

**TÜRKİYE CUMHURİYETİ
KIRIKKALE ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ**

**İLAÇ AKTİF MADDE YÜKLÜ HYALURONİK ASİT
NANOPARTİKÜLLERİN SENTEZİ VE EKLEM
DEJENERASYONLARINDA
KULLANIMININ DEĞERLENDİRİLMESİ**

Seval BİRDANE

**HİSTOLOJİ-EMBRİYOLOJİ
YÜKSEK LİSANS**

**DANIŞMAN
PROF. DR. SİYAMİ KARAHAHAN**

2017 – KIRIKKALE

**TÜRKİYE CUMHURİYETİ
KIRIKKALE ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ**

**İLAÇ AKTİF MADDE YÜKLÜ HYALURONİK ASİT
NANOPARTİKÜLLERİN SENTEZİ VE EKLEM
DEJENERASYONLARINDA
KULLANIMININ DEĞERLENDİRİLMESİ**

Seval BİRDANE

**HİSTOLOJİ-EMBRİYOLOJİ
YÜKSEK LİSANS**

**DANIŞMAN
PROF. DR. SİYAMİ KARAHAN**

**Bu tez projesi Kırıkkale Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Birimi
tarafından desteklenmiştir. Proje no: 2015/76**

2017 – KIRIKKALE

İÇİNDEKİLER

ÖNSÖZ	iv
SİMGELER VE KISALTMALAR.....	v
ŞEKİLLER.....	vi
ÇİZELGELER.....	vi
ÖZET.....	ix
SUMMARY	xi
1. GİRİŞ	1
1.1. Kıkırdak Doku.....	4
1.1.1. Ekstraselüler Matriks (ECM).....	4
1.1.1.1. Kollajenler.....	5
1.1.1.2. Şekilsiz Temel Madde.....	5
1.1.1.3. Kıkırdak Hücreleri	7
1.1.1.3.1. Kondrojenik Hücreler	7
1.1.1.3.2. Kondroblastlar.....	7
1.1.1.3.3. Kondrositler	8
1.2. Eklem Kıkırdağı.....	8
1.3. Kıkırdak Dokusu Çeşitleri	9
1.3.1. Hyalin Kıkırdak.....	10
1.3.1.1. Hyalin Kıkırdağın Histolojisi ve Büyümesi	12
1.3.1.2. Hyalin Kıkırdağın Otokrin Büyüme Faktörleri.....	13
1.3.2. Elastik Kıkırdak	15
1.3.3. Fibröz Kıkırdak	16
1.4. Kıkırdak Hasarı	16
1.5. Kıkırdak Hasarının Sınıflandırılması	17
1.5.1. Kısmi Kalınlıktaki Kıkırdak Hasarları	17
1.5.2. Tam Kalınlıktaki Kıkırdak Hasarları	18
1.6. Kıkırdak Dokusunda Karşılaşılan Rahatsızlıklar	18
1.7. Kıkırdak Doku Hasarı Onarımının Zorlukları ve Çözüm Yolları.....	19

1.7.1. Kıkırdak Hasarının Düzeltilmesine Yönelik Doku Mühendisliği Uygulamaları.....	19
1.7.2. Kıkırdak Doku Hasarı Onarımında Nanoteknolojik Yaklaşımlar.....	22
1.7.2.1. Nanopartiküller	23
1.7.3. İlaç Taşıyıcı Partiküler Sistemler	24
1.7.4. Hyaluronik Asit.....	25
1.7.5. Deksametazon	27
1.8. Çalışmanın Amacı.....	29
2. GEREÇ VE YÖNTEM.....	30
2.1. Kullanılan Cihazlar ve Kimyasallar	30
2.1.1. Cihazlar	30
2.1.2. Kimyasallar ve Malzemeler	30
2.2. Hyaluronik Asit Nanopartikül Hazırlanması	31
2.3. Hyaluronik Asit Nanopartiküllerin Karakterizasyonu	31
2.3.1 Morfolojik Özelliklerinin Belirlenmesi.....	31
2.3.2. Fizikokimyasal Özelliklerinin Belirlenmesi	32
2.3.2.1. Boyut ve Yük Analizi.....	32
2.4. Nanopartiküllere Etken Madde Yüklenmesi ve Salımı.....	33
2.4.1. İlaç Yükleme Çalışmaları.....	33
2.4.2. İlaç Salınım Çalışmaları	33
2.5. Hücre Kültürü Çalışmaları	34
2.5.1. Kondrosit İzolasyonu	34
2.5.1.1. Kollajenazsız Yöntem:	34
2.5.1.2. Kollajenazlı Yöntem	35
2.5.2. WST-1 Sitotoksitesite testi	35
2.5.3. Alamar Mavisi Testi.....	36
2.5.4. İkili boyama (doublestaining) ile apoptoz-nekrozun belirlenmesi.....	37
2.5.5. Genotoksitesite (mikronükleus) Testi	38
2.5.6. Dimetilmetilen Mavisi (DMMB) Analizi ile Glikozaminoglikan Miktarının Belirlenmesi	39
2.5.7. Gerçek Zamanlı Hücre Analiz Sistemi (RTCA Xcelligence) ile Hücre Proliferasyonunun Takibi.....	39

3. BULGULAR	41
3.1.Hyaluronik Asit ve Deksametazon Yüklü Nanopartiküller	41
3.1.1. Nanopartiküllerin Morfolojik Görüntüleri	41
3.1.2. Boyut Analizi	42
3.2. Nanopartiküllere Etken Madde Yüklenmesi ve Salımı.....	43
3.2.1. İlaç Yükleme Çalışmaları.....	43
3.2.1. İlaç Salınım Çalışmaları	44
3.3. Hücre ile Etkileşim Çalışmaları	45
3.3.1. Kondrosit Hücre Kültürü İzolasyonu	45
3.3.2. WST-1 SONUÇLARI	46
3.3.3. Alamar Mavisi Boyama Sonuçları	48
3.3.4. İkili Boyama Sonuçları	49
3.3.5. GAG Sonuçları.....	53
3.3.7. X-CELLigence Sonuçları.....	54
3.3.8. Genotoksisite (Mikronükleus Testi) Sonuçları	56
4. TARTIŞMA VE SONUÇ	58
KAYNAKLAR	62
ÖZ GEÇMİŞ	74

ÖNSÖZ

Bu tez çalışması boyunca akademik, kültürel ve insani olgunlaşmamda bana sağladıkları büyük katkılardan ötürü;

Prof. Dr. Siyami KARAHAN'a,
Prof. Dr. Mustafa TÜRK'e,
Prof. Dr. Hakan KOCAMIŞ'a,
Doç. Dr. Aytül KÜRÜM'e,
Prof. Dr. Nurettin ŞAHİNER'e
Rumeysa Akçapınar'a,
Sema TUNCER'e,
Murat PARLAK'a,
Gizem İMRAK'a
Özlem ÖZDEMİR'e,
Melis ÇOLAK'a,
Şükran AKDAĞ'a,
Yaşar ALUÇ'a
Dilara İÇKECAN'a,
Mustafa DOĞAN'a

Hayatımın her döneminde beni destekleyip özellikle de beni bu yaşa getiren, daima yanımda olan her şeyden çok sevdiğim en kıymetli varlıklarım Sarı Birdane, İsa Birdane, Semra Birdane ve Seda Birdane'ye

Sevgi, saygı ve tüm içtenliğim ile teşekkürlerimi sunarım.

Haziran, 2017

Seval BİRDANE

SİMGELER VE KISALTMALAR

WST-1	Suda Çözünebilir Tetrazolyum Tuzu
Ha	Hyaluronik Asit
Dex	Deksametazon
nm	Nanometre
RPMI-1640	Roswell Park Memorial Institute-1640
mL	Mililitre
mg	Miligram
RTCA	Gerçek Zamanlı Hücre Analizi
KCL	Potasyum Klorür
ELISA	Enzyme-Linked ImmunoSorbent Assay
RTCA	Gerçek Zamanlı Hücre Analiz Sistemi
PBS	Tuzlu Fosfat Tamponu
SEM	Scanning Electron Microscope
GAG	Glikozaminoglikan
DMMB	Dimetilmetilen Mavisi (Dimethylmethylen blue)

ŞEKİLLER

Şekil 1.1. Hyalin kıkırdağın kesit fotoğrafı, Masson Trikrom Boyama	10
Şekil 1.2. Büyüme faktörleri ve sitokinlerin kıkırdak doku üzerindeki düzenleyici etkisi.....	15
Şekil 1.3. Elastik kıkırdağın kesit fotoğrafı	16
Şekil 1.4. Kıkırdak dokusu mühendisliği.....	20
Şekil 1.5. Nanoküre ve nanokapsüllerin yapısı	23
Şekil 1.6. Hyaluronik asitin moleküler yapısı	25
Şekil 1.7. Deksametazonun moleküler yapısı	28
Şekil 2.1. Dinamik Işık Saçılımı mekanizmasının şematik gösterimi	32
Şekil 2.2. İlaç Yükleme Şeması	33
Şekil 3.1. Hyaluronik Asit Nanopartikül ve Deksametazon yüklü ilaçlı Formülsyonların SEM görüntüsü.....	41
Şekil 3.2. Hazırlanan hyaluronik asit nanopartiküllerin Zeta-Sizer'da hacimce boy dağılımı grafiği.....	42
Şekil 3.3. Hazırlanan hyaluronik asit +deksametazon yüklü ilaçlı nanopartiküllerin Zeta-Sizer'da hacimce boy dağılımı grafiği	43
Şekil 3.4. Deksametazona Ait Kalibrasyon Grafiği	44
Şekil 3.5. Hyaluronik asit nanopartiküllerden salınan ilaç miktarının zamanla değişimi	44
Şekil 3.6. Kıkırdak dokudan dökülen ilk kondrositlerin ışık mikroskobunda çekilmiş görüntüsü	45
Şekil 3.7. Primer hücre kültürü ile elde edilen kondrositlerin konfluent hale gelmiş ışık mikroskobunda çekilmiş görüntüsü.....	46
Şekil 3.8. Hyaluronik asit nanopartikül (HANP), Hyaluronik asit nanopartikül + Deksametazon (HANP+DEX) ilaç yüklü nanopartiküllerinin kondrositler üzerine sitotoksik etkileri	47
Şekil 3.9. Hyaluronik asit nanopartikül (HANP), Hyaluronik asit nanopartikül + Deksametazon (HANP+DEX) ilaç yüklü nanopartiküllerinin metabolik aktivite sonuçlarının konsantrasyonlara bağlı % canlılık oranı	49

Şekil 3.10. Hoechst 33342 floresan boya kullanılarak yapılan ikili boyamadan elde edilen apoptotik hücre fotoğrafları	51
Şekil 3.11. Hoechst 33342 floresan boya kullanılarak yapılan ikili boyamadan elde edilen nekrotik hücre fotoğrafları	52
Şekil 3.12. Kondroitin sülfat kullanılarak hazırlanan standartların absorban grafiği	53
Şekil 3.13. HANP –HANP+DEX - KONTROL Konsantrasyonlarının GAG miktarı	53
Şekil 3.14. Farklı konsantrasyonlarda Hyaluronik asit nanopartiküllerinin kıkırdak hücreleri üzerindeki proliferatif etkisi	54
Şekil 3.15. Farklı konsantrasyonlarda hyaluronik asit+deksametazon ilaç yüklü nanopartiküllerin kıkırdak hücreleri üzerine proliferatif etkisi	55
Şekil 3.16. Hyaluronik asit nanopartikül ve hyaluronik asit deksametazon ilaç yüklü nanopartiküllerin 1mg/mL konsantrasyonunun kıkırdak hücreleri üzerinde proliferatif etkisi	55
Şekil 3.17. 1mg/mL konsantrasyonda uygulanmış hyaluronik asit nanopartikülleri ve hyaluronik asit deksametazon nanopartiküllerinin genotoksisite fotoğrafları	57

ÇİZELGE

Çizelge 1.1. Hyaluronik asitin vücuttaki konsantrasyon miktarları.....	26
Çizelge 3.1. Hazırlanan Hyaluronik asit nanopartikül (HANP), Hyaluronik asit nanopartikül+Deksametazon (HANP+DEX) nanopartiküllerinin kondrositler üzerine sitotoksik etkileri	47
Çizelge3.2. Hyaluronik asit nanopartikül (HANP), Hyaluronik asit nanopartikül+Deksametazon (HANP+DEX) ilaç yüklü nanopartiküllerinin metabolik aktivite sonuçlarının konsantrasyonlara bağlı % canlılık oranı	48
Çizelge 3.3. Kondrositlere hyaluronik asit nanopartikül ve hyaluronik asit+ deksametazon yüklü ilaçlı nanopartikül uygulamalarının 24 saatlik etkileştirilmeleri sonucu elde edilen apoptotik indeks sonuçları.	50
Çizelge 3.4. Kondrositlere hyaluronik asit nanopartikül ve hyaluronik asit ve deksametazon yüklü ilaçlı nanopartikül uygulamalarının 24 saatlik etkileştirilmeleri sonucu elde edilen nekrotik indeks sonuçları.	50

ÖZET

İLAÇ AKTİF MADDE YÜKLÜ HYALURONİK ASİT NANOPARTİKÜLLERİN SENTEZİ VE EKLEM DEJENERASYONLARINDA KULLANIMININ DEĞERLENDİRİLMESİ

Seval BİRDANE

Yüksek Lisans Tezi, Sağlık Bilimleri Enstitüsü

Danışman: Prof. Dr. Siyami KARAHAN

Kıkırdak dokunun onarıma yeteneği vücutta bulunan diğer dokulara göre daha sınırlıdır. Kıkırdak doku kan damarlarından yoksun avasküler bir yapıya sahip olduğu için kıkırdak hücreleri düşük oksijen konsantrasyonlarında dahi metabolik aktivite göstermektedir. Son yıllarda kıkırdak doku mühendisliği ve nanoteknoloji alanında çalışmalar hız kazanmış nanoteknolojinin önemli çalışma alanlarından olan biyoyumlu nanopartiküllerden yararlanılarak kıkırdak doku tedavisinde ciddi çalışmalar yapılmıştır.

Bu tez çalışmasında; kondrosit hücrelerine bir kortikosteroid türevi olan deksametazon içeren hyaluronik asit nanopartikülleri yüklenerek salınımın, hücre canlılığının, sitotoksitesinin ve apoptoz-nekroz oranının belirlenmesi amaçlanmıştır.

İlk olarak hyaluronik asit nanopartikülleri sentezlenmiş daha sonra ise ilaç (deksametazon) yüklenmiş ve salınım çalışmaları gerçekleştirilmiştir. Deksametazon yüklenmiş ve yüklenmemiş hyaluronik asit nanopartikülleri farklı konsantrasyonlarda kondrosit hücrelerine uygulanarak hücrelerdeki etkisi incelenmiştir. Bu amaçla; ikili boyama yöntemi ile apoptoz/nekroz testi, genotoksitesite için mikronükleus testi, sitotoksitesite için WST-1 ve Alamar mavisi testi, GAG sentezi için DMMB analizi, proliferasyon için RTCA (Tam Zamanlı Hücre Analizi) testi yapılmıştır.

WST-1 sitotoksisite testinde hyaluronik asit nanopartiküllerinin kondrosit hücrelerine uygulaması ile canlılık oranları 1mg/mL derişiminde % 108,91 ve 0,0312mg/mL derişiminde % 126,88 bulunmuştur. Deksametazon yüklü hyaluronik asit nanopartiküllerinin uygulaması ile ise 1mg/mL derişiminde % 93,42 ve 0,0312mg/mL derişiminde % 134,53 bulunmuştur. Ayrıca sonuçlar Xcelligence hücre proliferasyon testi sonuçları ile uyumludur. Deksametazon yüklenmiş gerekse yüklenmemiş hyaluronik asit nanopartiküller GAG sentezinde kontrole göre önemli bir değişiklik göstermemektedir. Deksametazon yüklenmiş hyaluronik asit nanopartiküller İkili boyama testinde doz azaldıkça apoptotik ve nekrotik indeks azalmaktadır.

Sonuç olarak; elde edilen bulgular hyaluronik asit nanopartiküllerden kontrollü salınan deksametazon kondrositlere 0,5mg/mL ve daha düşük dozlarda olumsuz etki göstermemektedir. Bu nedenle dejeneratif eklem tedavilerinde antiinflamatuvar olarak kullanılan deksametazonun hyaluronik asit ile sinerjistik etki yapacağı düşünölmektedir. İlave *in vivo* çalışmalarla bu sav desteklenmektedir.

Anahtar Kelimeler: Hyaluronik Asit, Deksametazon, Kıkırdak, Kondrosit, Nanopartiköl.

ABSTRACT

SYNTHESIS OF ACTIVE DRUG LOADED HYALURONIC ACID NANOPARTICLES AND EVALUATION OF THEIR USE IN JOINT DEGENERATION

Seval BİRDANE

Master's Thesis, Institute of Health Science

Supervisor: Prof. Dr. Siyami KARAHAN

Cartilage has a limited capacity of repair compared to other tissues in the body. Because cartilage is avascular tissue, chondrocytes exert their metabolic activities in a low oxygenated environment. In recent years, studies in cartilage tissue engineering and nanotechnology have been gained speed. Serious approaches in cartilage tissue engineering have been conducted using biocompatible nanoparticles.

In this thesis, it was aimed to load dexamethasone, a corticosteroid derivative, on hyaluronic acid nanoparticles and to evaluate chondrocyte viability, cytotoxic and apoptotic-necrotic effects on chondrocytes upon release.

First, hyaluronic acid nanoparticles were synthesized and dexamethasone was loaded on hyaluronic acid nanoparticles. The rate of dexamethasone release was determined. Then, dexamethasone loaded hyaluronic acid nanoparticles at various concentrations were applied to chondrocytes and their effects were evaluated. For this purpose, the following tests were conducted: double staining method for apoptosis-necrosis, micronucleus test for genotoxicity, WST-1 and Alamar Blue tests for cytotoxicity, DMMB for GAG synthesis and Real time cell analysis for cell proliferation

Cytotoxicity tests indicated that cell viabilities following hyaluronic acid nanoparticle application were 108.91% and% 126.88% at doses of 1 mg/mL and 0.0312 mg/mL, respectively. Cell viabilities following application of dexamethasone

loaded hyaluronic acid nanoparticles were 93.42% and % 134.53% at doses of 1 mg/mL and 0.0312mg/mL, respectively. The results were compatible with Xcelligence cell proliferation test. Compared to control, neither dexamethasone loaded nor hyaluronic acid nanoparticles without dexamethasone did not change GAG synthesis. Apoptotic and necrotic index following application of dexamethasone loaded hyaluronic acid nanoparticles declined in a dose dependent manner.

As a result, dexamethasone released from hyaluronic acid nanoparticles did not exert a serious negative effect on chondrocytes at a concentration of 0.5mg/mL or below. Thus, it is thought that dexamethasone, which has been used as an anti-inflammatory agent in degenerative joint diseases, may exert a synergistic effect with hyaluronic acid. This notion should be supported by additional in vivo studies.

Keywords: Hyaluronic Acid, Dexamethasone, Cartilage, Chondrocyte, Nanoparticle.

1. GİRİŞ

Vücutta iyileşmesi en zor olan dokulardan biri kıkırdak dokusudur. Eklem kıkırdağının özellikleri, yapısı, travma ve hastalıkları ile ilgili ve sinoviyal eklemlerdeki kıkırdak hasarlarının tamir sorunu ile ilgili olarak ilk kez 1743 yılında William Hunter şu sözleri söylemiştir; 'Hipokrat zamanından günümüze kadar cerrahların bilgilerini alacak olursak, şu sonucu buluruz; ülsere olmuş bir kıkırdak, ileride mutlaka çok sorunlu bir hastalık oluşturacaktır, hasar gördüğü zaman hiçbir zaman iyileşemez'.

İlerleyen yıllarda eklem kıkırdağı kayıplarında yapılan deneysel çalışmalarda, kıkırdak dokusunun tam olarak iyileşmediği veya sınırlı onarım gerçekleşse bile oluşan yeni dokunun orijinal eklem kıkırdağı ile aynı özelliği taşımayan fibröz doku ile iyileştiği ve kemik dokusundan farklı olarak kıkırdak dokusunun kendi dokusunu avasküler yapısından dolayı oluşturamadığı gözlemlenmiştir. Bu nedenlerden dolayı kıkırdak dokunun büyümesi ve onarılması daha yavaş olmaktadır (Hunter 1995).

William Hunter'dan günümüze kadar geçen yaklaşık 274 yıl boyunca, eklem kıkırdak tedavisine yönelik çalışmalar tüm hızıyla devam etmektedir. Kıkırdak yaralanmalarında geleneksel tedavi yaklaşımları olarak bilinen; otolog kondrosit tranplantasyonu, doku greftleri, biyomalzemeler ve hasarlı alana destek sağlamak amacı ile çeşitli implantasyonların yerleştirilmesi günümüzde hala kullanılan yöntemler arasındadır. İmplant malzemesinden kaynaklanan sorunlar ve tedavi için kullanılacak yeteri kadar hücrelerin temin edilememesi gibi durumlar kıkırdak doku tedavisinde birçok soruna sebep olmakta ve hastalığın tedavisi için yeterli olamayıp yeni teknolojilere ihtiyacı dahada arttırmaktadır. Bu gibi sorunların yaşanmaması için günümüzde araştırmacılar doku mühendisliği uygulamalarını çalışmaktadırlar.

Doku mühendisliğinin tarihsel gelişimine modern anlamda bakılacak olursa, Lexer "doku mühendisliği" kavramını ilk ortaya koyan bilim insanı olup 20. yüzyılın başlarında taze kadavradan aldığı allogreftleri eklem kıkırdağı için yeniden kullanmıştır (Lexer 1908). Doku mühendisliği çalışmaları ilk yıllarda kemik,

kıkırdak veya başka dokuların yapay malzemelerle onarılması üzerine olup başarısızlıkla sonuçlanmış ancak ilerleyen yıllarda malzeme teknolojisindeki gelişmeler ile birlikte tıpta yeni metal veya metal olmayan seramik ve polimer gibi sentetik malzemelerin geliştirilmiş olması ile doku mühendisliği uygulamalarına hız verilmektedir

Kıkırdak doku yaralanmalarında; nanotıp ve nanoteknoloji uygulamalarının kullanımı giderek artmakta olup, geleneksel tedavi yöntemlerinin yerine kullanılmaya başlanmıştır. Kullanılan malzemelerin moleküler düzeyde boyutlarının ayarlanabiliyor olması yanı sıra, atom düzeyinde incelenebilmeleri sayesinde yeni malzemeler üretilebilir hale gelmiştir. Hidrofobik veya hidrofilik özelliği, malzeme boyutlarında ayarlama yapılabilir olması, biyolojik etkileşim ve benzeri “Yüzey Özellikleri” tamamen nanometre boyutlarındaki en yüzeysel katmanların kimyasal özellikleri ve morfolojisine göre olmaktadır. Nanopartiküller boyutları 10-1000 nm arasında değişen katı partikül ya da dispersiyon partikül olarak tanımlanmaktadır. Biyoaktif ajanlar (ilaç, biyosinyal molekül vb.) nanopartikül matrise bağlanabilir, en kapsüle edilebilir ya da gömülebilirler (Soppimath ve ark 2001).

Bu özellikler göz önüne alındığında nanopartiküllerin, biyolojik sıvılarda çok daha yüksek stabiliteye sahip olmaları, boyut özellikleri açısından etken maddeyi yükleme kapasitelerinin yüksek olması, etken maddenin intraselüler dağılımını arttırmaları (Kreuter 2001), polimerik yapıya sahip olmaları nedeni ile nanopartiküllerin etkin maddenin hedeflen dokuya ulaştırılması ve salınımının kontrollü yapılmasını temin etmeleri (Garcia ve ark. 2005, Tuncer 2014). Aynı zamanda dokuya ulaştırılan etkin maddenin istenilen bölgede salınımına imkan sağlayıp etkin maddenin sistemik toksisitesini azaltmasını sağlamaları nanoteknolojinin en önemli avantajları arasında yer almaktadır (Rao and Geckeler 2011).

Hyaluronik asit (HA); sahip olduğu fizikokimyasal ve biyolojik özellikler nedeni ile tek başına veya diğer doğal polimerlerle birlikte doku mühendisliği çalışmalarında sıklıkla kullanılmaktadır. Hyaluronik asit, yumuşak bağ dokusunun

ekstrasellüler matriksinde ve insanda sinoviyal sıvılarda bol miktarda bulunan, doğrusal tek zincirli glikozaminoglikan polimeridir. Hyaluronik asitin lenfositlerin migrasyonu, proliferasyonu ve kemotaksisini azaltması, granülositlerin fagositozu ve makrofaj motilitesi üzerine inhibe edici etkiye sahip olması gibi özellikleri vardır (Bora ve ark. 1987). Aynı zamanda enflamasyonun biyolojik maddeleriyle olan spesifik etkileşimleri nedeniyle enflamatuvar aktivasyonda da inhibe edici olarak görev yapmaktadır (Longaker ve ark. 1989).

