Biology and Medicine*, 10(2), 279-289.

Gupta, K. C., & Jabrail, F. H. (2006). Effects of degree of deacetylation and cross-linking on physical characteristics, swelling and release behavior of chitosan microspheres. *Carbohydrate polymers*, 66(1), 43-54.

Günister, E., D. Pestreli, C. H. Ünlü, O. Atici, and N. Güngör (2007). Synthesis and Characterization of Chitosan-MMT Biocomposite Systems. *Carbohydrate Polymers* 67(3), 358–365.

Hidayat, L. K., D. I. Hsu, R. Quist, K. A. Shriner, and A. Wong-Beringer (2006). High-Dose Vancomycin Therapy for Methicillin-Resistant Staphylococcus Aureus Infections. *Archives of Internal Medicine* 166(19), 2138.

Hirota, K., A. C. Doty, R. Ackermann, J. Zhou, K. F. Olsen, M. R. Feng, Y. Wang, S.



Choi, W. Qu, A. S. Schwendemann and S. P. Schwendemann (2016). Characterizing Release Mechanisms of Leuprolide Acetate-Loaded PLGA Microspheres for IVIVC Development I: *In vitro* Evaluation. *Journal of Controlled Release* 244, 302–313.

Hogan, A., V. G. Heppert, and A. J. Suda (2013). Osteomyelitis. *Archives of Orthopaedic and Trauma Surgery* 133(9), 1183–1196.

Hong, Z., Reis, R. L., & Mano, J. F. (2008). Preparation and in vitro characterization of scaffolds of poly (L-lactic acid) containing bioactive glass ceramic nanoparticles. *Acta Biomaterialia*, 4(5), 1297-1306.

Huang, Y. et al. (2015). Carboxymethyl chitosan/clay nanocomposites and their copper complexes: Fabrication and property. *Carbohydrate polymers*, 134, 390-397.

Huang, Y. C., Li, R. Y., Chen, J. Y., & Chen, J. K. (2016). Biphasic release of gentamicin from chitosan/fucoidan nanoparticles for pulmonary delivery. *Carbohydrate polymers*, 138, 114-122.

Huang L., Tan J., Li W., Zhou L., Liu Z., Luo B., Lu L., Zhou C. (2019). Functional polyhedral oligomeric silsesquioxane reinforced poly(lactic acid) nanocomposites for biomedical applications, *Journal of the Mechanical Behavior of Biomedical Materials*, Volume 90,604-614.

Hulbert, S. F., F. A. Young, R. S. Mathews, J. J. Klawitter, C. D. Talbert, and F. H. Stelling (1970). Potential of Ceramic Materials as Permanently Implantable Skeletal Prostheses. *Journal of Biomedical Materials Research* 4(3), 433–456.

Hussain, M. R., Iman, M., & Maji, T. K. (2013). Determination of degree of deacetylation of chitosan and their effect on the release behavior of essential oil from chitosan and chitosan-gelatin complex microcapsules. *International Journal of Advanced Engineering Applications*, 6(4), 4-12.

Hutmacher, D. W., Schantz, J. T., Lam, C. X. F., Tan, K. C., & Lim, T. C. (2007). State of the art and future directions of scaffold-based bone engineering from a biomaterials perspective. *Journal of tissue engineering and regenerative medicine*, 1(4), 245-260.



Ji, J., Hao, S., Wu, D., Huang, R., & Xu, Y. (2011). Preparation, characterization and in vitro release of chitosan nanoparticles loaded with gentamicin and salicylic acid. *Carbohydrate polymers*, 85(4), 803-808.

Joshi, G. V., H. A. Patel, B. D. Kevadiya, and H. C. Bajaj (2009). Montmorillonite Intercalated with Vitamin B1 as Drug Carrier. *Applied Clay Science* 45(4), 248–253.

Kang, X., J. Wang, H. Wu, I. A. Aksay, J. Liu, and Y. Lin (2009). Glucose Oxidase-Graphene-Chitosan Modified Electrode for Direct Electrochemistry and Glucose Sensing. *Biosensors and Bioelectronics* 25(4), 901–905.

Kannan, R. Y., Salacinski, H. J., De Groot, J., Clatworthy, I., Bozec, L., Horton, M., Butler P.E., Seifalian, A. M. (2006). The antithrombogenic potential of a polyhedral oligomeric silsesquioxane (POSS) nanocomposite. *Biomacromolecules*, 7(1), 215-223.

Kaushik, A., R. Khan, P. R. Solanki, P. Pandey, J. Alam, S. Ahmad, and B. D. Malhotra (2008). Iron Oxide Nanoparticles-Chitosan Composite Based Glucose Biosensor. *Biosensors and Bioelectronics* 24(4), 676–683.

Kevadiya, B. D., G. V. Joshi, and H. C. Bajaj (2010). Layered Bionanocomposites as Carrier for Procainamide. *International Journal of Pharmaceutics* 388(1–2), 280–286.

Kim, S. B., Y. J. Kim, T. L. Yoon, S. A. Park, I. H. Cho, E. J. Kim, I. A. Kim, and J. W. Shin (2004). The Characteristics of a Hydroxyapatite-Chitosan-PMMA Bone Cement. *Biomaterials* 25(26), 5715–5723.

Kim, S. K., Heo, S. J., Koak, J. Y., Lee, J. H., Lee, Y. M., Chung, D. J., Lee I.J., Kong S.D. (2007). A biocompatibility study of a reinforced acrylic-based hybrid denture composite resin with polyhedraloligosilsesquioxane. *Journal of oral rehabilitation*, 34(5), 389-395.

Kim, I. Y., S. J. Seo, H. S. Moon, M. K. Yoo, I. Y. Park, B. C. Kim, and C. S. Cho (2008). Chitosan and Its Derivatives for Tissue Engineering Applications. *Biotechnology Advances* 26(1), 1–21.

Kong, L., Y. Gao, W. Cao, Y. Gong, N. Zhao, and X. Zhang (2005). Preparation and Characterization of Nano-Hydroxyapatite/Chitosan Composite Scaffolds. *Journal of*



Biomedical Materials Research - Part A 75(2), 275–282.

Koosha, M., Mirzadeh, H., Shokrgozar, M. A., & Farokhi, M. (2015). Nanoclay-reinforced electrospun chitosan/PVA nanocomposite nanofibers for biomedical applications. *RSC Advances*, 5(14), 10479-10487

Kosmulski, M. (2011). The pH-dependent surface charging and points of zero charge: V. Update. *Journal of colloid and interface science*, 353(1), 1-15.

Knight P.T., Lee K.M., Qin H., Mather P.T. (2008). Biodegradable thermoplastic polyurethanes incorporating polyhedral oligosilsesquioxane, *Biomacromolecules*, 9(9) (2008) 2458-2467.

Kumari, A., S. K. Yadav, and S. C. Yadav (2010). Biodegradable Polymeric Nanoparticles Based Drug Delivery Systems. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces* 75(1), 1–18.

Kumari, A., S. K. Yadav, and S. C. Yadav (2010). Biodegradable Polymeric Nanoparticles Based Drug Delivery Systems. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces* 75(1), 1–18.

Kurczewska, J., Pecyna, P., Ratajczak, M., Gajęcka, M., & Schroeder, G. (2017). Halloysite nanotubes as carriers of vancomycin in alginate-based wound dressing. *Saudi pharmaceutical journal*, 25(6), 911-920.

Lan, Y., Li, W., Jiao, Y., Guo, R., Zhang, Y., Xue, W., & Zhang, Y. (2014). Therapeutic efficacy of antibiotic-loaded gelatin microsphere/silk fibroin scaffolds in infected full-thickness burns. *Acta biomaterialia*, 10(7), 3167-3176.

Lertsutthiwong, P., K. Noomun, S. Khunthon, and S. Limpanart (2012). Influence of Chitosan Characteristics on the Properties of Biopolymeric Chitosan–montmorillonite. *Progress in Natural Science: Materials International* 22(5), 502–508.