Kullanılan bir diğer ajan ise kortikosteroid türevi olan deksametazondur. Deksametazon; kıkırdak doku üzerinde güçlendirici etkisinin yanında kondrosit hücre farklılaşması, *in vitro* proteoglikan sentezi (Stöve ve ark. 2002) ve kıkırdak hasarlarında glikozaminoglikan kaybını azaltıcı etkilere sahiptir (Lu ve ark. 2011). Deksametazon kondrojenik hücelere farklılaşmasını sağlamak ve proteoglikanları sentezlemek için progenitör hücre sayısını arttırmaktadır. Kortizon'a göre daha kuvvetli olan Dekametazon, steroid hormonların glikokortikoid sınıfının sentetik bir üyesi olup immünosüpresan ve anti-enflamatuvar etkiye sahip bir ilaçtır (Şimşek 2001, Sahoo ve ark. 2013). Deksametazon, güçlü bir glukokortikoid (kortizondan yaklaşık 30 kat daha güçlüdür) olup, enflamatuvar sitokinlerin (IL-1 β , IL-6, IL-10, IL-1RA, TNF- α ve benzeri gibi) ekspresyonunu azaltmada çok etkilidir.

Bu tezde hyaluronik asit ve deksametazon kombine edilerek kullanılmıştır. Deksametazonun hyaluronik asitten kontrollü olarak salınımı ve kontrollü salınım amacı ile hyaluronik asit nanopartiküllerin üretilip deksametazon salınımının gerçekleştirilmesinin, dejeneratif eklem hastalıklarında olumlu etki oluşturacağı düşünülmektedir.

1.1. Kıkırdak Doku

Kıkırdak doku; vücutta destekleyici fonksiyon yapmak üzere özelleşmiş destek bağdoku yapısındadır ve kemik doku ile yakın ilişkidir. Kıkırdak doku genelde 1-6 mm genişliğinde olup eklem kapsülünü kaplar. Yumuşak dokulara destek olmak, yük taşımak, temas yüzeyi sağlamak ile görevlidir. Makroskopik olarak açık mavi renkte iken ilerleyen yaşla birlikte daha soluk ve mat renge dönüşür (Şimşek 2001,Doral ve ark. 2007).

Kıkırdak; fetal iskeletin büyük kısmını oluşturmak, uzun kemiklerin gelişmesi ve büyümesi için bir kalıp gibi görev yapmak ve endokondral kemikleşmede rol oynamak gibi önemli görevlere sahiptir. Fötal hayatın erken dönemlerinde iskeletin geçici olarak hemen hemen tamamını oluştururken, çok hızlı büyüme özelliğinin olması ve belirgin bir sertliğinin bulunması nedeni ile fetal iskeletin gelişmesi için de uygun bir yapıya sahiptir. İlerleyen dönemlerde memelilerin yetişkin bireyler olması ile birlikte kemiklerin eklem yüzeylerinde, kulak kepçesinin bazı kısımlarında ve tek iskeletsel destek olarak solunum yollarında görülmeye devam etmektedir (Pietrogrande ve ark.1991). Kıkırdak doku sert ancak esnek bir yapıya sahiptir. Bütün bağ dokuları gibi kıkırdak dokuda; temel madde, hücre ve lifler olmak üzere üç bileşenden oluşur. Kıkırdakta bulunan temel madde; büyük oranda glikoproteinler ve proteoglikanlar (kondroitin sülfat)'tan oluşur.

1.1.1. Ekstraselüler Matriks (ECM)

Kıkırdak dokusunun matriksi diğer bağ dokusu çeşitlerinde olduğu gibi fibrillerden ve şekilsiz temel maddeden oluşmaktadır [4]. Kollajenler eklem kıkırdağı yaş ağırlığının %20-40'ını (%95'i Tip 2 kollajen) glikoproteinler %15-20'sini, proteoglikanlar ise kuru ağırlığının % 25-35'ini (temel olarak agrekan) oluşturmaktadır (Birinci ve ark. 2008, Miller ve ark. 2012). Kollajen olmayan proteinler ve proteoglikanların bazıları kollajenin oluşturduğu yapıya bağlanır ve su

bu yapıyı doldurur. Kollajen olmayan proteinlerin bazıları yapının organizasyonuna yardım eder ve matriks makro molekülleri ağ yapıyı sabitler (Birinci ve ark. 2008).

1.1.1.1. Kollajenler

Eklem kıkırdağı Tip II, VI, IX, X ve XI kollajenlerini içermektedir. Tip II, IX ve Tip X kollajenler farklı konsantrasyonlarda hücre dışı ağın üç boyutlu ağısı yapısını meydana getirmekte ve aynı zamanda eklem kıkırdağına gerilme ve esneklik özelliği katmaktadırlar (Bora 1987, Browne ve Branch 2000, Miller ve ark. 2012). Tip II kollajen, kıkırdak dokuda esneklik ve tensil gücünü sağlarken kollajenin yaklaşık % 90-95'ini oluşturmaktadır. Tip II kollajen matriksin karakteristik bileşenidir. Ağın şekillenmesine ve stabilizasyonunun sağlanmasına Tip XI kollajeni katkıda bulunmakta iken, Tip IV kollajeni ise kondrositlerin matrikse tutunmasını sağlamaktadır. Tip VI kollajen, kondrositleri çevreleyen matrisin bir parçasını oluşturur ve kondrositlerin matriks makromoleküler çerçevesine yapışmasına yardımcı olur (Buckwalter ve Mankin 1997). Tip X kollajen ise sadece kalsifiye kıkırdak bölgesinin yakınında bulunur ve mineralizasyona katkıda bulunur.

1.1.1.1.1. Şekilsiz Temel Madde

Glikozaminoglikanlar (GAG); şekilsiz temel maddenin ana bileşenidir. Bulunduğu yere ve yaşa göre GAG miktarı değişiklik göstermektedir. Hyaluronik asit, kondroitin sülfat, keratan sülfat ve dermatan sülfat en yaygın glikozaminoglikan çeşitleridir. Kıkırdak matriksi kondroitin sülfat içerdiğinden dokunun mekanik zorlanmalara karşı koymasına olanak sağlamaktadır (Legnani ve ark. 2010). Keratan sülfatın kıkırdak dokuda miktarı yaşa bağlı olarak değişirken, hyaluronik asit kıkırdakta çok az bulunmaktadır.

Glikozaminoglikanlar proteoglikanları oluşturmak için ana proteine bağlanmış komplekslerdir. Kollajen liflerin arasında bulunan proteoglikanlar, karmaşık yapılı

makromoleküllerdir. Hyaluronik asit monoflamana taşıyıcı proteinle bağlanan, çekirdek protein ve bu çekirdek proteine bağlanan keratin ve kondroitin sülfat gibi glikozaminoglikanlardan oluşmaktadır (Legnani ve ark. 2010).

Proteoglikanlar, kıkırdağın sertliğini sağlar ve aynı zamanda kıkırdaktaki sıvı akışına karşı direnç gösterirler. Bu nedenle hidrolik permeabilite (kıkırdak esnekliği), dokunun su ve proteoglikan içeriklerine bağlı olarak değişiklik göstermektedir. Proteoglikanlar hücreler tarafından salgılanır ve agregan denilen büyük kümeler oluşturma yeteneğindedirler. Agregan molekülleri ekstraselüler matriksin proteoglikan kütesinin % 90'nını oluşturmaktadır. Hyaluronik asit ile birlikte agreganlar küçük non-kollajen proteinlere bağlanarak proteoglikan kümelerini oluşturmaktadırlar. Agregan moleküllerinin yapısı sayesinde proteoglikanlar matriks içerisinde tutunabilmekte ve böylelikle dokunun deformasyonu sırasında yer değiştirmelerini önlemeye yardımcıdır. Ayrıca kollajen çatı ile proteoglikanlar arasındaki bağlantıyı da stabilize etmektedirler (Buckwalter 1983, Buckwalter ve Mankin 1997, Buckwalter ve Mankin 1998, Emre ve ark. 2012).

Eklemler kıkırdağında çok çeşitli miktarda kollajen olmayan protein ve glikoproteinler bulunmaktadır. Bunlar monosakkarit ve oligosakkaritlerin bulunduğu proteinlerden oluşur ve agregan oluşturmaz proteoglikanları içermektedirler. Yapısal ve düzenleyici proteinlerdir aynı zamanda kondrosit ve matriks etkileşimlerini sağlamaktadır. Kıkırdak yenilenmelerinin klinikteki tespitinde işaretleyici görevi üstlenmektedirler (Arıkanoglu 2013).

1.1.1.2. Kıkırdak Hücreleri

Kıkırdak dokuda 3 tip hücre bulunmaktadır; kondrojenik hücreler, kondroblastlar, kondrositler.

1.1.1.2.1. Kondrojenik Hücreler

Dar, iğ şekilli olup mezenşimal hücrelerden köken almaktadır. Elektron mikroskopik incelemelerde, az gelişmiş Golgi aygıtı, az sayıda mitokondri ve granüllü endoplazmik retikulum (GER) ile bol serbest ribozom içerirler. Protein sentezi için gerekli organellere sahip bazofilik hücrelerdir. Bu hücreler hem kondroblast hem de osteoprojenitör hücrelere farklılaşabilmektedirler (Kılıçoğlu 2002).

1.1.1.2.2. Kondroblastlar

Perikondriumdaki kondrojenik hücrelerden ve kondrifikasyon merkezindeki mezenşimal hücrelerden köken alabilirler. Kondroblastlar, elipsoid veya yassı şekilli olup protein sentezi için gerekli organellere sahip hücrelerdir. Bu nedenle bazofilik olarak boyanmaktadırlar. Lipid ve glikojen yönünden zengindirler. İyi gelişmiş granüler endoplazmik retikulum ve Golgi, bol mitokondri ve çok sayıda salgı vezikülleri içerirler. Kendi ürettikleri matriks ile çevrili halde olup, mitoz bölünme ile çoğalmaktadırlar. Aktiviteleri azaldıktan sonra genç veya olgun kondrosit adını almaktadırlar (Gartner ve Hiatt 2006, Kierszenbaum ve Tres 2015). Kondroblastlar yoğun protein sentezi gerçekleştiren hücrelerdir ve buyüzden bol miktarda salgı vezikülleri içermektedirler.

1.1.1.3.3. Kondrositler

Kıkırdak dokusunun yapısal hücreleri olan kondrositler bir matriksle çevrili lakün içine yerleşik bulunmaktadır. Endokondral kemikleşmede önemli bir rol oynadıkları düşünülmektedir (Hunziker 1994). Belirgin bir sitoplazmaya sahip, asidofil boyanan kondrositler koyu renkli büyük çekirdek ve belirgin çekirdeksiğe sahiptirler. Açık renkli sitoplazmaya sahip genç kondrositlerde, gelişmiş granüler endoplazmik retikulum ve Golgi kompleksine sahip çok sayıda mitokondriyon ve glikojen gözlenirken, daha yaşlı olanları azalmış organel içerir ve bol miktarda serbest ribozoma sahiptirler (Gartner ve Hiatt 2006, Montaseri ve ark. 2011).

1.2. Eklem Kıkırdağı

Eklem kıkırdağı histolojik olarak matriksteki morfolojik değişikliklere ve kıkırdak hücrelerinin matriksteki dağılımına bağlı olarak 4 tabakadan oluşur. Bunlar yüzeysel tabaka, geçiş tabakası, derin tabaka ve kalsifiye kıkırdak tabakadır.

Yüzeysel Tabaka: Eklem kıkırdak kalınlığının %10–20'sini oluşturur (Flik ve ark. 2007). Kıkırdağın yüzeyinde bulunan en ince tabakasıdır. İnce kollajen lifleri içerir. Kollajen fibrilleri yüzeye yakın yerleşmiştir, derin tabakalara göre gerilim ve tensil güç daha fazladır. Proteoglikan içeriği en az, su, fibronektin ve proteoglikan agreganları içeriği en fazla olan kıkırdak tabakasıdır (Buckwalter ve Mankin 1998, Flik ve ark. 2007).

Tanjansiyel (geçiş) Tabaka: Eklem kıkırdak kalınlığının %40–60'ını oluşturmaktadır (Flik ve ark. 2007). Yüzeysel bölge ile derin bölge arasında geçiş bölgesi olan bu tabakada hücreler dağınık ve yuvarlak yerleşmişlerdir. Kondrositler daha büyük ve yüzeysel tabakaya göre biraz daha yuvarlak görünümündedirler (Flik ve ark. 2007, Standring 2015). Bu tabakada kondrositler tek başlarına bulunabilecekleri gibi lakün içerisinde izogen hücre gruplar halindedeki bulunabilirler (Standring 2015).

Radial (derin) Tabaka: Bu tabaka eklem kıkırdak kalınlığının yaklaşık %30'unu oluşturur. Proteoglikan içeriği diğer tabakalara göre en yüksek, su içeriği en düşük olan kıkırdak tabakasıdır. Hücreler küresel, düzensiz ve kolonlar halinde eklem yüzeyine dik olarak dizilmektedirler (Flik ve ark. 2007).

Kalsifiye Kartilaj Tabaka: Endokondral kemikleşme sonucu oluşan subkondral kemiğin hemen üzerinde bulunan bu tabaka, kalsifiye olmamış diğer kartilaj bölgeleri ve subkondral kemik arasında mekanik tampon görevi yapmaktadır.

Yüzeyden derinlere doğru ilerledikçe; kondrosit yoğunluğu ve su oranı azalırken, kollajen liflerinin kalınlığı ve hacmi artmaktadır. En yüzeysel tabakada lifler yüzeye paralel halde yerleşirken, derin tabakalarda ise yüzey bölgeye dik dizilim göstermektedir (Doral ve ark. 2007).

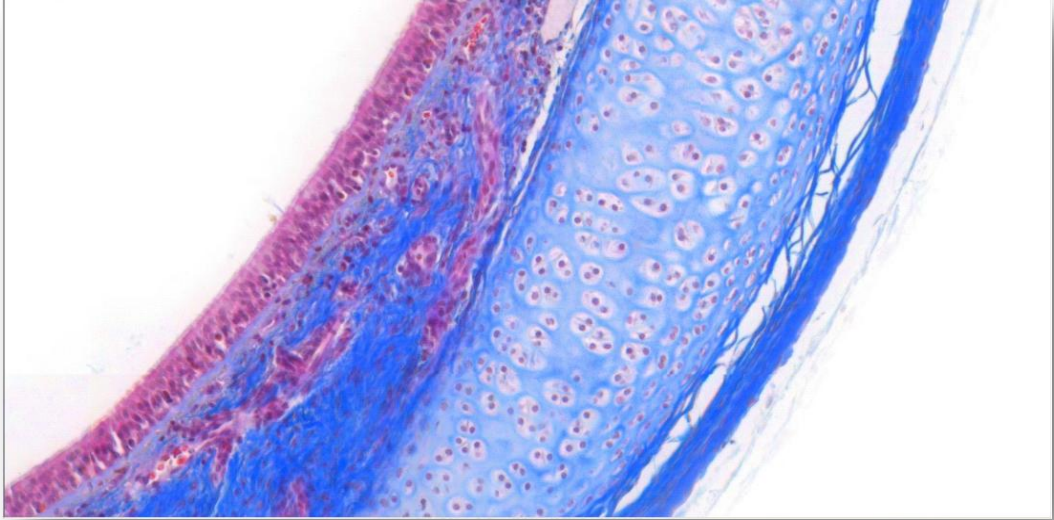
Kıkırdak dokunun matriksinde bulunan elastik ve kollajen lifler kıkırdağın esneklik ve gerilme kuvvetini arttırmakta, kıkırdak dokusunun vücudun farklı bölgelerinde bulunan mekanik ihtiyaçlara uyumunu sağlamakta ve eklem yüzeylerinde darbe emiciliği ve kayganlığını sağlayarak kemik hareketlerini kolaylaştırmaktadır.

1.3. Kıkırdak Dokusu Çeşitleri

Elastik liflerin doku içerisinde cinsi, fazlalığı veya azlığı ile temel maddenin kimyasal özelliği kıkırdak dokunun sınıflandırılmasında önemli etkidir. Genel olarak 3 tip kıkırdak görülür (Bingöl ve ark. 2011). Bunlar; hyalin kıkırdak, elastik kıkırdak, fibröz kıkırdak.

1.3.1. Hyalin Kıkırdak

Hyalin kıkırdak; vücutta bulunan kıkırdak çeşitlerinden en yaygın olanıdır ve ismini Yunanca cam anlamına gelen ‘‘hyalos’’ kelimesinden almaktadır. Taze iken, hyalin kıkırdak şeffaf, mavimsi-beyaz yığınlar halindedir (Freemont ve Hoyland 2006). Matriksi; homojen ve amorf bir yapıya sahip olan hyalin kıkırdak sert ve basınca karşı dayanıklı bir yapı göstermektedir (Yamaguchi ve ark. 1990). Hyalin kıkırdak matriks yapısı; proteoglikan, tip II kollajen, ekstraselüler sıvı ve glikoprotein içermektedir. Kıkırdağın kuru ağırlığının % 40’ı kollajenden oluşmakta ve kollajen fibrilleri perikondriumdan doku içine yayılı halde olup ışık mikroskopu ile seçilememektedir. Yenilenmesi ve onarılması sınırlı olan hyalin kıkırdak sinoviyal eklemlere kayganlık kazandırarak sürtünme yüzeyini azaltmakta ve kemiğe uygulanan kuvvet ve basıncın dağılmasını sağlamaktadır. Eklemlerde (kemiklerin eklem yüzeylerinde), kaburga uçlarında, burun, larinks, bronş ve trakede bulunur. Köpek balıklarının iskeletleri, tüm yaşamları boyunca hyalin kıkırdak yapısında kalmaktadır (Han 2009, Bingöl ve ark. 2011, Ataman 2014).



Şekil 1. 1. Hyalin kıkırdağın kesit fotoğrafı, Masson Trikrom Boyama.

Kıkırdak dokusu kan damarlarından yoksun bir yapıya sahiptir, sinir hücreleri ile kan ve lenf kapillerlerini içermemektedir (O'Driscoll ve ark. 1997). Perikondrium adı verilen bir membran ile çevrilidir. Vasküler bir tabaka olan perikondrium avasküler kıkırdağın beslenmesini sağlamaktadır. Kıkırdak hücrelerinin beslenmesi perikondriumda bulunan kan damarlarının taşıdığı besinler ile gerçekleşmektedir. Perikondrium fibröz (dış) ve hücreli (iç) katman olmak üzere 2 kısımdan oluşur. Dış katman; kıkırdağın beslenmesinde sorumlu ve damarlanma açısından zengin bir yapıya sahiptir. Tip I kollajen lifler, fibroblastlar ve kan damarları içerir ve yara kenarlarını onarır. İç katman ise; kondrojenik hücreler içerir ve bu hücreler kondroblastlara dönüşmektedirler. İç katman kıkırdak dokunun yenilenmesinde rol almaktadır. Genç kıkırdakta perikondriumun büyük bir kısmını hücreli bölüm oluşturur. Kıkırdağın üst yüzeyinde farklılaşan kondroblastik hücreler kıkırdağa yeni kondrositlerin eklenmesini sağlar (Bingöl ve ark. 2011). Perikondriumun rejenerasyon kapasitesi küçük kıkırdak defektlerini (milimetrik) kendi başına onarıırken, büyük kıkırdak defektlerinin onarımında yetersizdir. (Ulutaş ve ark. 2005, Sari ve ark. 2006).

Kıkırdağın perikondriuma sahip olmadığı alanlarda (kemiğin eklem yüzeyi) kıkırdak hücreleri eklem yüzeyini yıkayan sinoviyal sıvıdan difüzyonla gerçekleşmektedir (Kendall 1947, O'Driscoll ve ark. 1997, Demir 2013). Yeni kıkırdak üretimi aktif olarak olmadığı veya büyümenin çok yavaş olduğu kıkırdakta bu tabakalanmalar belirgin değildir.

Proteoglikanların hücre etrafında konsantrasyonları genellikle daha fazladır. Kıkırdak hücrelerini çevreleyen şekilsiz temel maddeye **territoryal matriks** denir. Bu bölgede yoğun olarak kondroitin sülfattan zengin proteoglikanlar, mavi renkli görünür ve az miktarda tip II kollajen fibriller içerir. **İnterterritoryal matriks**; hücreler arası alanlardır ve territoryal matriksden farklı olarak bu bölgede daha fazla tip II kollajen, daha az proteoglikan bulundurur. Şekilsiz temel maddenin kırılma indeksinin ve Tip II kollajenin kromofobik özelliğinin benzer olmasından dolayı bu bölge territoryal matriksten daha açık bazofilik olarak boyanır. Bu boyanma farkları,

bölgelerdeki kollajen ve proteoglikan miktarındaki farklılıklarından ileri gelmektedir (Bingöl ve ark. 2011).

1.3.1.1. Hyalin Kıkırdağın Histolojisi ve Büyümesi

Gelişen embriyoda kıkırdak, mezoderm tabakasından köken alır. Kıkırdak oluşumunun başladığı bölgede hücre uzantılarına sahip mezenşimal hücre yoğunlaşması olur ve bu mezenşimal hücreler uzantılarını kaybederek yuvarlaklaşır ve yoğun hücre kümeleri oluştururlar. Kıkırdak oluşumunun başladığı bu bölgeye **kondrojenik merkez** adı verilir. Bu bölgedeki mezenşimal hücrelerden farklılaşan ilk kıkırdak hücrelerine **kondroblast** adı verilir (Akay 2006, Bingöl, Deprem ve ark. 2011).

Kondroblast hücreleri gelişip farklılaşır ve matriksi sentezler. Hücreler arası matriks veya ara madde arttıkça her biri kendi salgı ürünleri ile sarılı lakün adı verilen boşluklardan birbirinden uzaklaşmaya başlarlar. Daha sonra olgun kondrositleri oluştururlar ve kondrositler matriks materyalinin devamlılığını sağlarlar (Akay 2006, Bingöl ve ark. 2011). Kıkırdakta sürekli büyüme iki farklı şekilde gerçekleşmektedir.

Apozisyonel Büyüme: Perikondriumdaki hücrelerin farklılaşması ile kıkırdak yüzeyden eklentilerle büyümüş olur. Yeni hücrelerin daha önce var olan kıkırdak üzerine eklenmesiyle oluşan bu tip büyümeye dıştan büyüme adı verilir (Bingöl ve ark. 2011).

İnterstisyel Büyüme: Bölünme yeteneğini devam ettiren kondrositler, lakün içinde 2-4 veya daha fazla hücre grubu oluştururlar. İzogen grup olarak tanımlanan bu gruplar bir tek ana hücrenin 1-2 veya daha fazla bölünmesi ile oluşmuştur. İzogen gruplar matriks ürettikçe lakünler de birbirlerinden uzaklaşır, kıkırdak içerden büyümeye başlar. Bu büyüme içsel (interstisyel) tipte büyümedir (Streeter 1949). Eklem kıkırdağında, perikondrium bulunmadığı için dıştan büyüme ile hücre ilave edilememektedir. Eklem yüzeyindeki zamanla deforme olan matriks ve hücreler,

kıkırdağın iç kısımlarından ilave edilmektedir. Vücudun diğer bölgelerinde bulunan kıkırdak dokularında ise, zamanla matriksi sert bir yapı alır ve interstisyel büyüme azalır. Kıkırdak dokuda sadece apozisyonel büyüme bir bant halinde gözlenmektedir. Dıştan büyümede, perikondriumda bulunan kondroblast hücreleri çoğalarak dış yüzeylerini bir matriks ile sardıktan sonra, kondrosit hücre haline dönüşerek mevcut kıkırdağa eklenmektedirler (Emin 2003). İçten büyüme sadece hyalin kıkırdağın oluşumu sırasında, perikondriumu olmayan eklem kıkırdağı ve epifizyal plaklarda (kemik boyuna büyümesi), uzun kemiklerin endokondral kemikleşmesi ve uzunlamasına büyümesi için ve kıkırdağın doku kümesinin genişlemesinde önemli rol oynamaktadır. Bunlar dışındaki vücut bölgelerinde büyüme çoğunlukla apozisyondur, kontrollü bir süreç olup kıkırdağın yaşamı boyunca devam eder (Carneiro ve Long 1986, Kılıçoğlu 2002). Kıkırdak büyümesini aynı zamanda hormonlarda etkilemektedir. Bunlardan; tiroksin, testosteron gibi bazı hormonlar büyümeyi arttırırken estradiol, cortisone ve hydrocortisone ile büyüme inhibe edilir (GARTNER ve HIATT 2006)

1.3.1.2. Hyalin Kıkırdağın Otokrin Büyüme Faktörleri

Dokulara özgü, polipeptid yapılı proteinler olarak adlandırılan büyüme faktörleri, hücrelerin büyümelerini ve farklılaşmalarını çeşitli yollarla etkilemektedir. Büyüme faktörleri *in vivo* ve *in vitro* da doku gelişimi ve rejenerasyonunu uyaran, hücre farklılaşması ve protein sentezinde rol alan hedef hücrelerin yüzeylerindeki reseptörlere bağlanarak etki eden biyoaktif moleküllerdir (Nielsen ve ark. 1994, Lee 2000, Anusaksathien ve Giannobile 2002).

Kemik morfojenik faktörü (BMP), fibroblast büyüme faktörü (FGF), platelet kökenli büyüme faktörü (PDGF), dönüştürücü büyüme faktörü-beta (TGF- β), insülin benzeri büyüme faktörü (IGF), makrofaj kaynaklı büyüme faktörü, epidermal büyüme faktörü (EGF), trombosit kaynaklı büyüme faktörü gibi sinyal molekülleri içerir (Kingsley 1994, Nielsen ve ark. 1994, Ganam ve ark. 1996).

TGF- β ; TGF- β ailesi, gelişimi çok yönlü kontrol etmektedir. Kollajen, fibronektin ve proteoglikan oluşumunu artırır, bağ dokusunda hasara yol açan proteolitik enzimleri inhibe ederler. Hücre çoğalması, büyümesi ve farklılaşmasını sağlarlar. Doku onarımı, hücre dışı matriks üretimi, anjiyogenez, immün düzenleme, apoptosis gibi hücre sel süreçlerde görev almaktadırlar.

TGF- β ailesi mezenkimal kök hücrelerin kondrojenik ve osteojenik farklılaşmasını yönlendirir, osteoblastların sayısı ve aktivitesini artırarak intramembranöz kemikleşmeyi arttırmaktadırlar (Cassiede ve ark. 1996, Pagnotto ve ark. 2007).

BMP; Bmp'ler osteojenik aktivitesi olan proteinlerdir. BMP-2,3 ve 4 eklem kıkırdığında proteoglikan sentezini uyarırken BMP-1 kıkırdak ağında kollajenler üzerinde proteolitik etki gösterir (Rosier ve O'Keefe 1998). Kıkırdak ve kemik hücrelerine farklılaşabilen mezenşimal kök hücrelerin, ektopik kemik uyarımını arttırdığı bilinmektedir (Haleem ve Chu 2010).

FGF; 22 üyeden oluşmaktadır. Fibroblast ve kıkırdak için mitojeniktir. Kondrojenik farklılaşmayı ve hücre çoğalmasını FGF-2 uyarmaktadır (Cuevas, Burgos et al. 1988). Kırık iyileşmesinde etkinlik gösterir ve kıkırdak oluşumu aşamasında kallusu genişletir. FGF' lerin eklem içine verilmesi kıkırdak defektlerine mezenşimal kök hücrelerin göçünü ve kıkırdak onarımını uyarılmasını sağlar (Rosier ve O'Keefe 1998).

PDGF; Platetlerin α -salgı granüllerinden salgılanır. Mezenkimal kök hücre farklılaşması ve hücre dışı matriks üretimi için anahtar bir up-regülatördür (Haleem ve Chu 2010).

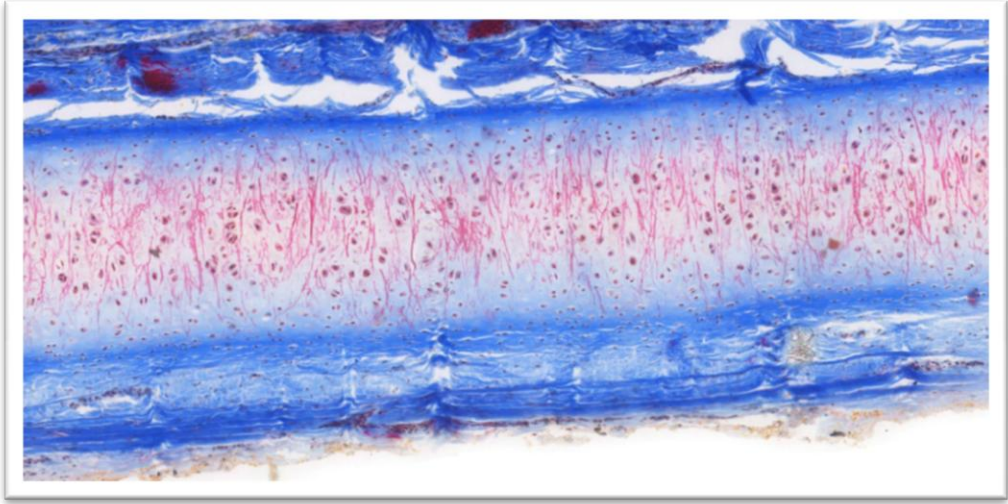
IGF; Büyüme hormonuna cevap olarak salınan insülin benzeri büyüme faktörünün, kortikal kemik oluşumunu ve kemik matriksi sentezini tetiklemektedir. Kallus oluşumuna katkıda bulunan insülin büyüme faktörünün, osteoblast ve kıkırdak hücreleri ile birlikte matriks sentezini arttırdığını Trippel yaptığı çalışmada göstermiştir (Trippel 1998).

Büyüme faktörü/sitokin	Etkisi
TGF- β 1, IGF-1, PDGF	Progenitör hücrelerin kondrojenik farklılaşması
TGF- β 1, IGF-1, FGF, EGF	Kondrosit proliferasyonu
TGF- β 1, BMP-2, 4, 6, 7, IGF-1	Matris sentezi
TGF- β 1, IGF-1, IL-4, 6	Matris metalloproteinaz (MMP) inhibisyonu
TGF- β 1, FGF	İnflamatuar hücrelerin hareketi
TGF- β 1, BMP-2, FGF, PDGF, VEGF	Osifikasyon (kemikleşme)
FGF, PDGF, IL-1 β , 17, 18, TNF- α	MMP aktivasyonu
BMP-2, FGF, PDGF, EGF, IL-1 β , 18, TNF- α	Matris degradasyonu

Şekil 1. 2. Büyüme faktörleri ve sitokinlerin kıkırdak doku üzerindeki düzenleyici etkisi (Holland ve Mikos 2003).

1.3.2. Elastik Kıkırdak

Elastik kıkırdak sarı renkte olup hyalin kıkırdakla benzer yapıdadır fakat matriks ve perikondriumu elastik lif içermektedir. Vücutta epiglottis, östaki borusu, dış kulak yolu ve dış kulak gibi esneklik gerektiren bölgelerde bulunur. Esnek ve bükülebilir yapıda olan bu kıkırdağın matriksinde tip II kollajen lifler ve bu liflerin arasında dallanan elastik lifler bulunur. Bu elastik fibrillerden dolayı hyalin kıkırdaktan daha esnek yapıdadır. Elastik kıkırdağın matriksi yaşlanmayla kalsifiye olan hyalin kıkırdaktan farklı olarak kalsifiye olmaz (Bora ve ark.2000, Balta 2013, Özkan 2015).



Şekil 1. 3. Elastik kıkırdağın kesit fotoğrafı.

1.3.3. Fibröz Kıkırdak

Fibröz kıkırdak vücutta en az rastlanan kıkırdak çeşididir. Matriksi Tip I kollajen lifleri içerir, dermatan sülfat ve kondroidin sülfatça zengindir. Vücudun ağırlık taşıyan ve zorlanmalara maruz kaldığı bölgelerinde yoğun bir ağ şeklinde örülmüş halde bulunur. İntervertebral diskte, bazı artiküler disklerde, pubisde ve tendonların kemik uçlarında bulunur. Geçiş formu olarak adlandırılan fibröz kıkırdak'ta bulunan kondrositler genellikle fibroblastlardan köken alırlar (Balta 2013, Liu ve ark. 2013).

1.4. Kıkırdak Hasarı

Kıkırdak dokusunun avasküler yapısı, rejenerasyon kapasitesinin sınırlı olması ve indiferansiyel hücre yetersizliği sebebiyle, kıkırdak hasarlarının kendiliğinden iyileşmesi zordur. Oluşan hasarlar patolojinin süresine bağlı olarak düzelebilir ya da geri dönülmez bir noktaya gelebilir (Jurvelin ve ark.1989). Eklem kıkırdağının yapısı ve fonksiyonu, değişik derecelerdeki travmatik lezyonlarla, osteokondral defektlerle, dizilim bozuklukları, menisküs hasarları, metabolik, genetik, vasküler ve mekanik nedenlerle bozulabilir (Ulrich-Vinther ve ark. 2003). Travmatik yaralanmaları eklem

kıkırdağını yıkıma uğratan en önemli faktördür. Travmanın şiddeti ve derinliğine göre kıkırdağın bu travmalara olan yanıtı değişmektedir (Alford ve Cole 2005).

Travmanın şiddeti düşük olduğunda dışarıdan herhangi bir değişiklik oluşturmadan matriks ve hücreleri yıkıma uğratarak dejenerasyona doğru bir süreç başlatabilir. Böyle yüzeysel bir travmada; iyileşme kapasiteleri düşük olan kıkırdağın iyileşmesi dahada sınırlanır, kondrositler yaralanabilir, kollajen dizilimi bozulur ve matriksin su içeriği artarken proteoglikan içeriği azalır (Alford ve Cole 2005).

İlk yaralanmanın yol açtığı doku hasarı orta düzeyde olsa bile, kondrositlerin salgıladığı yıkıcı enzimler ve sitokinler, matriksteki yıkımın devamına yol açabilmektedir (Ulrich-Vinther, Maloney et al. 2003). Yıkım sürdükçe, oluşan vertikal yarık ve fissürler derinleşir ve doku düzensiz ve fibrile bir görünüm alır. Yüzeysel yaralanmada, kanama ve enflamatuvar bir yanıt oluşmaması, fibrin pıhtı gelişmemesi ve indiferansiye hücrelerin travma alanına göç etmemesi bu yaralanmaların iyileşme potansiyelinin olmamasını açıklar (Mankin ve ark.2000).

1.5. Kıkırdak Hasarının Sınıflandırılması

Kıkırdak doku hasarları; kısmi kalınlıkta kıkırdak hasarı ve tam kalınlıkta kıkırdak hasarı olmak üzere iki sınıfa ayrılmaktadır.

1.5.1. Kısmi Kalınlıktaki Kıkırdak Hasarları

Kısmi kalınlıktaki kıkırdak yaralanmalarında oluşan onarım dokusu, hyalin benzeri bir yapı içermesine rağmen önemli oranda fibröz doku da içerir. Kısmi kalınlıkta kıkırdak hasarında subkondral kemik, hasar ve kemik iliği hücreleri arasında bariyer görevi görür bu yüzden rejenerasyon sürecinde etkili olan kondrojenik hücreler ve mediatörler yaralanma bölgesine ulaşamaz ve böylece onarım dokusu, çevre sağlam kıkırdak doku ile bağlantı gösteremez. Bu nedenle dokunun normal yapısı ve

mekanik özellikleri kazanılamaz (Ulrich-Vinther ve ark. 2003, Beris ve ark. 2005, Kim ve ark. 2011).

1.5.2. Tam Kalınlıktaki Kıkırdak Hasarları

Tam kat kırıklarda ve yaralanmalarda bölgenin subkondral kemikle direk temasa geçmesi sayesinde kanlanması ve kan ile birlikte mezenşimal hücrelerin ve rejenerasyon sürecine katkıda bulunan sitokinler, mediatörler travma bölgesine gelir ve fibrin pıhtı oluşmaya başlar. Daha sonra subkondral kemikte inflamasyon başlar ve granülasyon dokusu oluşur. Bu rejenerasyon süreci defektli alanı dolduran fibröz kıkırdak içerikli yeni kıkırdak dokusu oluşumu ile sonlanır. Subkondral kemik yüksek oranda osteoblastik ve osteoklastik aktivitesi ile kıkırdak iyileşmesinin remodelizasyon fazında da etkili olur. Kondrositlerin fibroblastlara metaplazisi ve kıkırdağa özgü proteinlerin üretimi yaralanmadan yaklaşık iki hafta sonra başlar (Buckwalter ve Manki 1997). Bölgeye göç eden mezenkimal kök hücreler iki hafta içerisinde, kondrosit hücre şeklini alarak proteoglikan ve tip II kollajen içeren matriksi oluşturmaya başlarlar. Dokuda kıkırdak benzeri hücre ile birlikte, proteoglikan tip II kollajen ve az miktar da tip I kollajen altı-sekiz hafta sonunda matrikste bulunmaktadır. Subkondral defekt alanı esas olarak kemik, fibröz doku ve hyalin kıkırdak içeren bir doku ile onarılması ise altı ay sonunda gerçekleşmektedir (Mankin ve ark. 2000).

1.6. Kıkırdak Dokusunda Karşılaşılan Rahatsızlıklar

Eklem iltihabı (artrit), kalıtsal anormallikler, eklem yıpranması, travma, eklem yaşlanması (artroz), hücre dışı matriksin mineralizasyonu, kireçlenme (kalsifikasyon), kemikleşme (ossifikasyon), iyi ve kötü huylu tümörler, lifsel bozulma, kıkırdak dokusunda karşılaşılabilecek belli başlı rahatsızlıklar arasında yer almaktadır. Ayrıca çeşitli yaralanmalar ve kazalar özellikle eklem kıkırdağında ve kıkırdak dokusunda büyük hasarlara yol açmaktadır (Angel, Razzano et al. 2003).

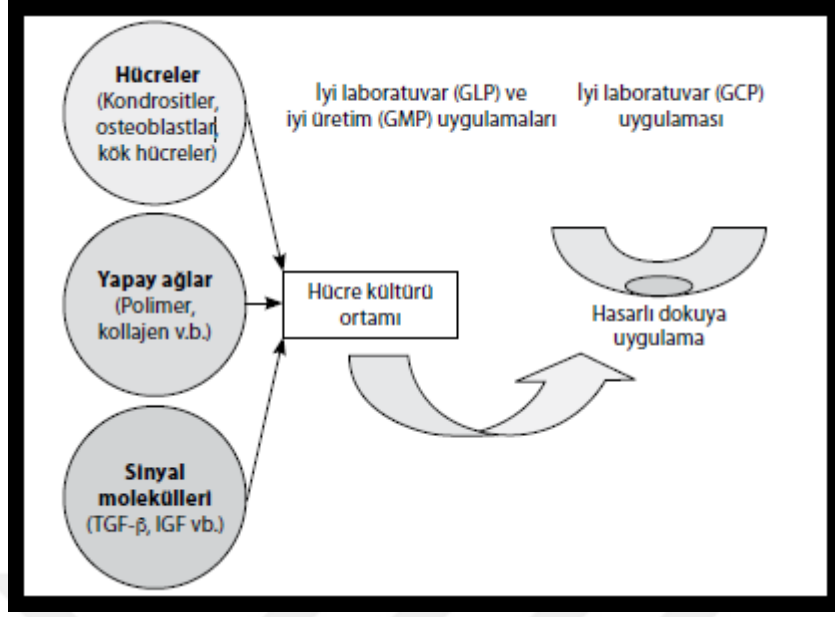
1.7. Kıkırdak Doku Hasarı Onarımının Zorlukları ve Çözüm Yolları

İnsan vücudunda kıkırdak hücreleri çok az miktarda bulunmaktadır ve bu durum kıkırdak iyileşmelerinin en büyük sorunları arasındadır. Kollajenaz tarafından hücre matrisine zarar vererek parçalanmaları gerektiğinden izole edilebilmeleri oldukça zordur ve bu durumlar kıkırdak doku hasarı onarımında karşımıza bir engel olarak çıkmaktadır (Huckle ve ark. 2003, Asawa ve ark. 2008). Kıkırdak dokuda iki-boyutlu olarak kültür işlemi yürütüldüğünde hücrelerin geriye doğru farklılaşarak (dediferansiye) morfolojik özelliklerini kaybettiği gerçeği diğer cesaret kırıcı yönüdür (Furukawa ve ark. 2003).

Avasküler yapıya sahip olan kıkırdak dokusu kan, lenf kapillerleri ve sinir hücrelerini içermemektedir. Beslenmesi; eklem kavitelerinin sinoviyal sıvısından difüzyonla ve komşu bağ dokusundaki (perikondrium) kapillerlerden gerçekleşmektedir. Bütün kan damarından yoksun dokularda olduğu gibi, kıkırdak hücreleri de düşük metabolik aktivite göstermekte ve düşük oksijen konsantrasyonların da solunum yapmak zorunda kalmaktadırlar. Bu nedenlerden ötürü kıkırdak dokusunun rejenerasyon ve tamir mekanizması çok düşüktür (Wakitani ve ark. 1998).

1.7.1. Kıkırdak Hasarının Düzeltilmesine Yönelik Doku Mühendisliği Uygulamaları

Büyüme faktörleri, canlı hücreler ve biyolojik aracı moleküllerin sentetik veya biyolojik matrisler içinde birlikte bulunduğu yapıların, hastalara nakledilmesi ile hastalık ya da travma sonucu kaybedilen veya hasar görmüş dokuları yeniden oluşturabilmek doku mühendisliğinin hedefleri arasındadır (Lynch ve ark. 1999).



Şekil 1. 4. Kıkırdak dokusu mühendisliği (Korkusuz ve ark.2010).

Doku mühendisliğinde; sadece travma sonucu kaybedilen dokulara ait alanın tamiri değil, rejenerasyon mekanizmalarını anlayarak yeni dokunun elde edilebilmesi hedeflenmektedir (Heng ve ark. 2004, Salgado ve ark. 2004). Son dönemlerde kıkırdak doku rejenerasyonu için kullanılmak üzere kondrositlerin ya da kemik iliğinden izole edilen mezenkimal kök hücrelerin kullanıldığı çalışmalar söz konusudur. Bu hücreler günümüzde kıkırdağın kendisinden primer hücre kültürü ile elde edilebileceği gibi yağ doku, kas doku, kemik iliği, periost dokularından erişkin kök hücre şeklinde elde edilip çeşitli yöntemlerle büyüme faktörleri ile kıkırdak dokuya dönüştürülebilmekte ve onarım amaçlı kullanılabilir (Cristino ve ark. 2008).

Kıkırdak doku mühendisliğinde *in vitro* deneylerde kullanılacak hücrelerin eldesinin kolay olması, kültürde kolay çoğalabilmesi ve etkinliğinin korunması, oluşturulması istenen dokuya benzer özelliklere sahip olması gerekmektedir (Salgado ve ark. 2004). Hücreler üçe ayrılır. Bunlar; otolog: hastanın kendi dokularından elde edilen, allojenik: başka bir insandan elde edilen ve ksenojenik: başka bir canlı türünden elde edilen. Kullanılan hücrelerin etkinliğinin korunması ve uygulama sırasında immun yanıt gelişme riski veya immünsüpresif tedavi gerektirmemesi gibi

avantajlara sahip olduğundan otolog hücrelerin kullanımı daha uygundur (Ikada 2006).

Brittberg ve arkadaşları tarafından ilk kez 1994 yılında otolog kondrosit transplantasyonu (ACI) yöntemi tanımlamıştır. Bu yöntemde amaç hastanın kendisinden alınan kıkırdak hücrelerinin *in vitro* çoğaltılarak hasar gören bölgeye geri uygulanmasıdır. Otolog kondrosit transplantasyonu diz eklemindeki kıkırdak doku hasarlarının onarılması için klinikte uygulanan doku mühendisliği yaklaşımlarından biridir. Hastalık veya travma sonucu oluşan hasarlı bölge kıkırdak dokudan alınır ve daha sonra kemik zarından alınan parça hasarlı alanı kaplayacak biçimde şekil verilir ve oluşan hasarlı bölgenin üzerine yapıştırılır. Hastadan alınan ve *in vitro* kültür ortamında çoğaltılmış olan sağlıklı hücreler hasarlı bölgenin üzerine ekilir ve bu yöntem birinci nesil ACI olarak adlandırılır. İkinci nesil ACI’de birinci nesil ACI den farklı olarak kemik zarı yerine çift tabakalı kollajen zarlar kullanılır. Otolog kondrosit (kıkırdak hücresi) transplantasyonu üçüncü nesil ACI’de ise; hasarlı bölgeye üç boyutlu doku iskelesi yerleştirilmektedir (Shin ve ark. 2003). Kıkırdak doku tamirindeki amaç, hasarlı bölgenin kıkırdak ile doldurulmasından çok çevre kıkırdağın çeşitli nedenlerle bozulmasını engelleyebilecek bir tamir dokusu geliştirmektir. Hasarlı bölgenin ACI yöntemi ile tedavisinden sonra komşu kıkırdak dokusunun biyomekanik ve biyokimyasal yapısının düzeldiği yapılan deneysel çalışmalarla gösterilmiştir (Strauss ve ark. 2005).

Doku mühendisliği ile oluşturulan dokuların vücutta bulunan diğer dokular gibi fiziksel ve biyolojik uyarılara ve değişimlere karşı cevap vererek uyum göstermesi, canlı hücre içermeyen biyomateryal uygulamalarına kıyasla önemli üstünlüğü olarak kabul edilmektedir. Doku mühendisliğinde kıkırdak doku tedavisinin başarılı olmasının nedenleri arasında kıkırdak dokusunun avasküler yapısı, sadece kondrosit ve ekstraselüler matriks elemanlarından oluşması gösterilmektedir. Kıkırdak hücreleri besin ihtiyaçlarını hücreler arası sıvıdan difüzyonla karşılamaktadır. Bu durumda doku mühendisliğinde henüz aşılamamış bir sorun olan doku içinde yeni kan damarları oluşturmak kıkırdak dokusu çalışmalarında söz konusu olmamaktadır (Ataman 2014).

Doku mühendisliği çalışmalarında, ekstraselüler matriksin (ESM) yapısı doku yenilenmesinde çok önemli bir role sahiptir ve bu yapısı taklit edilmektedir (Place ve ark. 2009, Silva ve ark. 2010). Ekstraselüler matriksin hücelere destek sağlamak, hücre migrasyonunu düzenlemek aynı zamanda hücrelerin devam ettirilebilmesi için sinyal oluşturmak gibi birçok görevi vardır. Ekstraselüler matriks nanoboyut yapıda olup içeriği proteinler ve polisakkaritlerden oluşmaktadır (Chen ve ark. 2010). Nanoboyut yapıdaki materyallerin kullanımı ile ekstraselüler matrikse benzer bir yapı elde edilmesi mümkün olmakta aynı zamanda nanoboyuttaki sistemlerin pürüzlülüğü ve yüzey alanının artması ile istenen amaca uygun fizikokimyasal (optik, elektriksel, mekaniksel) özellikler sağlanabilmektedir (Engel ve ark. 2008).

1.7.2. Kıkırdak Doku Hasarı Onarımında Nanoteknolojik Yaklaşımlar

'Nano' kelime olarak, bir fiziksel büyüklüğün bir milyarda biri anlamına gelir. 1 nanometre içine, yan yana ancak 2-3 atomun dizilebildiği düşünülürse, yaklaşık 100-1000 atom bir araya gelerek nano ölçeklerde bir nesneyi oluşturduğu söylenebilir (Tuncer 2014). Günümüzde teknik bir ölçü birimi olarak kullanılmakta olan nanometre, 10^{-9} metre veya metrenin bir milyarda biri olarak hesaplanmaktadır. İnsan saçının bir telinin çapı yaklaşık 10^4 nanometre ve hücre içerisinde kimyasal tepkimeyi sağlayan proteinler, moleküller yaklaşık 1-25 nm boyutlarındadır (Özkan 2015).

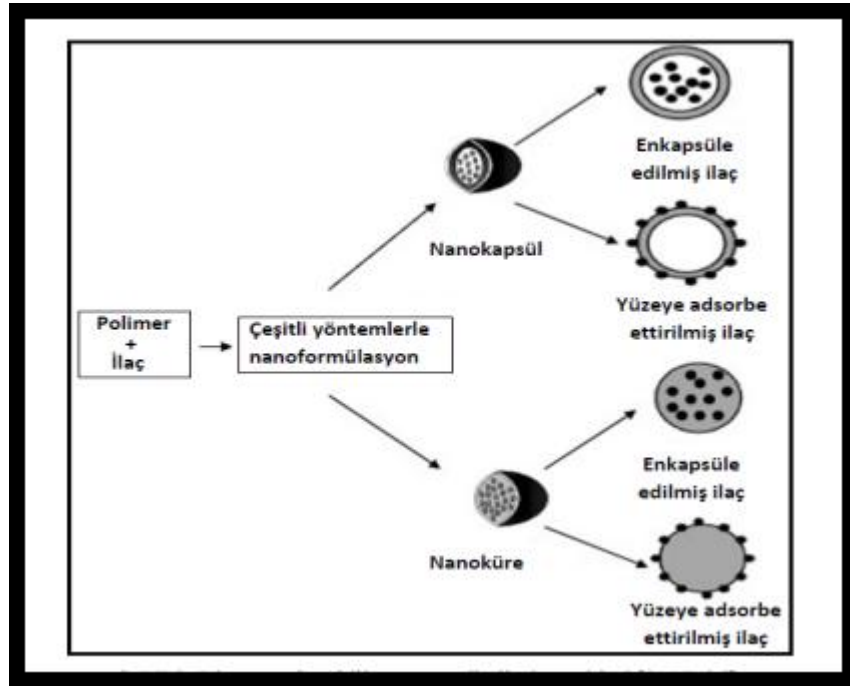
Son yıllarda nano boyutlu malzemeler üzerine gerçekleştirilen çalışmalar büyük bir gelişme göstermektedir. Nanomateryallerin yüksek yüzey-hacim oranı ile ilişkili özellikleri sebebiyle günümüzde çok önemli bir yere sahiptir. İlaç sanayi, katalizörler, optik materyaller, sensörler, enerji depolama-transmisyonu gibi pek çok alanda uygulamaları mevcuttur (Haverkamp ve Marshall 2009).

Nano kristaller, nano partiküller, nanotüpler, nano teller, nano çubuklar veya nano ince filmler nanoboyutlu malzeme olarak tanımlanmaktadır (Switzer 1997, Li ve ark. 2005).