Mader, J. T., and K. Adams (1989). Comparative Evaluation of Daptomycin (LY146032) and Vancomycin in the Treatment of Experimental Methicillin-Resistant *Staphylococcus Aureus* Osteomyelitis in Rabbits. *Antimicrobial Agents and*

Chemotherapy 33(5), 689–692.

Madhumathi, K., P.S. Kumar, K. C. Kavya, T. Furuike, H. Tamura, S. V. Nair and R. Jayakumar (2009). Novel chitin/nanosilica composite scaffolds for bone tissue engineering applications. *International journal of biological macromolecules*, 45(3), 289-292.

Mahdi Jafari, S., Y. He, and B. Bhandari (2006). Nano-Emulsion Production by Sonication and Microfluidization - A Comparison. *International Journal of Food Properties* 9(3), 475–485.

Martino, A. D., M. Sittinger, and M. V. Risbud (2005). Chitosan: A Versatile Biopolymer for Orthopaedic Tissue-Engineering. *Biomaterials* 26(30), 5983–5890.

McCusker, C., Carroll, J. B., & Rotello, V. M. (2005). Cationic polyhedral oligomeric silsesquioxane (POSS) units as carriers for drug delivery processes. *Chemical Communications*, (8), 996-998.

Murphy, C. M., M. G. Haugh, and F. J. O'Brien (2010). The Effect of Mean Pore Size on Cell Attachment, Proliferation and Migration in Collagen-Glycosaminoglycan Scaffolds for Bone Tissue Engineering. *Biomaterials* 31(3), 461–466.

Nakatani, S., Mano, H., Sampei, C., Shimizu, J., & Wada, M. (2009). Chondroprotective effect of the bioactive peptide prolyl-hydroxyproline in mouse articular cartilage in vitro and in vivo. *Osteoarthritis and cartilage*, 17(12), 1620-1627.

Narayanan, K. B. and N. Sakthivel (2011). Green synthesis of biogenic metal nanoparticles by terrestrial and aquatic phototrophic and heterotrophic eukaryotes and biocompatible agents. *Advances in colloid and interface science*, 169(2), 59-79.

Noel, S. P., H. Courtney, J. D. Bumgardner, and W. O. Haggard (2008). Chitosan Films: A Potential Local Drug Delivery System for Antibiotics. *Clinical Orthopaedics and Related Research* 466(6), 1377–1382.

Noel, S. P., H. S. Courtney, J. D. Bumgardner, and W. O. Haggard (2010). Chitosan Sponges to Locally Deliver Amikacin and Vancomycin: A Pilot in vitro Evaluation. *Clinical Orthopaedics and Related Research* 468(8), 2074–2080.

Panagiotou, T., J.M. Bernard, and S.V. Mesite (2008). Deagglomeration and Dispersion of Carbon Nanotubes Using Microfluidizer High Shear Fluid Processors. *Nano Science and Technology Institute-Nanotech 1*, 39–42.

Pankongadisak, P., Jaikaew, N., Kiti, K., Chuenjitkuntaworn, B., Supaphol, P., & Suwantong, O. (2019). The potential use of gentamicin sulfate-loaded poly (l-lactic acid)-sericin hybrid scaffolds for bone tissue engineering. *Polymer Bulletin*, 76(6), 2867-2885.

Patel, V. R., and M. M. Amiji (1996). Preparation and Characterization of Freeze-Dried Chitosan-Poly(Ethylene Oxide) Hydrogels for Site-Specific Antibiotic Delivery in the Stomach. *Pharmaceutical Research* 13(4), 588–593.

Perdones, A., L. Sánchez-González, A. Chiralt, and M. Vargas (2012). Effect of Chitosan-Lemon Essential Oil Coatings on Storage-Keeping Quality of Strawberry. *Postharvest Biology and Technology* 70, 32–41.

Perdones, A., Sánchez-González, L., Chiralt, A., & Vargas, M. (2012). Effect of chitosan–lemon essential oil coatings on storage-keeping quality of strawberry. *Postharvest Biology and Technology*, 70, 32-41.