1.7.2.1. Nanopartiküller

Tozlar olarak tanımlan nanopartiküller; boyutları 100 nm ve altında olup, nanoboyut yapısındaki malzemelerin ve dolayısıyla nanoteknolojinin temelini oluştururlar (Miller ve ark. 2004, Rao ve ark. 2006). Bu nanopartiküller; sertlik, uzun sürelilik, olağanüstü hafiflik, dayanıklılık, ve yüksek kimyasal aktivite gibi özelliklerinden dolayı günümüzde önemli bir yere sahiptir. Elektronik yapısının boyut bağımlılığı, boyut etkileri, atomlarının benzersiz karakterleri, yüzey ve yüksek yüzey/hacim oranına sahip nanopartikül özelliklerinin günümüzde araştırmacıları nanoteknolojiye çekme nedenleri arasında gösterilmektedir (Liveri 2006).

Nanopartikül büyüklükleri 1-100 nm arasında değişen hapsedilmiş, çözülmüş veya hapsedilen etkin maddeyi kontrollü olarak açığa çıkaran sentetik veya doğal polimerlerle hazırlanan partiküler sistemlere nanopatikül adı verilir. Hazırlanma metoduna göre nanoküre ve nanokapsül olmak üzere ikiye ayrılır. **Nanoküreler**, etkin maddenin polimerik matriks yapı içinde çözüldüğü, disperse olduğu ya da kısmen adsorbe edildiği sistemler iken **nanokapsüller** etkin maddenin polimerik bir membran tarafından çevrelenmiş sulu veya yağlı bir çekirdek içinde bulunduğu veziküler sistemlerdir ve rezervuar sistem olarak da tanımlanmaktadır (Şengel-Türk ve ark. 2007).



Şekil 1. 5. Nanoküre ve nanokapsüllerin yapısı (Şengel-Türk ve ark. 2007).

Nano boyut yapısına sahip nanopartiküller; özelliklerinden dolayı mikropartiküler sistemlere göre hücre içine daha fazla alınmaktadırlar. Desai ve arkadaşları yaptıkları bir çalışmada 100 nm boyutundaki nanopartiküllerin Caco-2 hücrelerinden; 1 µm boyutundaki mikropartiküllere oranla iki buçuk kat daha fazla, 10 µm boyutundaki mikropartiküllere oranla ise altı kat daha fazla hücre içerisine alındığını göstermişlerdir (Desai ve ark. 1997).

Biyobozunur nanopartiküllerin biyoaktif ajan taşıyıcı sistemlerde sık kullanılmasının nedenleri arasında; yüksek biyoyararlanım, iyi enkapsülasyon, kontrollü salım ve düşük toksisite özelliklerine sahip olmalarıdır. Nanopartiküllerin biyoaktif ajan taşıyıcı sistemlerde kullanılmasının avantajları olarak; hidrofobik biyoajanların biyoyaralanımını ve sudaki çözünürlüğünü arttırması, yüzey karakteristiğinin ve partikül boyutunun kolaylıkla ayarlanabilir olması, hücrelerle etkileşimlerinin sağlanması, taşınım boyunca ajanın salımının devam ettirilebilir ve kontrol edilebilir olması, kontrollü salım ve partikül bozunma karakteristiğinin matriks malzemesinin seçimi ile kolaylıkla ayarlanabilir olması gösterilmektedir (Mohanraj ve Chen 2006).

1.7.3. İlaç Taşıyıcı Partiküler Sistemler

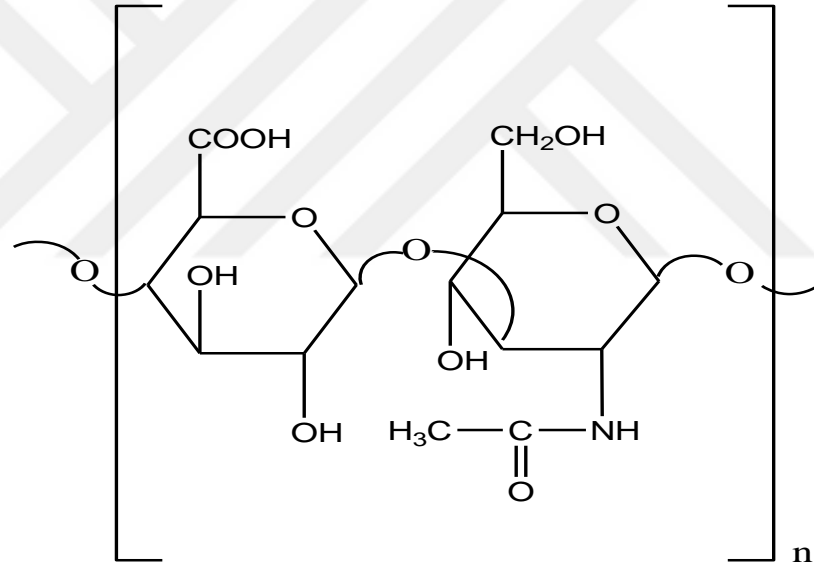
Araştırmacılar son zamanlarda çalışmalarını, modern terapötik sistemler olarak adlandırılan mikrokapsül, mikroküre, nanopartikül gibi ilaç taşıyıcı partiküler sistemler üzerinde yoğunlaştırmaktadırlar. Nanoteknoloji çalışmaları fizik, kimya, elektronik, tıp ve eczacılık alanında birçok uygulamanın gelişmesine yardımcı olmaktadır. Ayrıca çözümü mümkün olmayan konulara yeni çözümler üretilmesine sebep olmuştur. Tıp ve eczacılık alanında nanoteknoloji uygulamalarının çoğunlukla tercih edildiği konulardan biri nanoteknoloji bazlı ilaç taşıma sistemlerinin geliştirilmesidir (Sahoo ve ark. 2008).

Bu ilaç taşıyıcı partiküler sistemlerle oluşturulması hedeflenen, istenilen etkiyi düşük dozda sağlayabilmek, etken maddeyi kontrollü bir şekilde salarak terapötik konsantrasyonu uzun süre korumak, aynı zamanda etken maddenin yan etkilerinin

azaltılması ve salınımın istenildiği gibi kontrol edilebilmesidir (Kaş 2002, Mozafari ve Mortazavi 2005).

1.7.4. Hyaluronik Asit

1934 yılında Karl MEYER ve John PALMER tarafından ilk olarak inek gözünün vitröz kısmından (camsı sıvı) izole edilen hiyalüronik asit (hiyaluronat ya da hiyaluronan); üronik asit içermesi ve izole edildiği yerin vitröz doku olmasından dolayı bu adı almıştır (Meyer ve Palmer 1934). 12500 disakkarid ünitesinin kombinasyonu, yaklaşık 5.000.000 molekül ağırlıklı hyaluronan molekülünün ortalama molekül ağırlığı 10^7 daltondur (Balazs ve Denlinger 1993).



Şekil 1. 6. Hyaluronik asitin moleküler yapısı.

Hyaluronik asit temel olarak ekstraselüler matriksde bulunur, hücre içinde de varlığına rastlanmıştır. Deri, vitröz sıvı, kıkırdak ve göbek kordonu (alt deri), deri altı dokuları, dermal tabakalarının interselüler matriksinde ve kıkırdak gibi gelişen özelleşmiş dokularda, gözde ve dişte konsantrasyonları yüksektir. Ancak en yüksek konsantrasyon 0,5-4 mg/mL aralığında diartrodial eklem sinoviyal sıvısında bulunmaktadır (Weiss ve Band 1999).

Çizelge 1. 1. Hyaluronik asitin vücuttaki konsantrasyon miktarları (Kogan ve ark. 2007).

Ha'nın vücutta bulunduğu yerler	HA konsantrasyonları µg/ml
Eklem sinovial sıvısı	1400-3600
Horoz ibiği	7500
İnsan göbek kordonu	4100
Sığır burun kıkırdağı	1200
İnsan göz camısı cisim	140-360

Hyaluronik asit yara iyileşmesi, doku viskozitesi, şok absorpsiyonu, doku ozmozunu ve boşluk doldurma gibi çeşitli fonksiyonlar üzerinde etkilidir. Hücreleri bir arada tutmak, oksijen ve diğer besleyici maddelerin geçişine izin vermek gibi görevlere sahiptir. Hücre göçüne ve çoğalmasına katkıda bulunur. Kıkırdak ve tendon dokusunda bulunur bu yapıların esnek ve dayanıklı olmasına olanak sağlar. Eklem boşluklarını doldurarak kayganlık sağlar. Ses tellerine bazı viskoelastik özellikler sağlaması nedeniyle hyaluronik asit ses üretimi için de oldukça önemlidir (Brown ve Jones 2005). Eklem kıkırdaklarını ve yumuşak dokuları bir lubrikan gibi görev yaparak korumaktadır. Ovum, etrafı spermelere karşı seçici bir bariyer gibi görev yapan HA tabakasıyla çevrilidir (Watterson ve Esdaile 2000). Hyaluronik asit (HA), ECM'de var olan protein bazlı doğal bir polimerdir. Biyouyumluluğu ve biyobozunurluğundan dolayı biyomedikal uygulamalarda yaygın şekilde kullanılmaktadır (Watterson ve Esdaile 2000).

1.7.5. Deksametazon

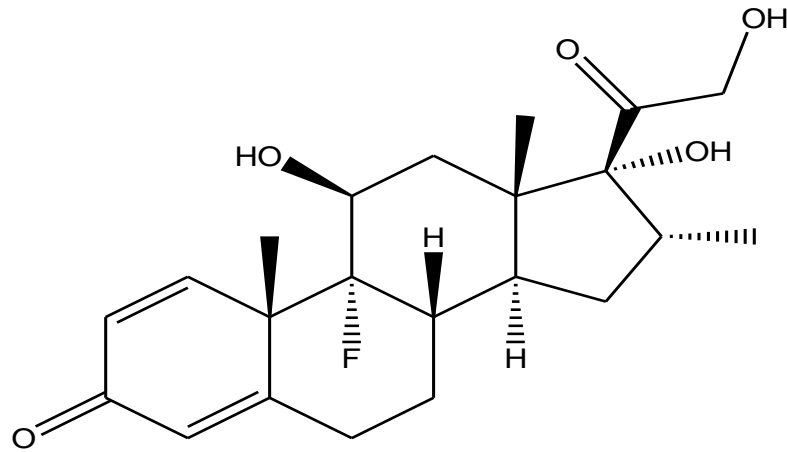
Deksametazon bir kortikosteroid türevidir. Kortikosteroidler antialerjik, immünsüpresif ve antienflamatuvar etkileri sebebiyle çok sık kullanılan, adrenal korteksten (ACTH) salgılanan, steroid yapılı hormonlar ve sentezi ile elde edilen yapılardır (Samancı ve Balcı 2001). Adrenokortikotropik hormon (ACTH) kortikosteroidlerin salınımını düzenlemektedir (Stanbury and Graham 1998). Bu tür steroidler; strese bağlı enflamasyon ve enfeksiyonları bastırmada enerji kaynağının kontrolünde çeşitli astım, alerji ve artiritis hastalıklarının tedavisinde başarılı olmaktadır (Stanbury ve Graham 1998).

Uzun süren tedavilerde; farklı inflamatuvar durumlarının belirtilerini sık sık kontrol etmek gereklidir. Makrofaj ve fibroblastların diferansiyasyonu ve proliferasyonu glukokortikoidler tarafından inhibe edilmektedir. Ayrıca birçok proinflamatuvar endotelial hücrelerin cevabını inhibe etmektedir. Steroidlerin uzun dönem tedavilerde teropatik yararlarına rağmen bakteriyel enfeksiyonlara duyarlılığı artırmaktadır.

Kortikosteroidlerin çok sayıda yararlı etkilerinin olduğu bilinmektedir. Bu etkiler arasında şunlar yer almaktadır. Hücre membranının stabilizasyonu, inflamatuvar yanıtın azaltılması, süperoksit radikallerinin nötralizasyonu, lipid peroksidasyonunun sınırlandırılması, hücre içi kalsiyum akışının azaltılması, uyarıcı aminoasit salımının azaltılması, doku ödeminin azaltılması (Finger ve Almlı 1985, Farmer ve ark. 1991, Elsayed ve ark. 1997, Lang ve ark. 2002). Klinikte en sık kullanılan türleri; flunisolid, triamsinolon, prednizon, prednizolon, triamsinolon, deksametazon, budesonid betametazon, beklametazondur. Deksametazon, steroid hormonların glikokortikoid sınıfının sentetik bir üyesidir bir anti-enflamatuvar ve immünosüpresan ilaçtır (Wang ve ark. 2008, Sahoo ve ark. 2013, Venditti ve ark. 2014).

Şiddetli inflamatuvar patolojilerde kullanılan; antiinflamatuvar ve potent immünsüpresif etkiye en yüksek oranda sahip olan sentetik glukokortikoidler arasında deksametazondur. Deksametazon, güçlü bir glukokortikoid olup kortizondan yaklaşık 30 kat daha güçlüdür. Enflamatuvar sitokinlerin (IL-1 β , IL-10, IL-6, TNF- α , IL-1RA ve benzeri gibi) ekspresyonunu azaltmada çok etkilidir. Deksametazon hücre içinde etki gösterebilmektedir. Çünkü çevre dokulardan hızlı bir emilime sahiptir (Mynatt ve ark. 2006). Kortikosteroidlerin intrasellüler etki eden ajanlar olduğu da göz önüne alındığında deksametazonun daha potent bir ajan olduğu sonucuna varılabilir.

Deksametazon molekülü, genlerin düzenlenmesi, hücrelerin büyümesi ve bölünmesinden sorumlu hücresel reaksiyonlarda önemli rol oynamaktadır (Forouzandeh ve ark. 2014). Ayrıca, deksametazon ödem, fibrin birikimi, retinal ven tıkanıklığı ve inflamatuvar hücrelerin migrasyonunu azaltmada yardımcı olur (Cholkar ve ark. 2014). Deksametazon, iltihaplanma yerinde lökosit infiltrasyonu üzerine inhibitör etkisine neden olur. Zayıf bir çözünürlüğe sahip ve kristalli bir kortikoid olan deksametazon, diyabetik maküler ödem tedavisinde ve eklem kıkırdağı yaralanmalarında bir implant olarak kullanılabilir (Kumari ve ark. 2010).



Şekil 1. 7. Deksametazonun moleküler yapısı.

1.8. Çalışmanın Amacı

Bu tez çalışmasında; hyaluronik asit ve deksametazon yüklenmiş hyaluronik asit uygulamasının *in vitro* kıkırdak kültüründe proliferatif indeks, canlılık, apoptoz-nekroz, genotoksik ve sitotoksik etkilerinin araştırılması amaçlanmıştır. Bu çalışmadan elde edilen bulguların, klinik öncesi çalışmalar ve klinik sonrası eklem kıkırdak hasarı bulunan hastalarda kullanılabilirliğinin gösterilmesi açısından önem taşıyabileceği değerlendirilmektedir.



2. GEREÇ VE YÖNTEM

2.1. Kullanılan Cihazlar ve Kimyasallar

2.1.1. Cihazlar

Yapılan çalışmada kullanılan cihazlar; Laminar flow kabin (ESCO class II BSC Laminar Flow Cabinet, Labor İdam, Türkiye), soğutmalı santrifüj (ROTINA 380R Hettich, Almanya), İverted mikroskop (Leica DM6000B, İsveç),Vorteks (Heidolph), Eliza plate okuyucu (BİOTEK GEN5 Elisa Reader Power Wave XS2), Karbondioksitli etüv (Binder CB150), Hassas terazi (Mettler toledo MS204), Isıtıcı manyetik tabla (IKA C-MAG HS 7), Hücre sayma cihazı (Countess), X-celligence (Roche, ACEA Biosciences, Inc), Zetasizer (Malvern, İngiltere)

2.1.2. Kimyasallar ve Malzemeler

Hücre kültürü çalışmaları için, hücrelerin kültür ortamı olarak RPMI-1640 (Roswell Park Memorial Institute-1640; ABD), L-glutamin, Penisilin/Streptomisin(Biological industries, İsrail), Fetal Bovin Serum (FBS; Biological industries, İsrail), hücrelerin bulunduğu flasklardan (kültür kapları) uzaklaştırılması Tripsin-EDTA (Tripsin-Etilendiamin tetraasetik asit, Biological industries,İsrail) yardımı ile ve hücrelerin yıkama işlemi Fosfat tamponu (PBS, Biological industries,İsrail) ile yapılmıştır. Hücrelerin yeteri kadar çoğalıp kültür ortamını tamamen kapladıktan sonra gerçekleştirilen hücre sayımı tripan mavisi kullanılarak gerçekleştirilmiştir. Hücre canlılığının belirlenmesi için gerçekleştirilen sitotoksosite testlerinden; WST-1 (BioVision, San Francisco) ve Alamar mavisi (İnvitrogen, ABD) kullanılarak yapılmıştır. İkili boyamada Ribonükleaz-A (Serva, İsrail), Propidyum İyodür (Serva, İsrail), Hoechst 33342 (Serva, İsrail) kullanılarak apoptoz/nekroz oranları belirlenmiştir. Hücre kültür çalışmaları 25 cm²'lik hücre kültür flaskı (BD, USA),

96,48,24'lük well plate (Corning, ABD) tek kullanımlık pipetler (2ml,5ml,10ml, Corning) 15-50 ml santrifüj tüpü (Nunc, Almanya) ile gerçekleştirilmiştir.

Ethanol (Merck, Almanya), serum fizyolojik, Dimetil metilen mavisi (sigma, ABD), Deksametazone (Serva, İsrail),sulfosuccinate (Sigma, ABD), 1- heptanol (Sigma, ABD), ethyl methanesulfonate (sigma, ABD), Cytochalasin B (Sigma, ABD).

2.2. Hyaluronik Asit Nanopartikül Hazırlanması

HA nanopartikülleri Şahiner N. ve ark. kullandığı metod takip edilerek sentezlenmiştir (Sahiner ve Jia 2008). HA partikülleri yağ içinde su olarak (eater-in oil) geçen mikroemülsifikasyon sistemi kullanılarak sentezlenmiştir. 0,54 ml HA solüsyonu (oransal olarak ağırlıkça %6,8' lik 0.2 M NaOH (sodyum hidroksit, HA MW: 560 kDA) 15 ml isooktan içeren 0.2 M AOT(sülfosüksinat) ve 0.04 M 1-HP (1-heptanol) içinde dağıtılır. Karışım temiz bir solüsyon elde edilinceye kadar 1 saat süreyle oda sıcaklığında sürekli olarak 2000-2200 RPM hızında karıştırılır. Ardından reaksiyon karışımı Whatman filtre kağıdı (partikül tutulumu >8 µm) kullanılıp filtre edilerek asetona geçirilir. 4500 rpm de 10 dakika santrifüj edilerek toplanır. Partiküller santrifügasyonla toplanırlar ve 25 °C' de vakum altında kurutulur.

2.2. Hyaluronik Asit Nanopartiküllerin Karakterizasyonu

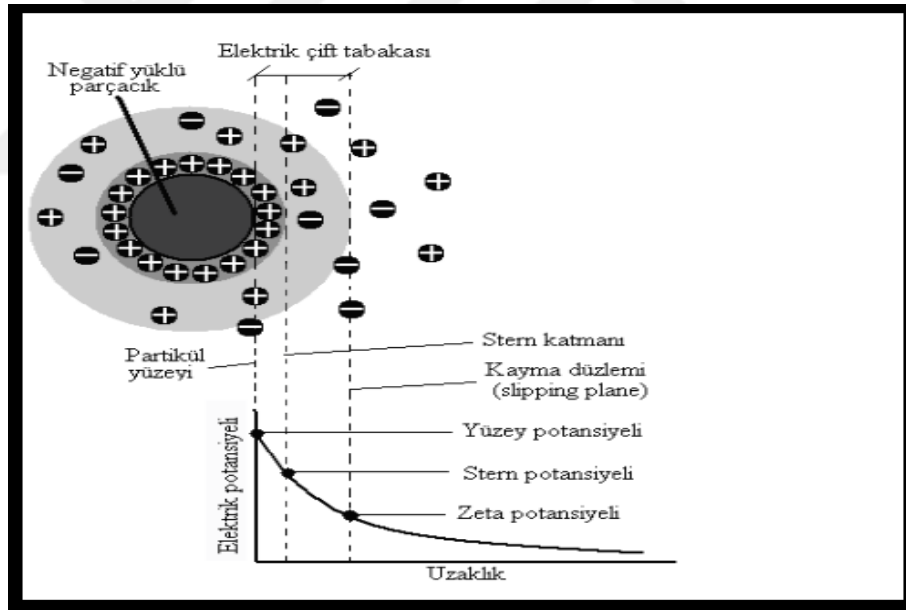
2.3.1 Morfolojik Özelliklerinin Belirlenmesi

Hyaluronik asit nanopartiküllerinin morfolojik özelliklerini belirlemek için SEM (scanning elektron microscope) tekniğinden yararlanılmıştır. Hyaluronik asit nanopartiküller stamp üzerine yerleştirilip ince bir altın film tabakasıyla kaplanarak SEM fotoğrafları çekilmiş ve nanopartiküller şekil ve boyut dağılımı yönünden değerlendirilmiştir.

2.3.2. Fizikokimyasal Özelliklerinin Belirlenmesi

2.3.2.1. Boyut ve Yük Analizi

Nanopartiküllerin tanecik boyutunun ve tanecik boyutu dağılımlarının zamanla değişiminin tespiti için dinamik ışık saçılımı yöntemi ile çalışan Zetasizer (Malvern, İngiltere) cihazı kullanılmıştır. Zeta Sizer, bir çözelti içindeki parçacıkların boyut dağılımını ve zeta potansiyellerini ölçmekte kullanılan bir teknik olup Dinamik Işık Saçılımı (DLS) prensibine göre çalışmaktadır. Tanecik boyutu ölçülmek istenen örnek, uygun bir konsantrasyonda seyreltilmiş bir sıvı içerisinde dağıtılır. Işın demeti, hazırlanan örneğin üzerine gönderilir. Saçılan ışığın şiddetindeki değişim, nanopartikül parçacıklarının hareketine, sıcaklığa, büyüklüğüne ve ortamın vizkositesine bağlı olarak değişim gösterir.



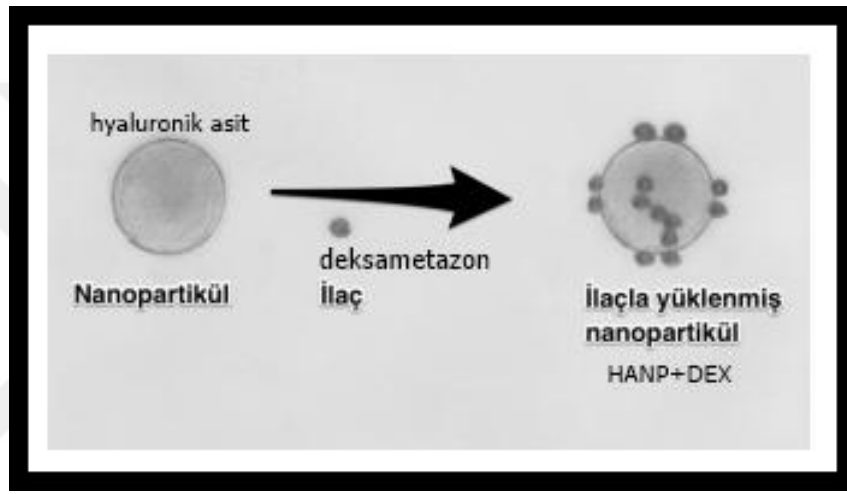
Şekil 2.1. Dinamik Işık Saçılımı mekanizmasının şematik gösterimi (Karahan 2009).

Nanopartiküller deiyonize su ile seyreltilerek yaklaşık 1-2 mL olacak şekilde polistren küvet içerisine eklenerek gerekli ölçümler gerçekleştirilmiştir.

2.3. Nanopartiküllere Etken Madde Yüklenmesi ve Salımı

2.4.1. İlaç Yükleme Çalışmaları

Hyaluronik asit nanopartiküllere ilaç yükleme çalışmalarında deksametazon kullanılmıştır. 1 mg/ml etken madde oranında deksametazon yüklenerek ilacın homojen şekilde dağılması için 1 gün boyunca rotatorda bekletilmiştir. Nanopartiküller 3 defa distile su ile yıkanarak adsorbe edilemeyen ilaçların giderilmesi sağlanmıştır.



Şekil 2. 2. İlaç yükleme şeması (KAHVECİ).

2.4.2. İlaç Salınım Çalışmaları

Hyaluronik asit nanopartiküllerden ilaç salınım çalışmalarının gerçekleştirilebilmesi için, deksametazon farklı konsantrasyonlarda hazırlanarak ve 242 nm'de hazırlanan bu çözeltilerin absorbansları ölçülerek standart kalibrasyon eğrisi hazırlanmıştır. Hazırlanan farklı konsantrasyonlardaki çözeltilerin absorbansları Nano-drop (Thermo Scientific, Nanodrop 1000) kullanılarak ölçülmüştür.

2.5. Hücre Kültürü Çalışmaları

2.5.1. Kondrosit İzolasyonu

Kırıkkale Üniversitesi Hüseyin Aytemiz Deneysel Araştırma Ünitesi'nde çeşitli nedenlerle ötenazi uygulanan 1 yaşlı erkek Yeni Zelanda tavşanının proksimal femuru septik ve aseptik koşullarda diseke edildikten sonra, femur ve tibia epifiz kırıkdağı bistüri ucu ile kazınarak 1-2 mm çaplı toplam 10-15 adet kırık dokusu elde edildi. Alınan doku önce %5 batikon içeren Dulbecco's PBS (DPBS) içerisine aktarılıp laboratuvar ortamına getirildi. %1 ve % 0,5'lik Penicillin-streptomycin içeren DPBS ile yıkama gerçekleştirildi. Daha sonra hazır RPMI (%89 DMEM-F12, %5 Fötal bovin serum, %1 Penicilin-streptomycin-amphoterycin) içerisine aktarıldı. Sonrasında, 6 kuyucuklu kültür plağına alınarak 1 ml hazır RPMI besiyeri içerisinde bistüri yardımıyla çok ince parçalara ayrıldı. Daha sonra aşağıda açıklandığı şekilde; kollajenzalı ve kollajenzsız olarak 2 farklı protokol uygulandı.

2.5.1.1. Kollajenzsız Yöntem:

6 kuyucuklu kültür plağında 1 ml hazır besiyeri (RPMI) içerisinde parçalara ayrılan dokular küçük parçalar halinde 25 cm²'lik flaslara yerleştirilerek üzerlerine yaklaşık 50 µl besiyeri eklendi ve flask ters çevrilerek 1 gün etüvde inkübe edildi. Ertesi gün flaslara 1 ml hazır RPMI besiyeri eklendi ve düz bir şekilde etüvde inkübasyona bırakıldı. 1 gün sonra 2 ml daha besiyeri eklendi. Gün aşırı besiyeri değişimi yapıldı. 6 kuyucuklu kültür plağında, 1 ml hazır RPMI içerisinde parçalara ayrılan dokular direkt flaslara ekildi ve etüvde inkübasyona bırakıldı. Ertesi gün üzerine 2 ml besiyeri eklenerek tekrar etüvde inkübasyona bırakıldı ve gün aşırı besiyeri değiştirildi. Her besiyeri değişiminden sonra, toplam hacmin % 1'i kadar L-glutamin eklenerek, hücreler flask yüzeyini tamamen kapladığında pasajlama yapıldı.

2.5.1.2. Kollajenazlı Yöntem

10 ml, 2 mg/ml 'lik kollajenaz tip II (PBS)'a 2 ml 1mg/ml 'lik CaCl₂ (distile su) eklendi. Bu karışım yıkanan dokuların bir kısmına eklenerek parçalamaya devam edildi ve parçalanmış dokular tüm gece etüvde bekletildi. Çorba kıvamına gelen kollajenazlı doku santrifüj tüpüne alınarak üzerine 2'şer ml hazır RPMI eklenerek 3000 rpm de 3 dk santifüj edildi. Süpernatant atıldı ve dipte kalan pellet kısmının üzerine yeteri kadar hazır RPMI eklenip pipetleme yapıldıktan sonra ve 25 cm²'lik flasklara ekildi. Flasklar etüvde inkübasyona bırakıldı. 2 günde bir besiyeri değişimi yapıldı. Besiyeri değişiminden sonra besiyerinin hacimce % 1'i kadar da L-glutamin eklendi. Hücreler flask yüzeyini tamamen kapladığında pasajlama yapıldı.

2.5.2. WST-1 Sitotoksisite testi

Metabolik aktivitenin ölçümüne dayalı hücre proliferasyon testlerinde yaygın olarak MTT, XTT, M T S, WST1 gibi tetrazolyum tuzları kullanılmaktadır (Ramesh ve ark. 2016). WST-1 [2-(4-Iodophenyl)-3-(4-nitrophenyl)-5-(2,4-disulfophenyl)-2H-tetrazolium] substratı kullanılarak canlı veya apoptozun erken evresindeki hücrelerin mitokondrileri aracılığıyla oluşturduğu reaksiyonda, solüsyonlarda bulunan tetrazolyum halkası hücre mitokondrilerinde bulunan dehidrogenaz enzimlerince parçalanarak renkli formazan kristallerini oluşturur (Tuncer 2014). Formazan oluşumu, yalnızca aktif mitokondrinin bulunduğu canlı hücrelerde görülmektedir. Bu da hücre canlılığının bir belirteci olarak kabul edilmekte ve spektrofotometrik olarak belirlenen değer, yaşayan hücre sayısı ile ilişkilendirilmektedir (Öğüt ve Atay 2012).

Hazırlanan örnekler (hyaluronik asit ve hyaluronik asit deksametazon ilaçlı formülasyonlarının) kıkırdak hücreleri ile inkübe edilerek WST-1 hücre canlılık testine tabi tutulmuştur. Bu amaçla 48 kuyucuklu plate kullanılarak yapılan WST-1 sitotoksisite testinde 48 kuyucuğa 20x10³ adet kıkırdak dokudan primer hücre kültürü ile izole edilen kondrositler ekildi. Üzerlerine %10 Foetal bovine serum, %1 penisilin streptomisin içeren RPMI eklendi. Hücreler 37°C de %5 CO₂'li inkübatörde

24 saat inkübe edildi. 24 saatlik inkübasyonun ardından hyaluronik asit nanopartikül ve hyaluronikasit+deksametazon nanopartikül örneklerinden konsantrasyonları 1mg/ml, 0,5mg/ml, 0,25mg/ml, 0,125mg/ml, 0,063mg/ml, 0,0312mg/ml olarak uygulandı. Uygulamanın ardından 24 saatlik inkübasyon yapıldı. İnkübasyonun ardından kuyucuklardaki hücrelerin vasatları atıldı yerine 100 µL fenol red içermeyen besiyeri eklendi. Her kuyucuğa 10 µL WST-1 (BioVision, San Francisco) solüsyonu eklendi ve 4 saat inkübe edildi. İnkübasyonun ardından 440nm (BİOTEK GEN5 Elisa Reader Power Wave XS2) dalga boyunda mikroplate okuyucuda absorbans ölçümü yapıldı.

2.5.3. Alamar Mavisi Testi

Alamar mavisi boyası ile hücre proliferasyonu ve canlılığının değerlendirildiği hem kolorimetrik hem de florometrik renk değişimleri ile metabolik aktivitenin belirlendiği bir yöntemdir. Alamar mavisinin indirgenmesi ile medyumdaki rengin maviden (okside) pembeye (indirgenmiş) dönüşmesi esasına dayanır (Namavar ve ark. 2012).

Yapılan uygulamada 96 kuyucuklu well plate kullanarak yapılan alamar mavisi testinde 96 kuyucuğa 5×10^3 adet kırkırdak dokudan primer hücre kültürü ile izole edilen kondrositler ekildi. Üzerlerine %10 Foetal bovine serum, %1 penisilin streptomisin içeren RPMI eklendi. Hücreler 37°C de %5 CO₂'li inkübatörde 24 saat inkübe edildi. 24 saatlik inkübasyonun ardından hyaluronik asit nanopartikül ve hyaluronik asit+deksametazon nanopartikül örneklerinden konsantrasyonları 1mg/mL, 0,5mg/mL, 0,25mg/mL, 0,125mg/mL, 0,063mg/mL, 0,0312mg/mL olarak uygulandı. Her örnek 4 tekrarlı olarak çalışıldı. Uygulamanın ardından 24 saatlik inkübasyon yapıldı. İnkübasyonun ardından kuyucuklardaki hücrelerin vasatları atıldı yerine 100 µL fenol red içermeyen besiyeri eklendi. Her kuyucuğa 10 µL alamar blue (İnvitrogen, ABD) solüsyonu eklendi ve 4 saat inkübe edildi. İnkübasyonun ardından üzerindeki besiyerini atmadan 50 µL DMSO eklenip 570 nm dalga boyunda mikroplate okuyucuda absorbans ölçümü yapıldı.

2.5.4. İkili boyama (doublestaining) ile apoptoz-nekrozun belirlenmesi

Hücre ölümleri biyolojik ve morfolojik olarak değerlendirildiğinde; apoptoz ve nekroz olarak iki sınıfa ayrılabilir. Apoptoz programlı (fizyolojik) hücre ölümü olarak adlandırılırken, nekroz hasar yolu ile ölüm anlamını taşımaktadır (Martin ve ark. 1998). Hücrede nekroz oluşumu toksik madde varlığı ve oksijen yetersizliği gibi durumlardan kaynaklanabilir ve hücrede şişme görülür. Apoptoz ise patolojik ve fizyolojik sebeplerden kaynaklanmaktadır. Apoptoz olan hücrelerin komşu hücrelerle bağlantısı kalmaz ve hücrede küçülme görülür (Martin ve ark. 1998). Apoptozun organizmaya genelde yararlı etkileri olurken nekrozun etkileri her zaman zararlı ve ölümcüldür (Danial ve Korsmeyer 2004).

Yapılan çalışmada ikili boyama solüsyonu hazırlandı (100µL Ribonükleaz A, 100ul Propodium İodide, 500µL Hoescht 33342 10 mL PBS içerisinde çözülerek hazırlandı) Ribonükleaz A; sitoplazmik RNA'nın boyanmasını önler, Propodium İodide nekrotik hücreleri boyar, Hoescht 33342 apoptotik hücreleri boyar. İkili boyama metodunda kullanılan Hoechst 33342 canlı hücrelerin zarlarından geçer ve floresan mikroskopunda DAPI filtresi ile hücrelerin bize mavi renkte görülmesini sağlar. Propodium İodide boyası ise ölü veya plazma membranı hasarlı hücrelerin zarlarından geçerek hücrelerin kırmızı görünmelerini sağlar. Bu boya canlı hücreleri boyamaz bu nedenle canlı ve ölü hücre ayrımını kolaylıkla ayırt etmemizi sağlar. Canlı ve apoptotik hücre çekirdekleri mavi renkte olup FITC floresan filtresi ile görüntülendiğinde yeşil görünürler, nekrotik hücreler propodium boyası ile boyandıklarından kırmızı görünürler. Yapılan apoptotik-nekrotik indeks çalışmasında 480-520 nm dalga boyunda inceleme yapılmış olup bu dalga boyunda aynı anda nekrotik hücrelerin çekirdeği kırmızı; apoptotik veya sağlıklı hücrelerin çekirdekleri yeşil olarak elde edilmiştir.

96 kuyucuklu plate kullanarak yapılan ikili boyama testinde 48 kuyucuğa 20×10^3 adet kırıldak dokudan izole edilen kondrositler ekildi ve üzerlerine RPMI eklendi. Hücreler 37°C de %5 CO₂'li inkübatörde 24 saat inkübe edildi. 24 saatlik inkübasyonun ardından Hyaluronik asit ve hyaluronik asit + deksametazon örnekler

hazırlandı ve konsantrasyonları 1mg/mL, 0,5mg/mL, 0,25mg/mL, 0,125mg/mL, 0,063mg/mL, 0,0312mg/mL her örnek 3 tekrarlı olarak çalışıldı. Uygulamanın ardından 24 saatlik inkübasyon yapıldı. İnkübasyonun ardından hücrelerin vasatları atıldı, her kuyucuğa 70 µL ikili boyama solüsyonu damlatıldı. 15 dk karanlıkta inkübe edildi. İnkübasyonun ardından florasan ataçmanlı mikroskopla FITC ve DAPI filtresinde inceleme yapıldı. Tüm görüntüler 20X büyütmede çekildi.

2.5.5. Genotoksisite (mikronükleus) Testi

Genotoksisitenin belirlenmesinde kullanılan mikronükleus (MN) testi (Fenech ve Morley 1985, Heddle ve ark. 1991), kromatid kırıkları ya da asentrik kromozomlarda kromatidlerin anafazda geri kalmasından dolayı (kalgın kromozom) telofazda oluşan kardeş nükleusun dışında rastlanan küçük nükleuslardır.

Bu çalışmada 6 kuyucuklu platalere 50×10^3 hücre ekilerek yapılan mikronükleus testinde örnekler 5 tekrarlı çalışıldı, kontrol grubu olarak sadece besiyeri olan hücreler, pozitif kontrol olarak 50µg/mL ethymethanosulfonate kullanıldı. Numune tartılarak besiyerinde hazırlanan ekstrelerden 200 mg/mL hücrelerin üzerine uygulanarak inkübasyonun 44.saatinde binükleuslu hücreler elde etme amacıyla hücre bölünmesini sitokinez aşamasında durduran final konsantrasyonu 6 µg/mL olan sitokalazin-B (Cyt- B) ilave edildi.

72 saatin sonunda; hücrelerin şişerek parçalanmalarını ve kromozomların birbirlerinden iyice ayrılmasını sağlamak amacıyla 5 dk oda sıcaklığında soğuk 0,075 M KCL hipotonik solüsyonu ile inkübe edildi. (KCL hazırlanışı: 1,397 g toz KCL 250 mL'lik balon joje içerisinde steri ldistile su ile çözülür. +4°C'de uzun süre saklanabilir. Süre sonunda hücreler, hipotonik solüsyon muamelesi sonucu açılmış olan metafaz plaklarının tespit edilmesini sağlamak amacıyla 3:1 oranında (metanol: glasiyel asetik asit) taze hazırlanmış fiksatif ile biraz mekanik etki yardımıyla fiske edildi.%4 lük formaldehit ile fiksasyon devam ettirildi. Daha sonra Propodium iodide boyası ile boyandı. Florasan ataçmanlı mikroskopta incelendi.

2.5.6. Dimetilmetilen Mavisi (DMMB) Analizi ile Glikozaminoglikan Miktarının Belirlenmesi

Kondrosit tayini için dimetilmetilen mavisi boya bağlanma esasına dayalı Blyscan Sülfatlanmış Glukozamin Test Kiti (Biocolor, UK) kullanıldı (Wagner ve ark. 1998). Bunun için 16 mg Dimetilmetilen mavisi, 2,37 g NaCl, 95 mL 0,1 mol/l HCl 1000 mL distile suda çözüldü ve pH 3.0 olarak ayarlandı. Hazırlanan DMMB çözeltisi kullanılıncaya kadar kahverengi şişede 4°C de saklandı. Yaklaşık 1×10^6 kondrosit 300 mg/mL papain (Amresco, İsrail), 2 mM EDTA (Amresco, İsrail), 2 mM N-acetyl L-cysteine (Sigma-Aldrich, Almanya) içeren çözelti içerisinde 65°C' de bir gece parçalandı. 100 mM Na_2HPO_4 ve 5mM EDTA 100 mL distile suda çözülerek PBE (fosfat buffer edta) tampon çözeltisi hazırlandı. Standart için 125µg/mL kondroitin sülfat, hazırlanan PBE çözeltisi içerisinde çözdürülerek hazırlandı. 0-10µg/mL arasında hazırlanan kondroitin sülfat çözeltileri 48 well plate'in kuyucuklarına koyuldu ve üzerlerine 200 µL DMMB stok çözeltisi eklendi. 1 gece boyunca parçalanmış hücreler 8000 g de 15 dk santrifüj edildikten sonra üstte kalan süpernatant PBE çözeltisi kullanılarak 1-10µg/mL arasında hazırlanıp 3 tekrarlı olarak kuyucuklara yerleştirildi ve üzerlerine 200 µL DMMB stok solüsyonu eklendi. Örnekler 525nm de ELISA plate okuyucuda okutuldu.

2.5.7. Gerçek Zamanlı Hücre Analiz Sistemi (RTCA Xcelligence) ile Hücre Proliferasyonunun Takibi

Sistem hücre kültürü E-Plate'lerinin zeminine yerleştirilmiş mikro-elektrodlar sayesinde elektriksel empedans ölçer. Empedans ölçümü hücre sayısı, canlılığı, morfolojisi ve hareketi dahil hücrelerin biyolojik durumu hakkında kantitatif bilgi verir. X-CELLigence sistemleri ile son nokta metodlarıyla elde edilmesi mümkün olmayan bir veri elde edilebilmektedir.

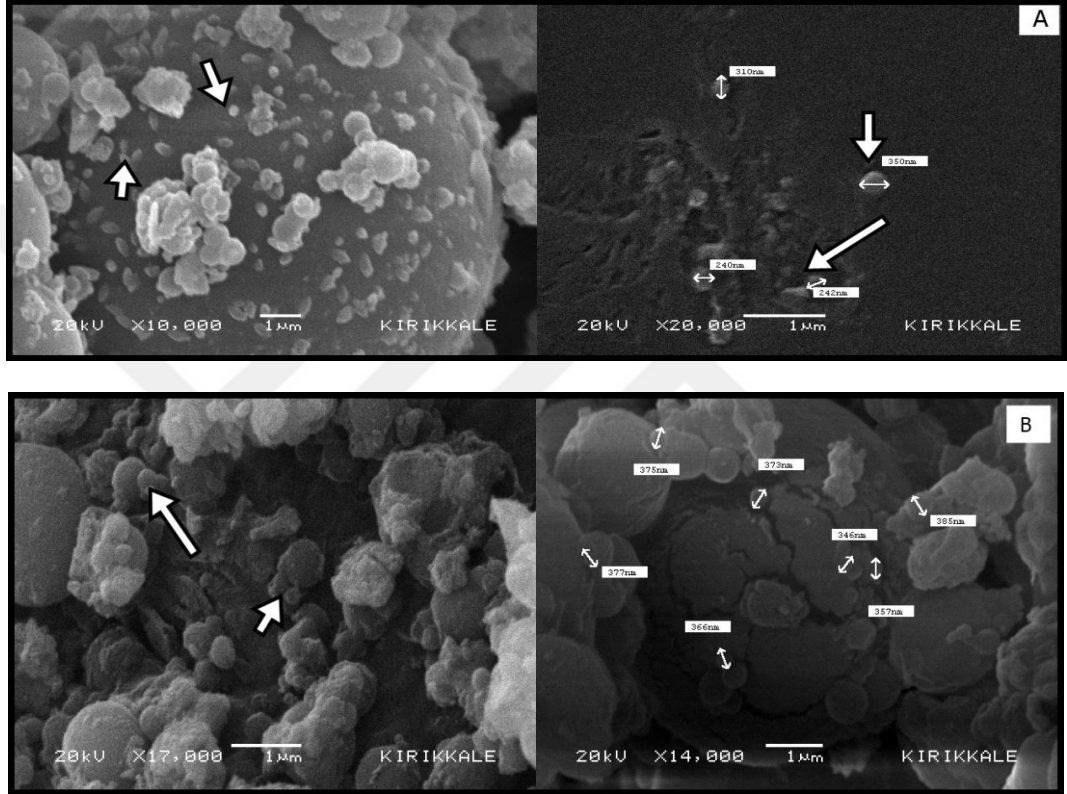
Çalışmada kıkırdak hazırlanan formülasyonlarla muamelesi sonucu proliferasyonunu incelemek için gerçek zamanlı hücre analiz sistemi kullanılmıştır. Bu amaçla flasktaki hücrelerin yeterli sayıya ulaştığı mikroskopik incelemeyle belirlendikten sonra içerisindeki besiyeri döküldü. 1 mL tripsin-EDTA eklendi flask

3-4 dakika inkübatörde bekletildi. İnkübasyon sonrasında mikroskopik olarak hücrelerin flask yüzeyinden ayrılıp ayrılmadıkları kontrol edildi. Hücrelerin yüzeyden ayrıldıkları mikroskopik olarak gözlemlendikten sonra, flaska medyum eklenerek hücreler falkon tüpe aktarılarak 2500 rpm'de 2 dakika santrifüj edildi. Santrifüj sonrasında süpernatant kısmı uzaklaştırıldı ve tüpün dibinde kalan hücre pelleti üzerine 1 mL RPMI medyum eklenerek süspanse edilip hücre sayımı yapıldı. Daha sonra E-plate'in her kuyusuna 100'er µL medyum koyuldu. E-plate etüvde bulunan XCELLigence 'e yerleştirildikten sonra plate ile cihazın aynı sıcaklığa ulaşması için 5 dakika beklendi. 1 dakika cihazda background okuması yapıldıktan sonra e-plate çıkarıldı. Hücreler altın kaplı 96 kuyucuklu e-plakanın her bir kuyucuğuna 5000 hücre/kuyucuk olacak şekilde hücreler kuyucuklara pipetlendi. 12 saat sonunda hücreler büyüme fazına geçtiği esnada farklı oranlarda Hyaluronik asit nanopartikül ve Hyaluronik asit deksametazon ilaçlı nanopartikül formülasyonları hücrelerin üzerine ilave edilmiş ve plaka etüve yerleştirilmiştir. Tekrar e-plate etüve yerleştirilip 10 dakika beklendi. 10 dakika sonunda okuma başlatıldı. 96 saat boyunca proliferasyon takip edildi. Sonuç olarak hücrelerin zamana bağılı proliferasyonunu gösteren grafik elde edilmiştir.

3. BULGULAR

3.1.Hyaluronik Asit ve Deksametazon Yüklü Nanopartiküller

3.1.1. Nanopartiküllerin Morfolojik Görüntüleri

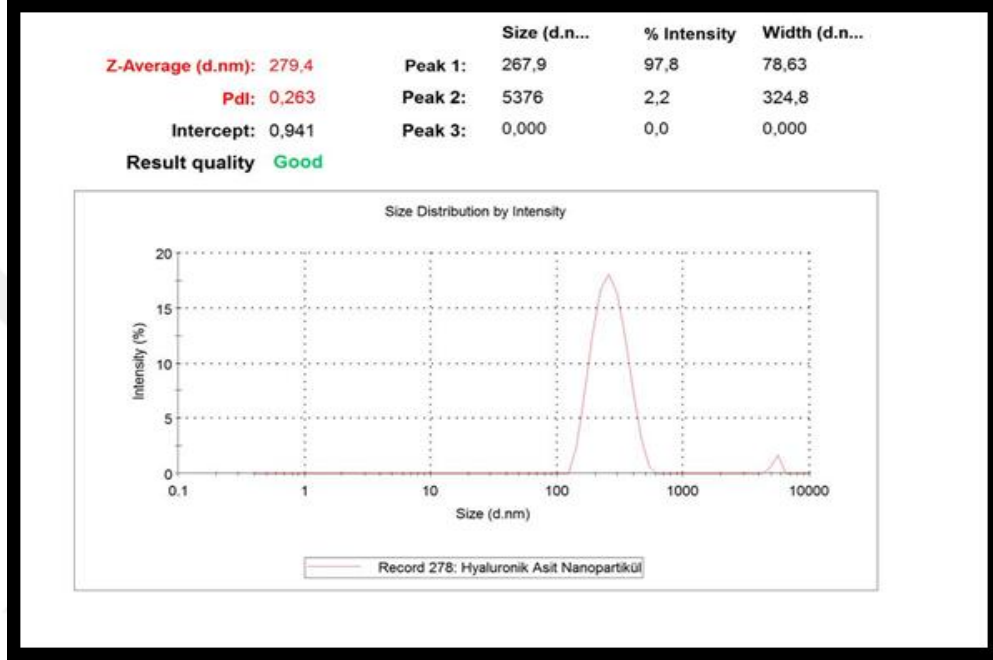


Şekil 3. 1. A) Hyaluronik asit nanopartiküllerinin SEM (scanning elektron microscope) görüntüleri, B) Hyaluronik asit+ Deksametazon nanopartiküllerinin SEM (scanning elektron microscope) görüntüsü

Taramalı elektron mikroskop incelemesinde, stamp üzerine film şeklinde yayılan hyaluronik asit nanopartiküllerinin homojenizasyonunun başarılı şekilde gerçekleştirildiği ve büyük oranda nanopartikül boyutlarında oldukları tespit edilmiştir. Buna göre, gerçekleştirilen boyut ölçümlerinde tek başına seçilebilen en küçük partikül boyutu 50 nm olduğu, genel olarak ise hyaluronik asit

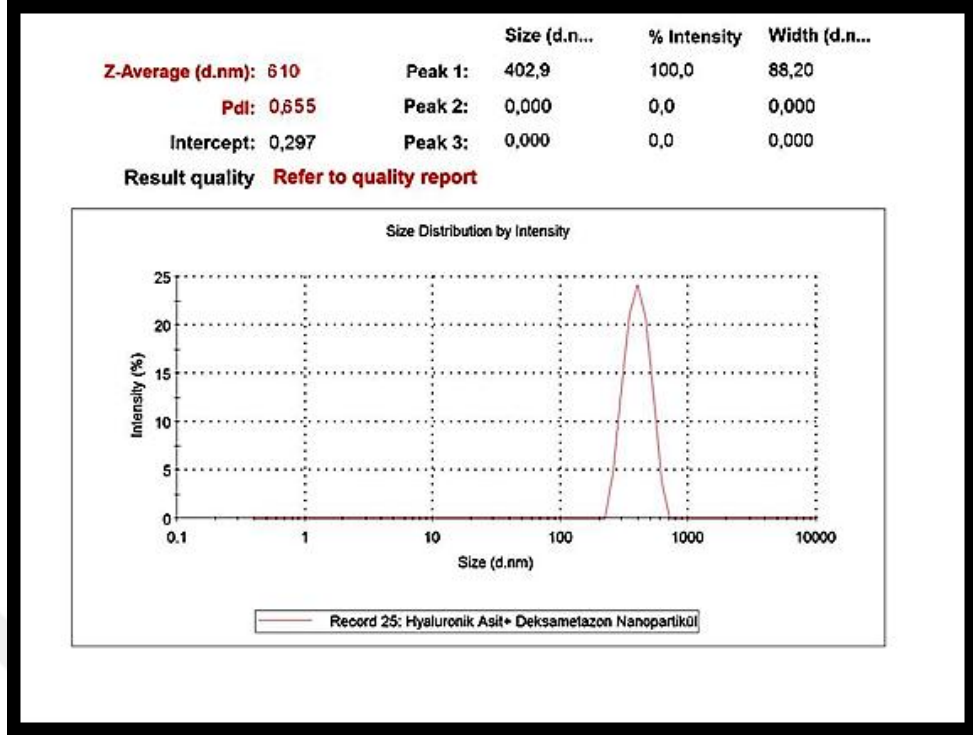
nanopartiküllerinin 240-310 nm, hyaluronik asit+deksametazon nanopartiküllerinin 350-410 nm boyutları arasında oldukları görülmüştür.