Pillai, C. K. S. , W. Paul, and C. P. Sharma (2009). Chitin and Chitosan Polymers: Chemistry, Solubility and Fiber Formation. *Progress in Polymer Science* 37(4), 641-678.

Pillai, O., and R. Panchagnula (2001). Polymers in Drug Delivery. *Current Opinion in Chemical Biology* 5(4), 447-451.

Pishbin, F., Mouriño, V., Flor, S., Kreppel, S., Salih, V., Ryan, M. P., & Boccaccini, A. R. (2014). Electrophoretic deposition of gentamicin-loaded bioactive glass/chitosan composite coatings for orthopaedic implants. *ACS applied materials & interfaces*, 6(11), 8796-8806]

Pittman, C. U., Li, G. Z., & Cho, H. S. (2006). Chemical Bonding between phenolic resins and polyhedral oligomeric silsesquioxanes (POSS) in inorganic–organic hybrid



nanocomposites. *Journal of Inorganic and Organometallic Polymers and Materials*, 16(1), 43-59.

Rapacz-Kmita, A., Stodolak-Zych, E., Ziabka, M., Rozycka, A., & Dudek, M. (2015). Instrumental characterization of the smectite clay–gentamicin hybrids. *Bulletin of Materials Science*, 38(4), 1069-1078.

Rumian, Ł., Tiainen, H., Cibor, U., Krok-Borkowicz, M., Brzychczy-Włoch, M., Haugen, H. J., & Pamuła, E. (2016). Ceramic scaffolds enriched with gentamicin loaded poly (lactide-co-glycolide) microparticles for prevention and treatment of bone tissue infections. *Materials Science and Engineering: C*, 69, 856-864.

Ryu, T. K., S. E. Kim, J. H. Kim, S. K. Moon, and S. W. Choi (2014). Biodegradable Uniform Microspheres Based on Solid-in-Oil-in-Water Emulsion for Drug Delivery: A Comparison of Homogenization and Fluidic Device. *Journal of Bioactive and Compatible Polymers* 29(5), 445–57.

Salcedo, I., C. Aguzzi, G. Sandri, M. C. Bonferoni, M. Mori, P. Cerezo, R. Sánchez, C. Viseras, and C. Caramella (2012). *In vitro* Biocompatibility and Mucoadhesion of Montmorillonite Chitosan Nanocomposite: A New Drug Delivery. *Applied Clay Science* 55, 131–37.

Salvati, E. A., A. G. D. Valle, B. A. Masri, C. P. Duncan, A. G. D. Valle, A. González, and D. Valle (2003). The Infected Total Hip Arthroplasty. *Instructional Course Lectures* 52, 223–45.

Sezer, A. D., H. K. Sarılmışer, E. Rayaman, A. Çevikbaş, E. T. Öner, and J. Akbuğa(2017). Development and Characterization of Vancomycin-Loaded Levan-Based Microparticulate System for Drug Delivery. *Pharmaceutical Development and Technology* 22(5), 627–634.

Shi, P., Zuo, Y., Li, X., Zou, Q., Liu, H., Zhang, L., ... & Morsi, Y. S. (2010). Gentamicin-impregnated chitosan/nanohydroxyapatite/ethyl cellulose microspheres granules for chronic osteomyelitis therapy. *Journal of Biomedical Materials Research Part A: An Official Journal of The Society for Biomaterials, The Japanese Society for Biomaterials, and The Australian Society for Biomaterials and the Korean Society for Biomaterials*, 93(3), 1020-1031.

Silva, S. M., Braga, C. R., Fook, M. V., Raposo, C. M., Carvalho, L. H., & Canedo, E. L. (2012). Application of infrared spectroscopy to analysis of chitosan/clay nanocomposites. In *Infrared Spectroscopy-Materials Science, Engineering and Technology*. InTech.

Song, B. B., S. H. Sha, and J. Schacht (1998). Iron Chelators Protect from Aminoglycoside-Induced Cochleo- and Vestibulo-Toxicity. *Free Radical Biology and Medicine* 25(2), 189–195.

Stevens, M. M. (2008). Biomaterials for Bone Tissue Engineering. *Materials Today* 11(5), 18–25.