3.1.2. Boyut Analizi



Şekil 3. 2. Hazırlanan hyaluronik asit nanopartiküllerin Zeta-Sizer'da hacimce boy dağılımı grafiği.

Zeta sizer sonucu çıkan grafiğe bakıldığında nanopartiküllerin sayıca %97.8'inin 267,9 nm büyüklüğünde olduğu, %2.2'sinin ise partiküllerin zamanla topaklaşma yaparak agregasyona uğradığını ve bu sebeplerden dolayı partikül boyutunun büyümesine yol açtığını göstermektedir (Fuente ve ark. 2008). Bu durumda ortalama nanopartikül büyüklüğüne etki etmekte ve ortalamanın artmasına sebep olmaktadır.



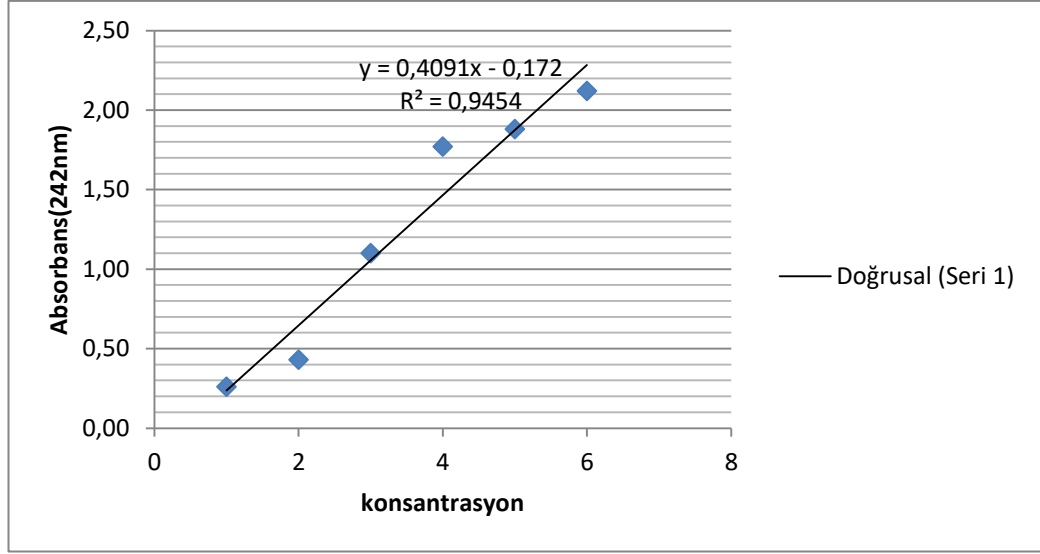
Şekil 3. 3. Hazırlanan hyaluronik asit +deksametazon yüklü ilaçlı nanopartiküllerin Zeta-Sizer'da hacimce boy dağılımı grafiği.

Zeta sizer sonucu çıkan grafiğe bakıldığında nanopartiküllerin sayıca %100'ünün 402,9 nm büyüklüğünde olduğu görülmektedir.

3.2. Nanopartiküllere Etken Madde Yüklenmesi ve Salımı

3.2.1. İlaç Yükleme Çalışmaları

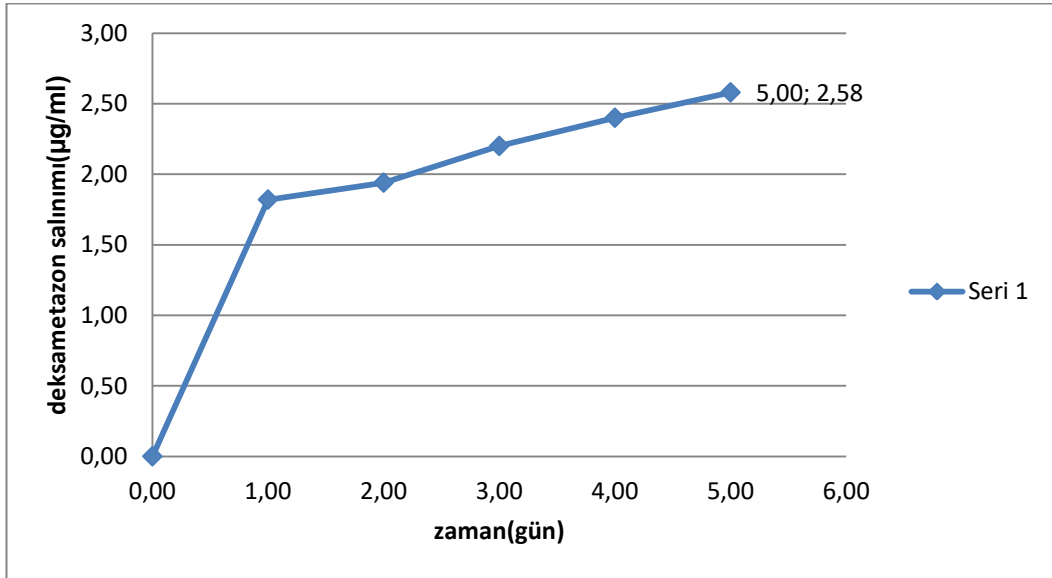
Hyaluronik asit nanopartiküllere deksametazon etken maddesinin yüklenmesi amacı ile ilk olarak deksametazona ait bir kalibrasyon grafiği çıkarılmıştır (Şekil 3.4). Bunun için öncelikle Uv/Vis. Spektrofotometre (Nanodrop) kullanılarak 242 nm'de deksametazonun maksimum absorbans verdiği belirlenmiş ve 25-1000 µg/mL aralığında deksametazonun etken maddesi kullanılarak farklı konsantrasyonlarda dalga boyları bulunmuştur.



Şekil 3.4. Deksametazona Ait Kalibrasyon Grafiği.

Etken maddenin maksimum absorbans verdiği 242 nm’de, farklı derişimlerde hazırlanmış kalibrasyon grafiği.

3.2.1. İlaç Salınım Çalışmaları

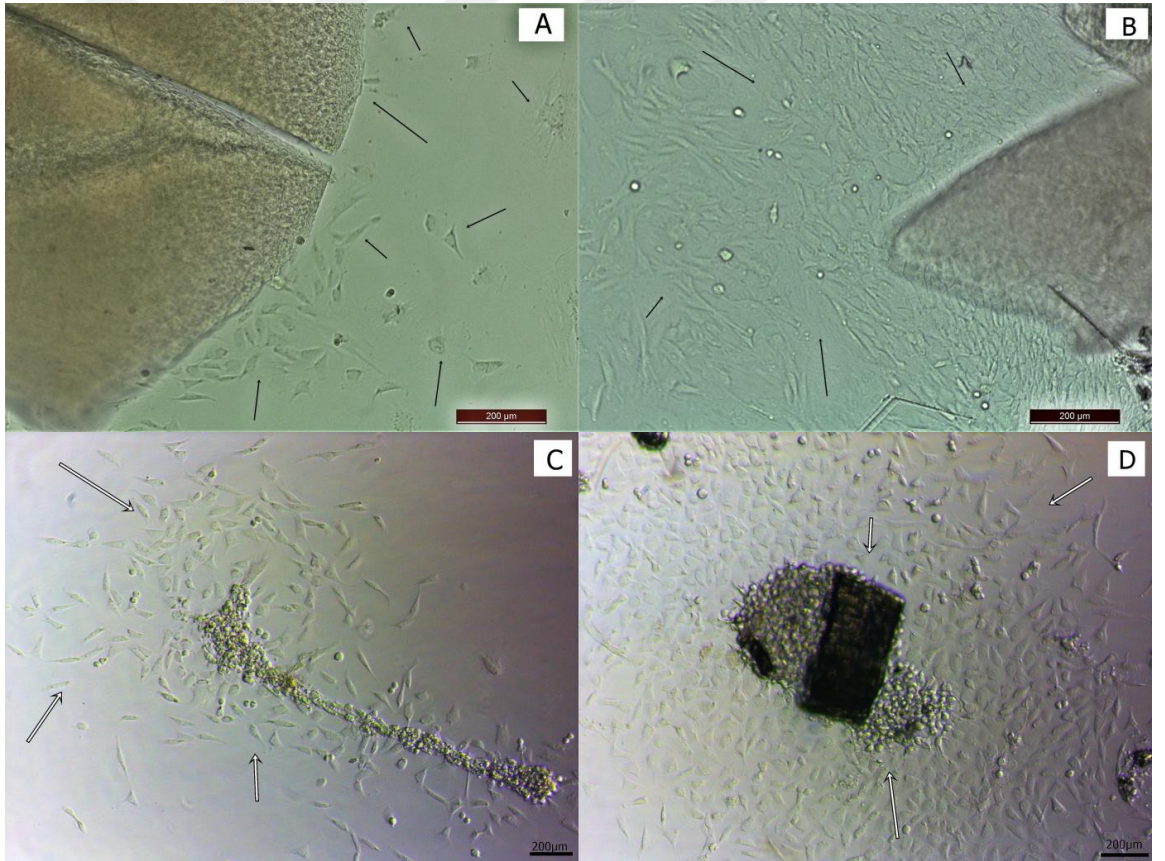


Şekil 3.5. Hyaluronik asit nanopartiküllerden salınan ilaç miktarının zamanla değişimi.

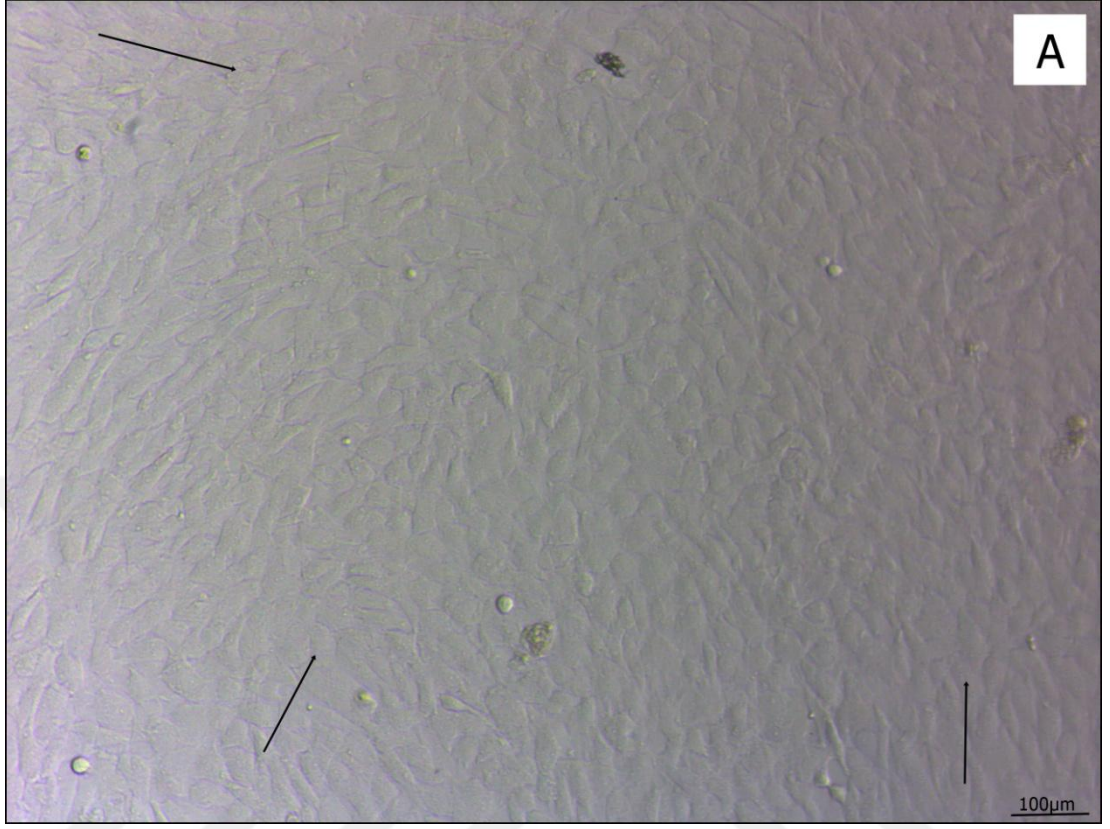
İlaç yüklü hyaluronik asit nanopartiküllerin ilaç salımları 96 saat süre ile takip edilmiştir. Salınımın kontrol edildiği günlerde az miktarda gerçekleştiği görülmektedir. Ayrıca bu süre uzatılarak salınımın uzun bir süre içerisinde gerçekleştirildiği takdirde salınım miktarının artacağı literatürlerde görülmekte olup 0-30 güne çıkarıldığında deksametazonun salınımının fazla miktarda gerçekleşmesi söz konusudur (Jayant ve Srivastava 2007).

3.3. Hücre ile Etkileşim Çalışmaları

3.3.1. Kondrosit Hücre Kültürü İzolasyonu



Şekil 3.6. A-B-C-D: Kıkırdak dokudan dökülen ilk kondrositlerin ışık mikroskopunda çekilmiş görüntüsü, beyaz oklar; Kıkırdak hücrelerini göstermektedir. (Bar=100µm-20X büyütmede Leica DM6000 ile görüntülenmiştir)



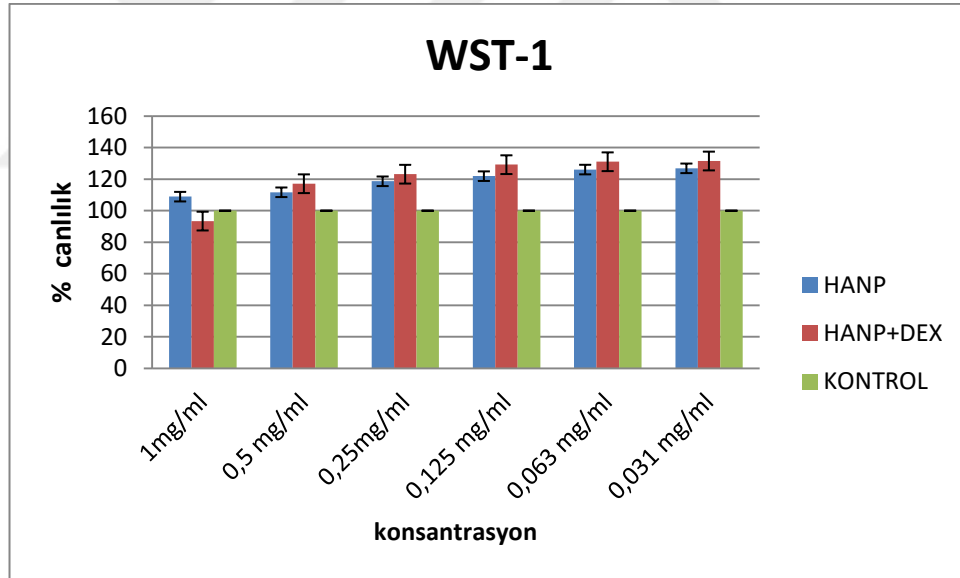
Şekil 3.7. Primer hücre kültürü ile elde edilen kondrositlerin konfluent hale gelmiş ışık mikroskopunda çekilmiş görüntüsü siyah oklar; Bazı kıkırdak hücrelerini göstermektedir (Bar=100µm-20X büyütmede Leica DM6000 ile görüntülenmiştir)

3.3.2. WST-1 SONUÇLARI

Çalışmanın bu bölümünde farklı derişimlerde hazırlanan hyaluronik asit nanopartikül ve deksametazon yüklü hyaluronik asit nanopartikül şeklindeki formülasyonların kıkırdak hücreleri üzerine sitotoksik etkileri incelenmiştir.

Cizelge 3. 1. Hazırlanan Hyaluronik asit nanopartikül (HANP), Hyaluronik asit nanopartikül+Deksametazon (HANP+DEX) nanopartiküllerinin kondrositler üzerine sitotoksik etkileri

	Konsantrasyon	Kıkırdak %Canlılık±Std	Hücreleri
Kontrol	0	100	
HANP	1mg/mL	108,91±0,01	
	0,5mg/mL	111,70±0,01	
	0,25mg/mL	118,67±0,01	
	0,125mg/mL	121,92±0,00	
	0,063mg/mL	126,10±0,01	
	0,031mg/mL	126,88±0,01	
HANP+DEX	1mg/mL	93,42±0,04	
	0,5mg/mL	117,12±0,01	
	0,25mg/mL	123,16±0,03	
	0,125mg/mL	129,2±0,00	
	0,063mg/mL	131,06±0,02	
	0,031mg/mL	134,53±0,01	



Şekil 3.8. Hyaluronik asit nanopartikül (HANP), Hyaluronik asit nanopartikül+Deksametazon (HANP+DEX) ilaç yüklü nanopartiküllerinin kondrositler üzerine sitotoksik etkileri.

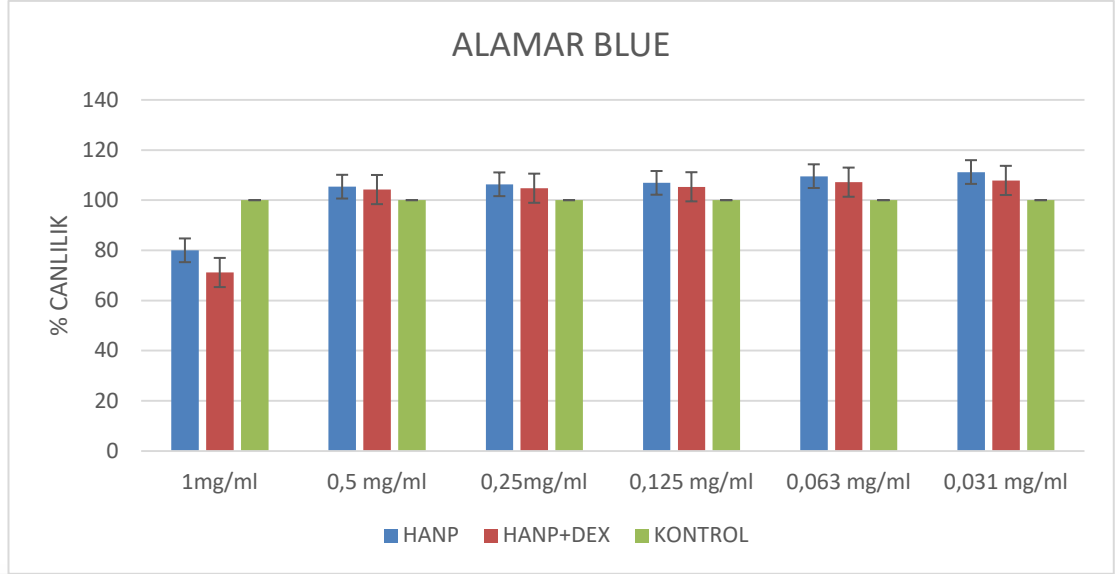
Bu çalışmada 1mg/mL, 0,5mg/mL, 0,25mg/mL, 0,125mg/mL, 0,063mg/mL, 0,031mg/mL derişimlerinde hyaluronik asit, hyaluronik asit+deksametazon yüklü ilaçlı nanopartikül formülasyonlarının kıkırdak hücreleri üzerine uygulanarak sitotoksik etkileri incelenmiştir. Hyaluronik asit nanopartiküllerinin en yüksek doz

olan 1mg/mL de canlılık 108,21 iken hyaluronik asit+deksametazon ilaç yüklü nanopartiküllerin 93,42 olduğu gözlemlenmiştir. Kontrol grubu ile karşılaştırıldığında hyaluronik asit nanopartiküllerinin canlılığı arttırdığı hyaluronik asit+deksametazon yüklü ilaçlı nanopartikül formülasyonunun 1mg/mL konsantrasyonda kontrole göre %7'lik azalış toksisitesinin ihmal edilebilir boyutta olduğu gösterilmiştir.

3.3.2. Alamar Mavisi Boyama Sonuçları

Cizelge 3.2. Hyaluronik asit nanopartikül (HANP), Hyaluronik asit nanopartikül+Deksametazon (HANP+DEX) ilaç yüklü nanopartiküllerinin metabolik aktivite sonuçlarının konsantrasyonlara bağlı % canlılık oranı

	Konsantrasyon	Kıvırdak %Canlılık±Std	Hücreleri
Kontrol	0	100	
HANP	1mg/mL	101,99±0,06	
	0,5mg/mL	105,37±0,02	
	0,25mg/mL	106,32±0,02	
	0,125mg/mL	107,89±0,03	
	0,063mg/mL	109,89±0,02	
	0,031mg/mL	111,21±0,01	
HANP+DEX	1mg/mL	84,14±0,03	
	0,5mg/mL	104,22±0,00	
	0,25mg/mL	108,75±0,01	
	0,125mg/mL	109,32±0,04	
	0,063mg/mL	112,16±0,01	
	0,031mg/mL	115,86±0,02	



Şekil 3.9. Hyaluronik asit nanopartikül (HANP), Hyaluronik asit nanopartikül+Deksametazon (HANP+DEX) ilaç yüklü nanopartiküllerinin metabolik aktivite sonuçlarının konsantrasyonlara bağlı % canlılık oranı

Yapılan deneyler neticesinde; hyaluronik asit nanopartiküllerin canlılığı tüm dozlarda arttırdığı, hyaluronik asit ilaçlı nanopartiküllerin kondrositlerin canlılığını 1mg/mL de %16,86 oranında düşürdüğü uygulanan diğer dozlarda canlılığı kontrol grubuna oranla arttırdığı görülmektedir.

3.3.3. İkili Boyama Sonuçları

İkili boyama ile elde edilen % apoptoz, % nekroz indeksleri çizelge 3.3. ve çizelge 3.4. de verilmiştir. Düşük konsantrasyonlarda nekrotik indeks yüksek değildir, ancak konsantrasyonun artması ile ilk doz olan 1mg/mL de kontrole oranla toksisitede arttığı için nekroz oranında artış gözlenmektedir. Özellikle hyaluronik asit+deksametazon yüklü ilaçlı nanopartiküllerinin kondrositlere uygulandığı örneklerin en yüksek konsantrasyonunda nekrotik indeksin en fazla görülmüş olup yaklaşık %26,15 olarak bulunmuştur.

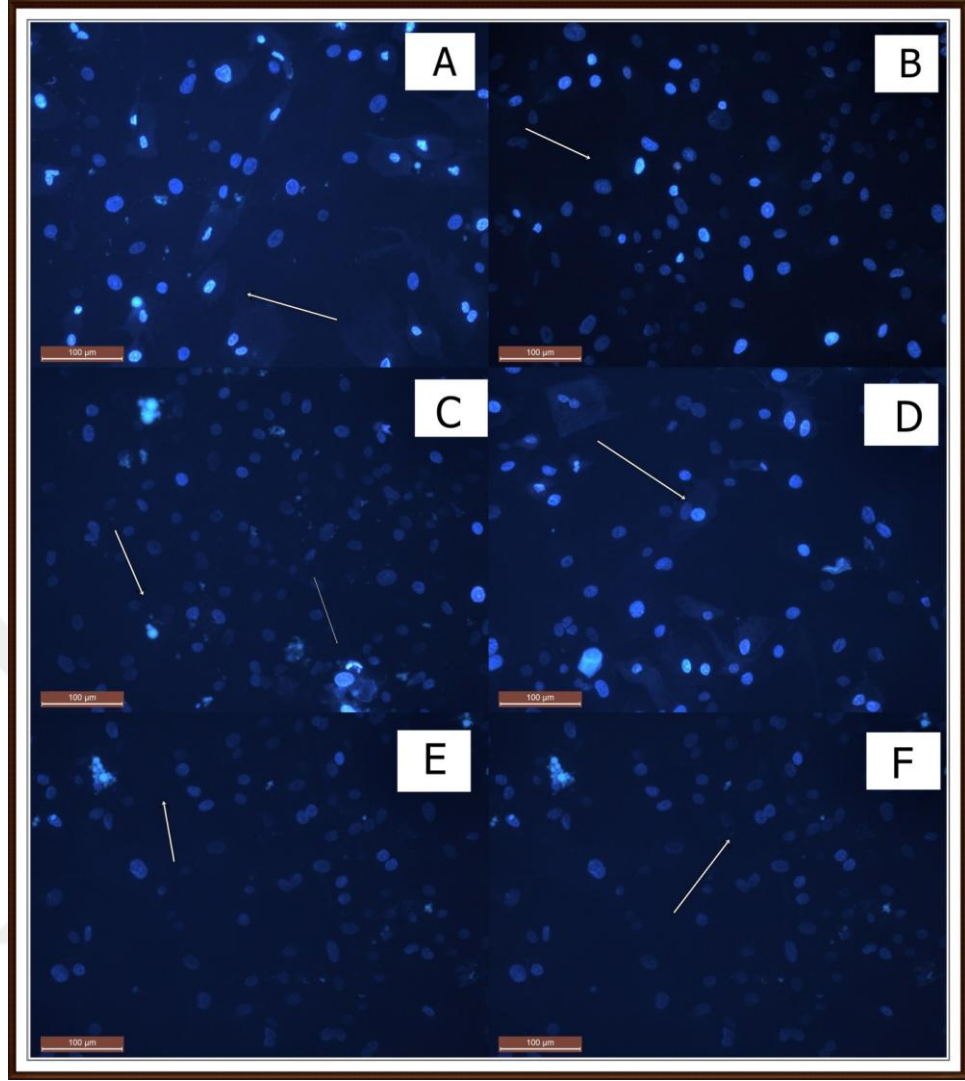
Cizelge 3. 3. Kondrositlere hyaluronik asit nanopartikül ve hyaluronik asit+ deksametazon yüklü ilaçlı nanopartikül uygulamalarının 24 saatlik etkileştirilmeleri sonucu elde edilen apoptotik indeks sonuçları

Konsantrasyon	%Apoptoz	
	HaNp	HaNp+Dex
1mg/mL	9,51±2,08	7,59±1,55
0,5mg/mL	7,01±0,16	5,34±1,60
0,25mg/mL	6,71±1,14	3,27±0,75
0,125mg/mL	2,22±0,84	5,23±1,27
0,0625mg/mL	0	4,61±2,17
0,0313mg/mL	3,57±09	0

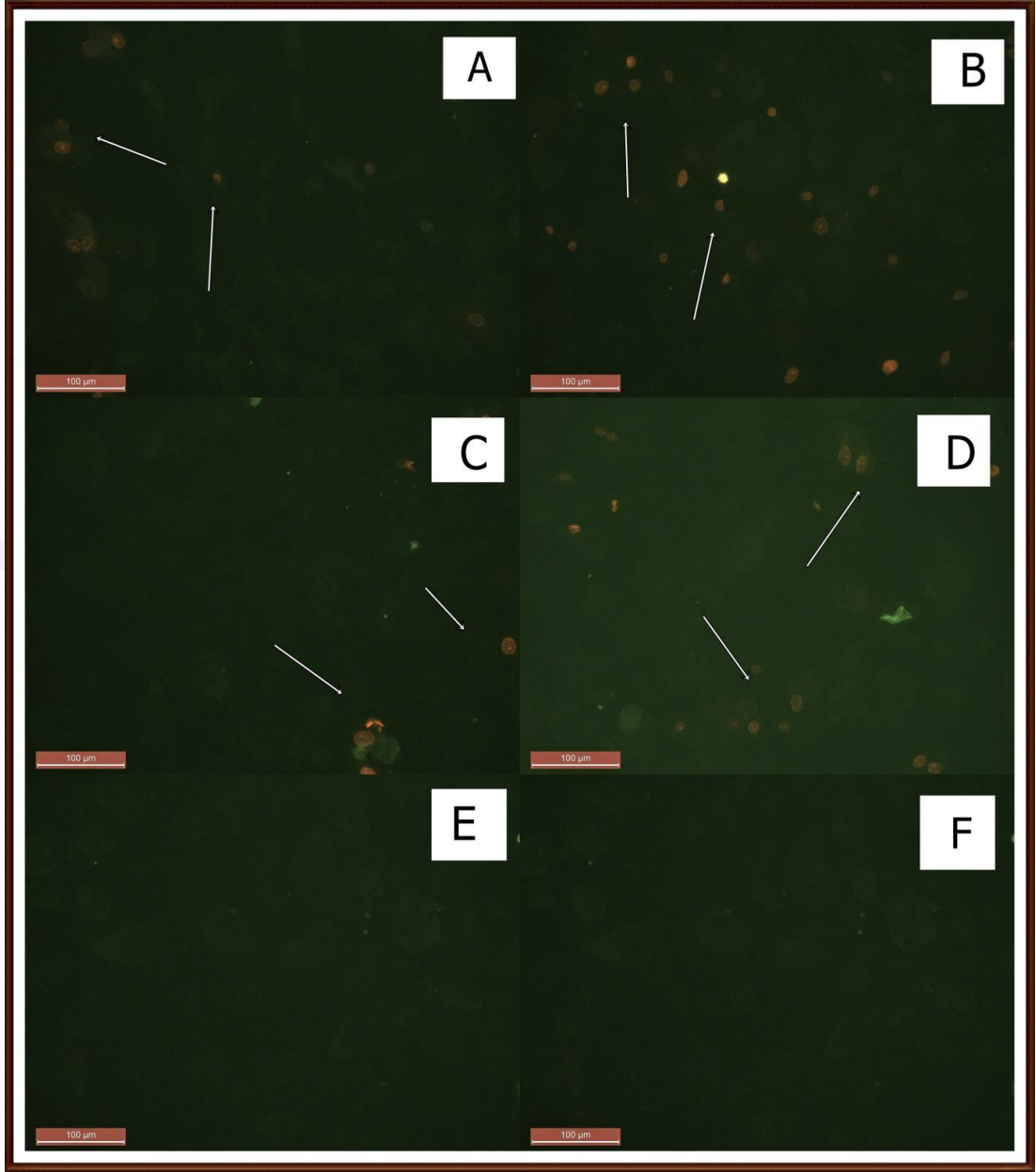
Cizelge 3. 4. Kondrositlere hyaluronik asit nanopartikül ve hyaluronik asit+ deksametazon yüklü ilaçlı nanopartikül uygulamalarının 24 saatlik etkileştirilmeleri sonucu elde edilen nekrotik indeks sonuçları

Konsantrasyon	%Nekroz	
	HaNp	HaNp+Dex
1mg/mL	12,45±0,57	26,15±1,50
0,5mg/mL	9±1,29	20,37±1,03
0,25mg/mL	6,30±1,18	15,45±2,05
0,125mg/mL	5,09±2,17	11,80±1,55
0,0625mg/mL	3,35±1,33	10,62±0,50
0,0313mg/mL	2,07±1,67	8,83±1,18

Çizelge 3.4'den de anlaşılacağı gibi nekrotik indeksin en düşük olduğu konsantrasyon hyaluronik asit nanopartikülün en düşük dozunda %2,07 olarak bulunmuştur. Yapılan sitotoksisite tesiti ve ikili boyama birbirleri ile uyumludur.

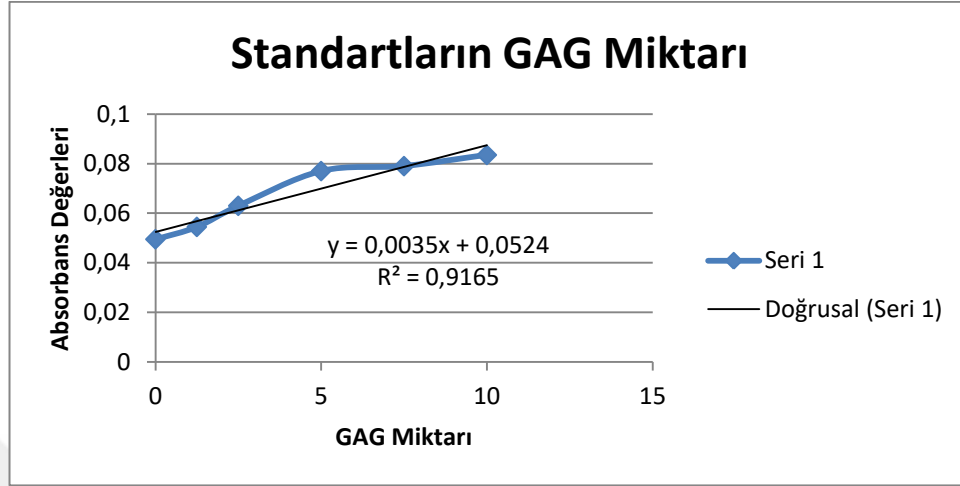


Şekil 3.10. Hoechst 33342 floresan boya kullanılarak yapılan ikili boyamadan elde edilen apoptotik hücre fotoğrafları (A) 1mg/mL hyaluronik asit nanopartikül (B) 1mg/mL hyaluronik asit+ deksametazon ilaçlı nanopartikül formülasyon (C) 0,5mg/mL hyaluronik asit nanopartikül (D) 0,5mg/mL hyaluronik asit+deksametazon ilaçlı nanopartikül formülasyonu (E-F) Kontrol Grubu, Kontrol grubunda bulunan hücreler uygulanan malzemelerle birleştirilmediğinden hücreler apoptoza uğramamış, çekirdek parçalanmamış ve çekirdek sınırları normal görüntüye sahiptir beyaz oklar; apoptotik hücrelerden bazılarını göstermektedir. (Bar=100µm-20X büyütmede Leica DM6000 ile görüntülenmiştir)

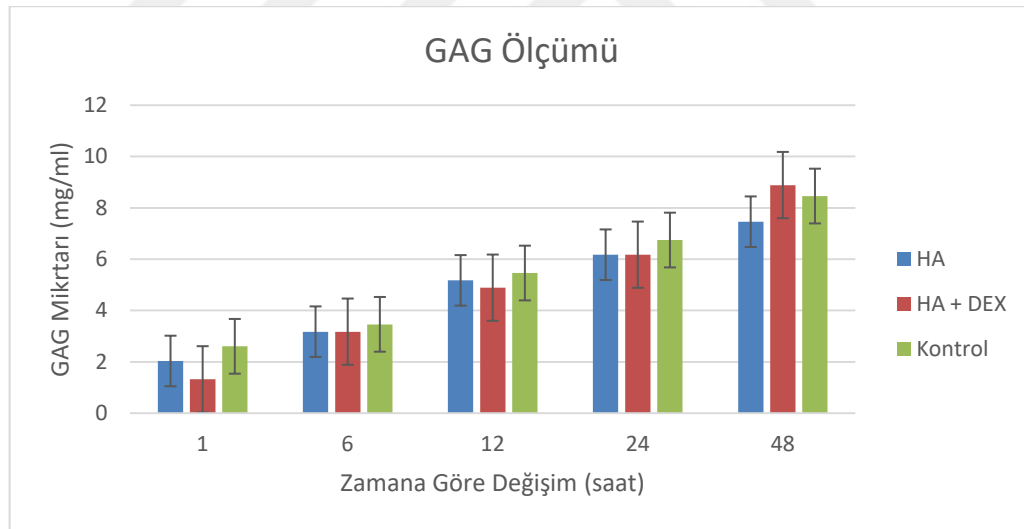


Şekil 3. 11. Hoechst 33342 floresan boya kullanılarak yapılan ikili boyamadan elde edilen nekrotik hücre fotoğrafları(A) 1mg/mL hyaluronik asit nanopartikül (B) 1mg/mL hyaluronik asit+ deksametazon ilaçlı nanopartikül formülasyon (C) 0,5mg/mL hyaluronik asit nanopartikül formülasyonu (D) 0,5mg/mL hyaluronik asit+deksametazon ilaçlı nanopartikül formülasyonu (E-F) Kontrol Grubu beyaz oklar; nekrotik hücrelerden bazılarını göstermektedir (Bar=100μm-20X büyütmede Leica DM6000 ile görüntülenmiştir).

3.3.4. GAG Sonuçları



Şekil 3. 12. Kondroitin sülfat kullanılarak hazırlanan standartların absorbans grafiği

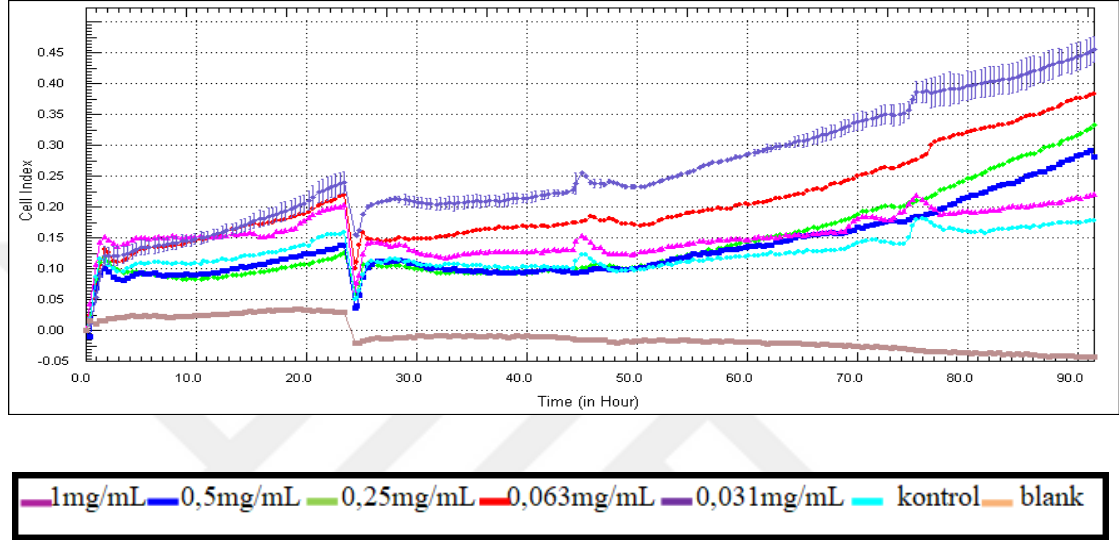


Şekil 3. 13. HANP –HANP+DEX - KONTROL Konsantrasyonlarının GAG miktarı Standart GAG miktarlarının 650 nm’deki absorbans değerlerine karşı çizilen standart grafiği şekil 3.12. ’de verilmiştir.

Hyaluronik asit nanopartikül, hyaluronik asit+deksametazon nanopartikülleri ve kontrol grubu olarak kullandığımız kondrositlerin kültüre edilme süreleri arttıkça, zamanla hücre sayısında artış ve buna bağlı olarak GAG miktarında yükselme olduğu

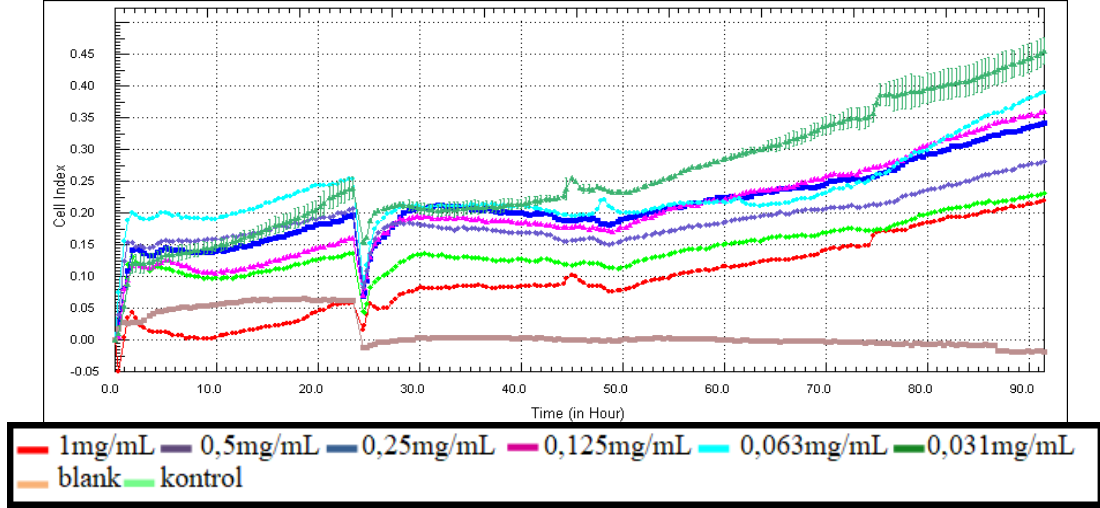
görülmektedir. Sonuçlar genel olarak değerlendirildiğinde kontrole oranla pek bir farklılık gözlemlenmemiştir.

3.3.7. X-CELLigence Sonuçları



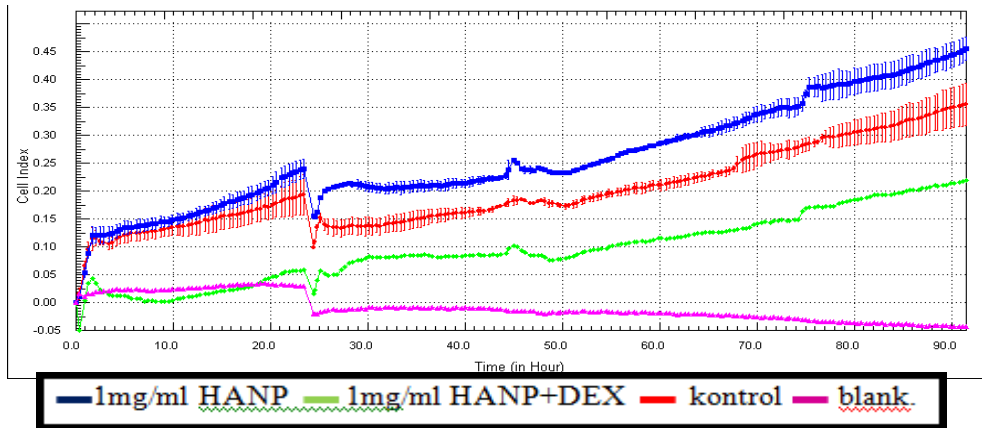
Şekil 3. 14. Farklı konsantrasyonlarda Hyaluronik asit nanopartiküllerinin kıkırdak hücreleri üzerindeki proliferatif etkisi

Yapılan çalışmada; 96 saatlik proliferasyon takibinin sonunda 23. saatin sonuna kadar tüm konsantrasyonlarda hücre sayısında artış gözlemlenmektedir. Farklı konsantrasyonlarda uygulanan hyaluronik asit nanopartiküllerinin kıkırdak hücreleri üzerindeki proliferasyon etkisine bakıldığında kontrol grubuna göre; en yüksek doz olan 1mg/mL'lik konsantrasyonda dahil olmak üzere bütün dozlarda hücre canlılığı indeksinde artış gözlemlenmiştir. WST-1 ve Alamar Blue testi ile X-celligence sonuçları uygunluk göstermektedir. Bu elde edilen sonuçta kullandığımız hyaluronik asitin hücre üzerinde hiçbir sitotoksitesinin olmadığını hücrelerde çoğalmayı arttırdığı ve biyoyumlu olduğunun bir göstergesidir.



Şekil 3.15. Farklı konsantrasyonlarda hyaluronik asit+deksametazon ilaç yüklü nanopartiküllerin kıkırdak hücreleri üzerine proliferatif etkisi

Kondrositlere uygulanan farklı konsantrasyonlardaki hyaluronik asit deksametazon yüklü ilaçlı nanopartikül formülasyonlarının hücre canlılığı üzerine etkileri şekil 3.15' de görülmektedir. Deksametazon miktarı arttıkça hücre canlılığında kontrole göre azalma olduğu gözlenmiştir. 1 mg/mL deksametazonun hücreler üzerindeki canlılık etkisi % 71,14 olarak belirlenmiştir. Doz ayarlaması yaparak düşük dozlarda canlılık kontrolden yüksek çıkmaktadır.

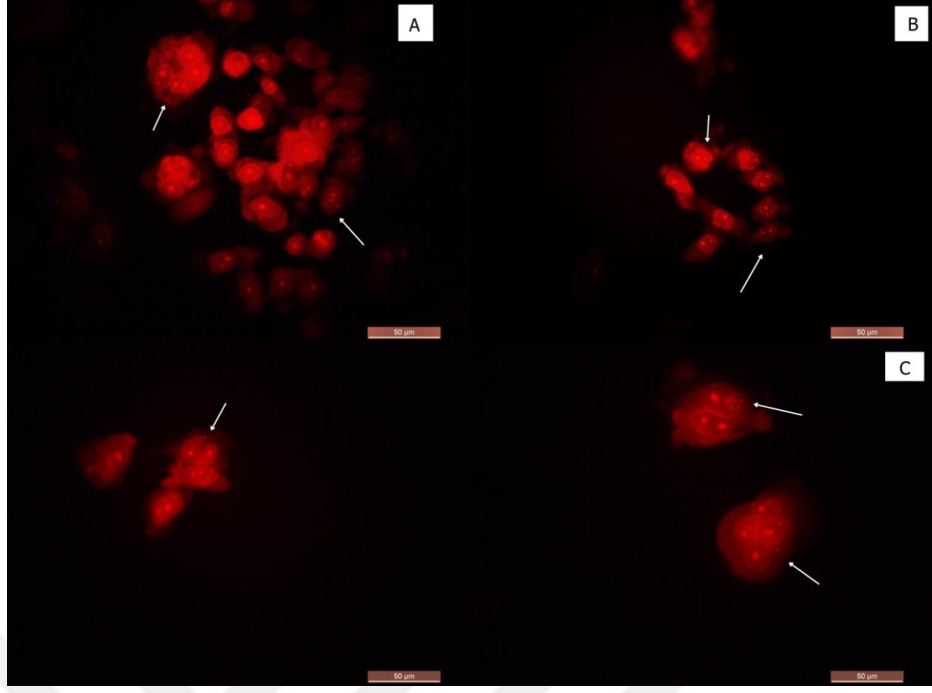


Şekil 3. 16. Hyaluronik asit nanopartikül ve hyaluronik asit deksametazon ilaç yüklü nanopartiküllerin 1mg/mL konsantrasyonunun kıkırdak hücreleri üzerinde proliferatif etkisi

Uygulan 1mg/mL konsantrasyonlarındaki hyaluronik asit, hyaluronik asit deksametazon ilaç yüklü nanopartikül formülasyonunun kontrol grubuna göre; saf hyaluronik asit nanopartiküllerinin canlılığı arttırdığı gözlenirken, hyaluronik asit deksametazon ilaç yüklü nanopartiküllerinin ise kontrole göre proliferasyonu azalttığı gözlemlenmiştir.

3.3.8. Genotoksisite (Mikronükleus Testi) Sonuçları

Hazırlanan preparatlarda 1000 binükleer hücre incelendi ve bu binükleer hücre içerisinde mikronükleuslu olanlar saptandı. 72 saatlik *in vitro* değerlendirme sonucu elde edilen veriler Spss 15 ile Varyans Analizi (ANOVA) ve Duncan testleri uygulanarak belirlenmiştir. Mikronükleus testinde kontrol ve deney gruplarından 1000' er hücre sayılmıştır. ANOVA-varyans analizine göre ; $P= 0,1000 > 0.05$ olduğundan % 95 güvenle gruplar arasında mikronükleuslu hücreler bakımından fark yoktur. Test materyallerinin genotoksik etkisinin olmadığı gözlenmiştir.



Şekil 3. 17. A) 1mg/mL konsantrasyonda uygulanmış hyaluronik asit nanopartikülleri, B) 1mg/mL konsantrasyonda uygulanmış hyaluronik asit deksametazon nanopartikülleri, C) etymethanosulfonate uyulanmış pozitif kontrol beyaz oklar; binükleuslu hücrelerden bazılarını göstermektedir (Bar=100µm-20X büyütmede Leica DM6000 ile görüntülenmiştir)

Hyaluronik asit nanopartikülleri ve hyaluronik asit deksametazon ilaçlı formülasyonlarının uygulanan 1mg/ml konsantrasyonda mikronükleuslu hücrelere rastlanmamıştır. Uygulanan dozlarda genotoksik etkisinin olmadığı gözlemlenmiştir.

4. TARTIŞMA VE SONUÇ

Kondrositler; kıkırdak matriksi içinde lakün adı verilen küçük boşluklarda tek tek veya izogen gruplar halinde yerleşmişlerdir. Çapları 10-20µm arasında olup, bölünme yetenekleri sınırlılık göstermektedir. Bu hücreler ilk defa Chesterman ve Smith tarafından 1968 yılında izole edilerek kültürde çoğaltılmışlardır (Chesterman ve Smith 1968). Kondrositler hücre kültürü ile bölünme yeteneği kazanırlar ve kollajen tip II yerine zamanla fibroblast benzeri yapıya dönüştükleri için tip I sentezlemeye başlarlar. Kıkırdak hücrelerinin hasarlı olan bölgeye aktarımı gerçekleşmeden önce kondrojenik potansiyellerini geri kazanabilmeleri gerekmektedir. Kondrositlerin kültür işlemi, iki-boyutlu olarak yürütüldüğünde hücrelerin dediferansiye olarak kendi fenotipik özelliklerini kaybettikleri ancak üç-boyutlu ortamlara alındığında yani biyoreaktörlerde yürütülen kültürlerde veya polimerik destek materyalleri üzerinde, kıkırdak hücrelerinin iki boyutlu ortamda olduğu gibi dediferansiye olmadıkları ve kendi işlevlerine devam edebildikleri belirlenmiştir (Temenoff ve Mikos 2000, Demarteau ve ark. 2003). Bu çalışmada kıkırdak metabolizmasında önemli olan hyaluronik asit ile deksametazonun *in vitro* ortamda kondrositler üzerinde etkisini araştırdık.