Sulca, N. M., Lungu, A., Garea, S. A., & Iovu, H. (2009). Monitoring the synthesis of new polymer nanocomposites based on different polyhedral oligomeric silsesquioxanes using Raman spectroscopy. *Journal of Raman Spectroscopy: An International Journal for Original Work in all Aspects of Raman Spectroscopy, Including Higher Order Processes, and also Brillouin and Rayleigh Scattering*, 40(11), 1634-1640.

Sussman, Carrie, and Barbara Bates-Jensen (2012). *Wound Care - A Collaborative Practice Manual for Health Professionals*. *Journal of Chemical Information and Modeling* 53(9), 1-836.

Tamburaci, S., & Tihminlioglu, F. (2018). Novel POSS reinforced chitosan composite membranes for guided bone tissue regeneration. *Journal of Materials Science: Materials in Medicine*, 29(1), 1.

Tamburaci S., Kimna C., Tihminlioglu, F. (2019). Bioactive diatomite and POSS silica cage reinforced chitosan/Na- T carboxymethyl cellulose polyelectrolyte scaffolds for hard tissue regeneration. *Materials Science and Engineering: C*, 100, 196-208.

Tanahashi, M., Yao, T., Kokubo, T., Minoda, M., Miyamoto, T., Nakamura, T., & Yamamuro, T. (1994). Apatite coated on organic polymers by biomimetic process: improvement in its adhesion to substrate by NaOH treatment. *Journal of Applied Biomaterials*, 5(4), 339-347.



Thian, E. S., Huang, J., Best, S. M., Barber, Z. H., & Bonfield, W. (2005). A new way of incorporating silicon in hydroxyapatite (Si-HA) as thin films. *Journal of Materials Science: Materials in Medicine*, 16(5), 411-415.

Tomic, I., A. Vidis-Millward, M. Mueller-Zsigmondy, and J-M M. Cardot (2016). Setting Accelerated Dissolution Test for PLGA Microspheres Containing Peptide, Investigation of Critical Parameters Affecting Drug Release Rate and Mechanism. *International Journal of Pharmaceutics* 505(1–2), 42–51.

Vargas, M., Perdones, Á., Chiralt, A., Cháfer, M., & González-Martínez, C. (2011). Effect of homogenization conditions on physicochemical properties of chitosan-based film-forming dispersions and films. *Food Hydrocolloids*, 25(5), 1158-1164.

Wagh, A. S. (2004). *Chemically Bonded Phosphate Ceramics*. (2nd Edition) Elsevier.

Wu, T., Zhang, Q., Ren, W., Yi, X., Zhou, Z., Peng, X., & Lang, M. (2013). Controlled release of gentamicin from gelatin/genipin reinforced beta-tricalcium phosphate scaffold for the treatment of osteomyelitis. *Journal of Materials Chemistry B*, 1(26), 3304-3313.

Yang, C. C., Lin, C. C., & Yen, S. K. (2011). Electrochemical deposition of vancomycin/chitosan composite on Ti alloy. *Journal of The Electrochemical Society*, 158(12), E152-E158.

Yang, C. C., Lin, C. C., Liao, J. W., & Yen, S. K. (2013). Vancomycin–chitosan composite deposited on post porous hydroxyapatite coated Ti6Al4V implant for drug controlled release. *Materials Science and Engineering: C*, 33(4), 2203-2212.

Yang, J. H., J. H. Lee, H. J. Ryu, A. A. Elzatahry, Z. A. Alothman, and J. H. Choy (2016). Drug–clay Nanohybrids as Sustained Delivery Systems. *Applied Clay Science* 130, 20–32.

Yao, Q., Noeaid, P., Roether, J. A., Dong, Y., Zhang, Q., & Boccaccini, A. R. (2013). Bioglass®-based scaffolds incorporating polycaprolactone and chitosan coatings for controlled vancomycin delivery. *Ceramics International*, 39(7), 7517-7522.



Yao, Q., Nooeaid, P., Roether, J. A., Dong, Y., Zhang, Q., & Boccaccini, A. R. (2013). Bioglass®-based scaffolds incorporating polycaprolactone and chitosan coatings for controlled vancomycin delivery. *Ceramics International*, 39(7), 7517-7522.

Yuan, Q., J. Shah, S. Hein, and R. D.K. Misra (2010). Controlled and Extended Drug Release Behavior of Chitosan-Based Nanoparticle Carrier. *Acta Biomaterialia* 6(3), 1140–1148.

Zambaux, M. F., F. Bonneaux, R. Gref, E. Dellacherie, and C. Vigneron (1999). Preparation and Characterization of Protein C-Loaded PLA Nanoparticles. *Journal of Controlled Release* 60(2–3), 179–188.

Zhang, S., & Kawakami, K. (2010). One-step preparation of chitosan solid nanoparticles by electrospray deposition. *International journal of pharmaceutics*, 397(1), 211-217.

Zhang, Y., Xue, C., Xue, Y., Gao, R., & Zhang, X. (2005). Determination of the degree of deacetylation of chitin and chitosan by X-ray powder diffraction. *Carbohydrate research*, 340(11), 1914-1917.

Zhou, X., Weng, W., Chen, B., Feng, W., Wang, W., Nie, W., ... & He, C. (2018). Mesoporous silica nanoparticles/gelatin porous composite scaffolds with localized and sustained release of vancomycin for treatment of infected bone defects. *Journal of Materials Chemistry B*, 6(5), 740-752.

TÜBİTAK
PROJE ÖZET BİLGİ FORMU

Proje Yürütücüsü:	Prof. Dr. FUNDA TIHMINLIOĞLU
Proje No:	116M096
Proje Başlığı:	Kontrollü Antibiyotik Salımı Yapan Kitosan/Silika Bazlı Kompozit Doku İskelelerinin Geliştirilmesi Ve Sert Doku Mühendisliği İçin Kullanım Potansiyelinin Araştırılması
Proje Türü:	1001 - Araştırma
Proje Süresi:	24
Araştırmacılar:	
Danışmanlar:	BEKİR UĞUR ERGÜR, LEYLA DİDEM KOZACI
Projenin Yürütüldüğü Kuruluş ve Adresi:	İZMİR YÜKSEK TEKNOLOJİ ENS. MÜHENDİSLİK F. KİMYA MÜHENDİSLİĞİ B.
Projenin Başlangıç ve Bitiş Tarihleri:	01/04/2017 - 01/04/2019
Onaylanan Bütçe:	570300.0
Harcanan Bütçe:	408841.67

TÜBİTAK

Öz:	<p>Son yıllarda yas?lanan dünya nüfusu ve kazalara bag?lı kas-iskelet sistemi hastalık ve yaralanmalarında önemli derecede artış gözlenmektedir. Malzeme bilimindeki gelişmeler ile vücutta kemik doku ile uyumlu, polimerik yapıda sentetik greftlerin kullanımına ilgi artmıştır. Bu malzemeler, ikincil operasyonlara gerek kalmadan, immun reaksiyon geliştirmeyen canlı ve fonksiyonel yapay kemik dokusu geliştirilmesini, kemik onarımını gerektiren durumlarda, kemik iyileşmesini hızlandıracak ve desteklemek üzere kullanılmaktadır. Elde edilen biyomalzemenin mekanik gücünün hedef bölgeye uygun olması, kemik iyileşme sürecinde yapısal bütünlüğü koruması ve osteokondüktif özellikte olması gerekmektedir. Bu özelliklere sahip doku iskelelerinin eldesinde kullanılan biyobozunur ve biyouyumlu yapıda doğal ve sentetik polimerler arasında kitosan porozlu yapısı, jel oluşturma özellikleri, kimyasal modifikasyonlarının kolay olması, antibakteriyel özellikleri ve in vivo makromoleküllere yüksek affinite göstermesi nedeniyle özellikle dikkat çekmektedir. Son dönemde, kemik greftleri olarak birçok polimer mikro ve nanokompozit sistemler üzerine çalışılmaktadır. Silika nanopartiküller, yapıda modulus ve mukavemette önemli ölçüde iyileşme sağlamakta ve mineralizasyonu tetikleyerek kemik doku rejenerasyonunu desteklemektedir. Bu nedenle, proje kapsamında geliştirilecek biyomalzemedeki kemik oluşumunu indükleyebilecek, hibrid nanokafes yapısı ile fonksiyonel özellikler kazandırılacak polihedral oligomerik silseskioksan (POSS) nanosilika parçacıklar kullanılmıştır.</p> <p>Önerilen projede; POSS katkılı kitosan temelli kompozit doku iskelelerinin geliştirilmesi ve sert doku mühendisliğine yönelik olarak potansiyelinin araştırılması hedeflenmiştir. Projede geliştirilen kemik doku oluşumunu tetikleyen, gözenekli biyobozunur kompozit doku iskelesi; istenilen mekanik ve yapısal özellikleri sağlamanın yanısıra, hedef bölgede uzun dönemde antibiyotik salımı gerçekleştiren ve enfeksiyonu engelleyen özelliği ile fonksiyonel özellik kazandırılmış bir biyomalzemedir. Bu amaçla, kemik enfeksiyonlarında yaygın olarak ağız yolu ile kullanılan antibiyotiklerden olan gentamisin ve vankomisin seçilmiş ve mikrofluidizer yöntemi ile monodisperse yapıda antibiyotik yüklenmiş uniform kitosan nanokürelerin elde edilmesi, bu mikro/nanokürelerin kitosan/POSS kompozit doku iskelesine püskürtme yöntemi ile başarılı bir şekilde kaplanarak entegre edilmesi, nihai üründe ilaç salınımı ve in vitro hücre kültür çalışmaları projede gerçekleştirilmiştir. Nanoküre ve doku iskelesi üretiminde kullanılan kitosan/kil ve kitosan/POSS çözeltilerinin homojenizasyonu mikrofluidizer sistemi ile optimize edilmiş, elde edilen yapıların karakterizasyon çalışmaları sonucunda kil katkısının nanokürelerin stabilite ve in vitro salım profilini olumlu yönde etkilediği, POSS nanopartiküllerin de doku iskelesinin mekanik dayanım, şişme özellikleri ve biyomineralizasyon kapasitesini artırdığı görülmüştür. Nanoküre kaplı doku iskelelerinden uzun dönemde kontrollü antibiyotik salımı gerçekleştirilmiş; antimikrobiyal aktiviteleri ise disk difüzyon yöntemi ile belirlenmiştir. In vitro çalışmalarda antibiyotik yüklü nanoküre kaplı doku iskelelerinde istenen hücre tutunumu, proliferasyonu ve farklılaşması sağlanmıştır. Kemik-kıkırdak hücre farklılaşması spesifik markerlarla belirlenmiştir. Doku iskelelerinde kemik hücrelerinin üreme ve biyoaktivitesinde artış gözlenirken, kıkırdak hücrelerinde sınırlı büyüme ve metabolik aktivite gözlenmiştir. Bunun yanısıra, vankomisin salımı yapan doku iskelelerinde gentamisinli gruplara kıyasla, kemik hücrelerinin daha yüksek aktivite gösterdiği görülmüştür.</p>
Anahtar Kelimeler:	Doku mühendisliği, polimer, silika, kompozit, antibiyotik salımı, kemik rejenerasyonu, kıkırdak
Fikri Ürün Bildirim Formu Sunuldu Mu?:	Evet
Projeden Yapılan Yayınlar:	<p>1- Chitosan/montmorillonite composite nanospheres for sustained antibiotic delivery at post-implantation bone infection treatment (Makale - Diğer Hakemli Makale),</p> <p>2- Antibiotic Nanosphere Coated Bilayer Scaffolds For Bone Tissue Engineering Applications (Bildiri - Uluslararası Bildiri - Sözlü Sunum),</p> <p>3- Effect of Microfluidization technique on the characteristic of chitosan based nanocomposites for biomedical applications (Bildiri - Uluslararası Bildiri - Sözlü Sunum),</p>