Hyaluronik asit temel olarak ekstraselüler matriks, deri, vitröz sıvı, kıkırdak ve göbek kordonu, deri altı dokuları, dermal tabakalarının interselüler matriksinde ve kıkırdak gibi gelişen özelleşmiş dokularda bulunmaktadır. Hyaluronik asit *in vitro* ortamda kondrositler veya kıkırdak matriksi üzerinde olumlu etkiye sahip olup (Larsen ve ark. 1992) proteoglikan sentezini artırırken, matriks bileşenlerindeki azalmayı önlediği yapılan çalışmalarda gösterilmiştir (Fukuda ve ark. 1996). Ayrıca; hücre motilitesi ve hücre adezyonunun düzenlenmesi, dokulara mekanik özellikler kazandırılması, hücre farklılaşması ve proliferasyonunun manipülasyonu gibi vücutta birçok önemli biyolojik fonksiyona dâhildir. Günümüzde hyaluronik asit tıp alanında anti-ödematöz ve anti-inflamatuar özelliklerinden dolayı dermatoloji (estetik olarak geçici deri doldurucusu), oftalmoloji (katarakt cerrahisi), romatoloji (romatoid artrit), ortopedi (diz osteoartriti) ve dallarında sıklıkla kullanılmaktadır (Aslan ve ark. 2006). Hyaluronik asitin sinoviyal hücre ve kondrositler tarafından sentezi

uyarılabilir. Ayrıca hyaluronik asitin kondrosit büyümesini uyardığı ve kıkırdak doku bozunmasını inhibe edebildiğini gösteren başka çalışmalarda bulunmaktadır (Smith ve Ghosh 1987, TAKAHASHI ve ark. 1999, Moreland 2003). Yamen ve ark. (2005) yaptıkları çalışmada sıçan artiküler kıkırdak hücrelerini kullanmış ve hyaluronik asitin, hücre adezyonu ve çoğalması üzerine pozitif bir etkiye sahip olduğunu göstermişlerdir (Yamane ve ark. 2005). Kang JY ve ark'nın (2008) yaptıkları bir çalışmada tavşan primer kondrositleri ve insan kondrosit hücre hattı hyaluronik asit skaffold yapısı içerisinde kültüre edilmiş, yapılan analizlerle her iki kondrosit hücre tipinin de hyaluronik asit iskelet içerisinde proliferere oldukları belirtilmiştir (Kang ve ark. 2009). Beck E.C.'nin (2008) yapmış olduğu bir çalışmada hyaluronik asit nanopartikülleri ile yüklenmiş metakrilatlanmış hyaluronik asit hidrojelini içerisine kemik iliğinden elde edilmiş mezenkimal kök hücreleri enkapsüle edilmiş ve sonrasında hem *in-vitro* hem *in-vivo* analizlerle hücrelerin hayatta kaldıkları gösterilmiştir (Beck 2015). Kawasakı ve ark. (1999) yapmış oldukları çalışmada kolajen jelinde HA ile tedavi edilen kondrositlerin fenotiplerini muhafaza ederken çok fazla çoğaldığını göstermiştir. 4 hafta boyunca çeşitli dozlarda hyaluronik asit ile kültüre edilmiş kondrositlerin kontrol grubuna göre canlılık oranında 1.5 kat fazla artış sağladığını ve 0.01 ve 0.1 mg/mL HA ile tedavi edilen gruplarda kondroitin 6 sülfat sentezi, 0.1 ve 1.0 mg/mL HA ile tedavi edilen gruplarda jel birikim oranları diğer gruplara göre anlamlı derecede yüksek değerler vermiştir. Kollajen jel kültüründe HA, fenotiplerini korurken kondrositlerin proliferasyonunu ve kondroitin 6 sülfat sentezini arttırdığı gösterilmiştir (Kawasaki ve ark. 1999). Bizim bu çalışmamızda *in vitro* ortamda kıkırdak metabolizmasında önemli rol oynayan hyaluronik asitin kondrositler üzerinde 1mg/mL, 0,5mg/mL, 0,25mg/mL, 0,125mg/mL, 0,063mg/mL, 0,0312mg/mL gibi farklı konsantrasyonlarda uygulanmış olup kondrositlere uyguladığımız çalışmalarda (WST-1, Alamar blue, X-celligence, ikili boyama) kondrositlerin proliferasyonunu ve hücre sayısını arttırdığına dair benzer sonuçlar aldık Deksametazonun inflamatuvar etkiye sahip olduğu çalışmalarda gösterilsede, hyaluronik asit tedavisinin anti-inflamatuvar etkilerinden bahsedilen çeşitli çalışmalar olmakla birlikte araştırmacılar hyaluronik asitin anti-inflamatuvar etkisinin steroidlere göre

daha geç başlayıp daha uzun sürdüğünü iddia etmektedirler (Dixon, Jacoby et al. 1988, Pietrogrande, Melanotte et al. 1991).

Sentetik bir adrenokortikal steroid olan deksametazon; şiddetli inflamatuvar patolojilerde kullanılan, antiinflamatuvar ve potent immünsüpresif etkisi sentetik glukokortikoidler içinde en yüksek etkiye sahip olanıdır. Deksametazonun çeşitli dokularda olumlu anti inflamatuvar etkiye sahip olduğu çalışmalar mevcuttur (Sellner ve ark. 2017, Soiberman ve ark. 2017). Eklem içi enfeksiyonları için deksametazon kullanılmakta olup kondrosit metabolizması üzerinde birtakım farklı etkilerinin olacağı, kıkırdak doku iyileşmesinde anti inflamatuvar etki gösterdiği literatürlerde mevcuttur. Lu YC S. ve ark. (2011) yaptıkları çalışmada kıkırdak dokusunda hasarlanmalara bağlı olarak oluşan GAG kaybı ve inflamavatuvar etki kaynaklı hücresele biyolojik materyal sentezi düşüşü üzerine deksametazon kullanımının etkisine bakılmış, elde ettikleri sonuçlara göre deksametazon TNf alfa gibi antiinflamatuvar etkenlerin inhibisyonunu sağladığı ve GAG kaybını azalttığı belirtilmiştir (Lu ve ark. 2011). Yapılan başka bir çalışmada Huebner ve ark. (2014) deksametazonun travma sonrası eklem iltihaplanması ve eklem doku bozulmasını azalttığını göstermiştir (Huebner ve ark. 2014). Deksametazon genelde eklem inflamasyonlarında tedavi amaçlı kullanılır. Ancak daha uzun süre tekrarlanan kullanım sonrasında veya yüksek miktarlarda ayarlanarak bu çalışmalara devam edilirse kondrosit metabolizması üzerinde bu sitotoksik olarak değerlendirilebilecek ya da ihmal edilebilir düzeyde olumsuz etki göstereceğine dair birtakım çalışmalar mevcuttur (Xue ve ark. 2015). Yan Zhao ve ark. (2014) yaptığı bir çalışmada 1-100 uM dozlarda deksametazon (Dex) ATDC5 kondrosit hücre hattına uygulamış. En yüksek Dex dozda (100 uM) ile uyarılan ATDC5 hücre hattında otofajiyi uyararak ATDC5 kondrosit hücre canlılığını azaltır sonucuna vardıklarını belirtmişlerdir (Zhao ve ark. 2014). Bu çalışmada hyaluronik asit+deksametazon yüklü ilaçlı nanopartikül formülasyonlarının kondrositler üzerine sitotoksik etkileri incelenmiştir. 1mg/mL, 0,5mg/mL, 0,25mg/mL, 0,125mg/mL, 0,063mg/mL, 0,031mg/mL konsantrasyonlarında kıkırdak hücrelerine uygulanmış olup en yüksek dozda(1mg/mL) canlılığı kontrole göre azalttığı ancak bu azalışın ihmal edilebilir boyutta olduğu, diğer konsantrasyonlarda ise canlılığı kontrole göre yükselttiği

gözlemlenmiştir. Doz dahada arttırılırsa canlılığın dahada düşeceği sitotoksik olabileceği düşünülmektedir. Bu nedenle deksametazonun dozunun yüksek kullanılması ile olması muhtemel olumsuz etkilerini hyaluronik asit ile birlikte kullanarak nötrleştirmeyi varsa hyaluronik asitin pozitif etkilerinin sinerjetik etki oluşturmasını ve bir arada kullanarak anti-inflamatuvar etkiyi kırıldak doku hasarında kondrositlere olumsuz bir etkiye sebep olan anti inflamatuvar etkiyi arttırmaya katkı sağlayacağı düşünülmektedir.

Sonuç olarak hyaluronik asit ve hyaluronik asitten salınan deksametazonun 1mg/mL 0,5mg/mL, 0,25mg/mL, 0,125mg/mL, 0,063mg/mL, 0,0312mg/mL konsantrasyonlarda kırıldak hücreleri üzerinde olumsuz etkisinin görülmediği, hyaluronik asitin olumlu etki olarak *in vitro* proliferasyonu sağlayarak Glikozaminoglikan, Alamar mavisi, WST-1, Genotoksisite, X-celligence sonuçlarında hiçbir toksik etki göstermediği gözlemlenmiştir. Dolayısı ile deksametazonun dozları planlanarak ve söz konusu şartları dahada optimize ederek *in vivo* çalışmalara geçilmelidir. Bu çalışmada ilave *in vitro* testlere ihtiyaç duyulduğu için *in vivo* çalışmalara geçilememiştir.

KAYNAKLAR

- AKAY M T (2006) Genel histoloji 4. baskı, Palme Yayıncılık, Ankara, s 72-100.
- ALFORD J W, Cole B J (2005) Cartilage restoration, part 1: basic science, historical perspective, patient evaluation, and treatment option, *The American Journal of Sports Medicine*, 33, 295-306.
- ANGEL M J, RAZZANO P S, GRANDE D A (2003) Defining the challenge: the basic science of articular cartilage repair and response to injury. *Sports Medicine and Arthroscopy Review*, 11, 168-181.
- ANUSAKSATHIEN O, GIANNOBILE W V (2002) Growth factor delivery to re-engineer periodontal tissues. *Current Pharmaceutical Biotechnology*, 3, 129-139.
- ARIKANOĞLU A (2013) Eklem kıkırdaktaki baskı etkisinin lazer taramalı konfokal mikroskop ile incelenmesi, Mehmet Akif Ersoy Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü.
- ASAWA Y, OGASAWARA T, TAKAHASHI T, YAMAOKA H, NISHIZAWA S, MATSUDAIRA K, MORI Y, TAKATO T, (2008) Aptitude of auricular and nasoseptal chondrocytes cultured under a monolayer or three-dimensional condition for cartilage tissue engineering. *Tissue Engineering Part A* 15, 1109-1118.
- ASLAN M, ŞİMŞEK G, DAYI E (2006) The effect of hyaluronic acid-supplemented bone graft in bone healing: experimental study in rabbits. *Journal of Biomaterials Applications*, 20(3): 209-220.
- ATAMAN E T (2014) Bone Morfojenetik Protein-6 Ve İnsülin Benzeri Büyüme Faktörü-I'in Kontrollü Ardışık Salımının Sementoblast Hücreleri Üzerine Etkileri.Yüksek Lisans Tezi. Hacettepe Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü.
- BALAZS E A, DENLINGER J L (1993) Viscosupplementation: a new concept in the treatment of osteoarthritis. *The Journal of Rheumatology, Supplement*, 39, 3-9.
- BALTA S (2013) Kıkırdak greft resorpsiyonunun doksisisiklin kullanımı ile azaltılması. Yüksek Lisans Tezi.Trakya Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü.
- BECK E (2015) Development of Chondroinductive Hydrogel Pastes from Naturally Derived Cartilage Matrix. .B.S Thesis. University of Kansas Biological and Agricultural Engineering.
- BERIS A E, LYKISSAS M G,PAPAGEORGIOU C D, GEORGOULIS A D (2005) Advances in articular cartilage repair. *Injury*, 36, 14-S23.

- BINGÖL S A, DEPREM S, TAŞCI T, KORAL S, KOCAMIŞ H (2011) Immunohistochemical localization of catalase in geese (*Anser anser*) liver. *Kafkas Univ Vet Fak Derg*, 17, 77-81.
- BIRINCI B, ÖZTÜRK A M, TABAK A Y, ARTEKİN C N, KORKUSUZ P, KORKUSUZ F (2008) Prostaglandin E2 and hyaluronic acid facilitates treatment of osteochondral defects. *Joint Diseases and Related Surgery*, 19, 78-83.
- BORA F W, BEDNAR J M, OSTERMAN A L, BROWN M L, SUMNER A J (1987) Prosthetic nerve grafts: a resorbable tube as an alternative to autogenous nerve grafting. *The journal of hand surgery*, 12, 685-692.
- BROWN M B, JONES S A (2005) Hyaluronic acid: a unique topical vehicle for the localized delivery of drugs to the skin. *Journal of the European Academy of Dermatology and Venereology*, 19, 308-318.
- BROWNE J E, BRANCH T P (2000) Surgical alternatives for treatment of articular cartilage lesions. *Journal of the American Academy of Orthopaedic Surgeons*, 8, 180-189.
- BUCKWALTER J A (1983) Proteoglycan structure in calcifying cartilage. *Clinical Orthopaedics and Related Research*, 172, 207-232.
- BUCKWALTER J, MANKIN H. (1998) Articular cartilage: tissue design and chondrocyte-matrix interactions. *Instructional Course Lectures*, 47, 477-486.
- BUCKWALTER J, MANKI H (1997) Articular cartilage: Part II. *Journal of Bone and Joint Surgery*, 79, 612.
- BUCKWALTER J, MANKIN H (1997) Instructional Course Lectures, The American Academy of Orthopaedic Surgeons-Articular Cartilage. Part I: Tissue Design and Chondrocyte-Matrix Interactions. *The Journal of Bone Joint Surgery*, 79, 600-611.
- BUCKWALTER J, MANKIN H (1998) Articular cartilage: degeneration and osteoarthritis, repair, regeneration, and transplantation. *Instructional Course Lectures*, 47, 487-504.
- CARNEIRO J, LONG J A (1986) Basic histology, Appleton & Lange, US.
- CASSIÈDE P, DENNIS J E, MA F, CAPLAN A I (1996) Osteochondrogenic potential of marrow mesenchymal progenitor cells exposed to TGF- β 1 or PDGF-BB as assayed in vivo and in vitro. *Journal of Bone and Mineral Research*, 11, 1264-1273.
- CHEN Z., WANG P W, WEI B, MO X M, CUI F Z (2010) Electrospun collagen-chitosan nanofiber: A biomimetic extracellular matrix for endothelial cell and smooth muscle cell. *Acta Biomaterialia*, 6, 372-382.

- CHESTERMAN P, SMITH A U (1968) Homotransplantation of articular cartilage and isolated chondrocytes. *Bone & Joint Journal*, 50,184-197.
- CHOLKAR K, HARIHARAN S, GUNA S, MİTRA A S (2014) Optimization of dexamethasone mixed nanomicellar formulation. *AAPS PharmSciTech*, 15, 1454-1467.
- CRISTINO S, PIACANTİ A, MANFERDİNİ C, CODELUPPI K, GRASSİ F, FACCHİNİ A, LİSİGNOLİ G (2008) Expression of CXC chemokines and their receptors is modulated during chondrogenic differentiation of human mesenchymal stem cells grown in three-dimensional scaffold: evidence in native cartilage. *Tissue Engineering Part A*, 14, 97-105.
- CUEVAS P, BURGOS J, BAIRD A (1988) Basic fibroblast growth factor (FGF) promotes cartilage repair in vivo. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 156, 611-618.
- DANIAL N N, KORSMEYER S J (2004) Cell death: critical control points. *Cell*, 116,205-219.
- DEMARTEAU O, WENDT D, BARACCİNİ A, JAKOB M, SCHAFFER D, HEBERER M, MARTİN I (2003) Dynamic compression of cartilage constructs engineered from expanded human articular chondrocytes. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 310,580-588.
- DEMİR D (2013) Dosetaksel İçeren Nanopartiküllerin Formülasyonu ve in Vitro Değerlendirilmesi. Yüksek Lisans Tezi. Hacettepe Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü .
- DESAI M P, LABHASETWAR V, WALTER E, LEVY R J, AMİDON G L (1997) The mechanism of uptake of biodegradable microparticles in Caco-2 cells is size dependent. *Pharmaceutical Research* ,14, 1568-1573.
- DIXON A S J, JAKOBY R K, BERRY H, HAMILTON E B D (1988) Clinical trial of intra-articular injection of sodium hyaluronate in patients with osteoarthritis of the knee.. *Current Medical Research and Opinion*, 11, 205-213.
- DORAL M N, DÖNMEZ G, ATAY Ö A, BOZKURT M, LEBLEBİCİOĞLU G, ÜZÜMCÜGİL A, AYDOĞ T (2007) Dejeneratif Eklem Hastalıkları, *TOTBİD*, 6, 56-65.
- ELSAYE N M, GORBUNOV N V, KAGAN V L (1997) A proposed biochemical mechanism involving hemoglobin for blast overpressure-induced injury. *Toxicology*,121,81-90.
- EMİN N (2003) İzole Edilmiş Siçan Kondrositleri ve Polimerik Biyomalzemelerin Kullanımıyla Kikirdak Doku Mühendisliği. Yüksek Lisans Tezi. Ankara Üniversitesi Biyoteknoloji Enstitüsü.
- EMRE T Y, EGE T, ÇİFT T H, DEMİRCİOĞLU D T, SEYHAN B, UZUN M (2012) Open mosaicplasty in osteochondral lesions of the talus: a prospective study. *The Journal of Foot and Ankle Surgery*, 51, 556-560.

- ENGEL E, MÍCHÍARDÍ A, NAVARRO M, LACROÏX D, PLANELL D J(2008) Nanotechnology in regenerative medicine: the materials side. *Trends in Biotechnology*, 26, 39-47.
- FARMER S F, HARRISON M LINGRAM A D, STEPHENS A J (1991) Plasticity of central motor pathways in children with hemiplegic cerebral palsy. *Neurology*, 41, 1505-1505.
- FENECH M, MORLEY A A (1985) Measurement of micronuclei in lymphocytes. *Mutation Research/Environmental Mutagenesis and Related Subjects* 147, 29-36.
- FINGER S, ALMLI C R (1985) Brain damage and neuroplasticity: mechanisms of recovery or development?" *Brain Research Reviews*, 10, 177-186.
- FLIK K R, VERMA N, BACH BR (2007) Articular cartilage. *Cartilage repair strategies*, 1-12.
- FOROUZANDEH A, HESARAKÍ S (2014) The releasing behavior and in vitro osteoinductive evaluations of dexamethasone-loaded porous calcium phosphate cements. *Ceramics International*, 40, 1081-1091.
- FREEMONT A J, HOYLAND J (2006) Lineage plasticity and cell biology of fibrocartilage and hyaline cartilage: its significance in cartilage repair and replacement. *European Journal of Radiology* 57, 32-36.
- FUENTE M, SEÍJO B, ALONSO MJ (2008) Novel hyaluronic acid-chitosan nanoparticles for ocular gene therapy. *Investigative Ophthalmology & Visual Science*, 49, 2016-2024.
- FUKUDA K, DAN H, TAKAYAMA M, KUMANO F, SAÍTOH M, TANAKA S (1996). "Hyaluronic acid increases proteoglycan synthesis in bovine articular cartilage in the presence of interleukin-1. *Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics*, 277, 1672-1675.
- FURUKAWA K S, HÍDEYUKÍ S, KENSHÍ T, AKÍKO N, JUNZO T, YASUYUKÍ S, TETSUYA T (2003) Rapid and large-scale formation of chondrocyte aggregates by rotational culture. *Cell transplantation*, 12, 475-479.
- GANAN Y, MACÍAS D, DUTERQUE M, ROS MA, HURLE J M (1996) Role of TGF beta s and BMPs as signals controlling the position of the digits and the areas of interdigital cell death in the developing chick limb autopod. *Development*, 122, 2349-2357.
- GARCIA-GARCIA E, ANDRIÉUX K, GÍL S, COUVREUR P (2005) Colloidal carriers and blood-brain barrier (BBB) translocation: a way to deliver drugs to the brain? *International Journal of Pharmaceutics*, 298, 274-292.
- GARTNER L P, HIATT J L (2006). Color Textbook of Histology E-Book, Elsevier Health Sciences. Ed. LP GARTNER, JL HIATT, p:40-100.
- GRAY'S Anatomy E-Book: The Anatomical Basis of Clinical Practice, Elsevier Health Sciences.

- HALEEM A M, CHU C. R (2010) Advances in tissue engineering techniques for articular cartilage repair. *Operative Techniques in Orthopaedics*, 20, 76-89.
- HAN Z (2009) Sigara dumanının tavşan kulak kıkırdak grefti canlılık ve bütünlüğüne etkisi. Yüksek Lisans Tezi. İnönü Üniversitesi. Sağlık Bilimleri Enstitüsü.
- HAVERKAMP R, Marshall A (2009) The mechanism of metal nanoparticle formation in plants: limits on accumulation. *Journal of Nanoparticle Research*, 11, 1453-1463.
- HEDDLE JA, CİMİNO MC, HAYASHİ M, ROMAQNA F, SHELBY MD, TUCKER JD, VANPARYS P, MACGREGOR JT (1991) Micronuclei as an index of cytogenetic damage: past, present, and future. *Environmental And Molecular Mutagenesis*, 18, 277-291.
- HENG B C, HAİDER H, SİM E, CAO T, (2004) Strategies for directing the differentiation of stem cells into the cardiomyogenic lineage in vitro. *Cardiovascular research*, 62, 34-42.
- HOLLAND T A, MIKOS A G (2003) Advances in drug delivery for articular cartilage. *Journal of Controlled Release*, 86, 1-14.
- HUCKLE J, DOOTSON G, MEDCALF N, MCTAGGART S, WRİGHT E, CARTER A, KİRBY B, STEVENSON S, RİLEY S, DAVİSSON T, RATCLİFFLE A (2003) Differentiated chondrocytes for cartilage tissue engineering. *Novartis Foundation Symposium*, 249:103-12
- HUEBNER K D, SHRİVE N G, FRANK C B (2014) Dexamethasone inhibits inflammation and cartilage damage in a new model of post-traumatic osteoarthritis. *Journal of Orthopaedic Research*, 32, 566-572.
- HUNTER W (1995) Of the Structure and Disease of Articulating Cartilages. *Clinical Orthopaedics and Related Research*, 317, 3-6.
- HUNZIKER E B (1994) Mechanism of longitudinal bone growth and its regulation by growth plate chondrocytes. *Microscopy Research and Technique*, 28, 505-519.
- IKADA Y (2006) Challenges in tissue engineering. *Journal of the Royal Society Interface*, 3, 589-601.
- JAYANT R SRIVASTAVA R (2007) Dexamethasone release from uniform sized nanoengineered alginate microspheres. *Journal of Biomedical Nanotechnology*, 3, 245-253.
- JURVELIN J, KİVİRANTA I, SAAMANEN A M, TAMMİ M, HELMİNEN H J (1989) Partial restoration of immobilization-induced softening of canine articular cartilage after remobilization of the knee (stifle) joint. *Journal of Orthopaedic Research*, 7, 352-358.
- KAHVECİ OK (2010) İntratimpanik Tedaviler. *Eur Arch Otorhinolaryngol*, 267, 701–707.

- KANG J Y, CHUNG C W, SUNG J H, PARK B S, CHOİ J Y, LEE S J, CHOİ B C, SHİM C K, CHUNG S J, KİM D D (2009) Novel porous matrix of hyaluronic acid for the three-dimensional culture of chondrocytes. *International Journal of Pharmaceutics* 369, 114-120.
- KARAHAN M (2009) Metal İçeren Fonksiyonel Biyopolimer Sistemlerin Geliřtirilmesi. Yüksek Lisans Tezi. Yıldız Teknik Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü.
- KAŞ S (2002) İlaç Taşıyıcı Partüküler Sistemler Ed. A GÜRSOY Kontrollü Salım Sistemleri. Kontrollü Salım Sistemleri Derneđi Yayınları, İstanbul, 273-290.
- KAWASAKI K, OCHİ M, UCHİO Y, ADACHİ N, MATSUSAKİ M (1999) Hyaluronic acid enhances proliferation and chondroitin sulfate synthesis in cultured chondrocytes embedded in collagen gels. *Journal of Cellular Physiology*, 179, 142-148.
- KENDALL D (1947) The aetiology, diagnosis, and treatment of prolapsed intervertebral disk, with a review of 300 cases of sciatica. *An International Journal of Medicine*, 16, 157-179.
- KIERSZENBAUM A L, TRES L (2015) Histology and Cell Biology: An Introduction to Pathology, 4rd, New York, chapter 3.
- KILIOĐLU S S (2002) Mikroskobi düzeyinde kırık iyileşmesi. *Ankara Üniversitesi Tıp Fakültesi Mecmuası* 55, 22-34.
- KIM M., KİM SE, KANG SS, TAE G (2011) The use of de-differentiated chondrocytes delivered by a heparin-based hydrogel to regenerate cartilage in partial-thickness defects. *Biomaterials*, 32, 7883-7896.
- KINGSLEY D M. (1994) The TGF-beta superfamily: new members, new receptors, and new genetic tests of function in different organisms. *Genes & Development*, 8, 133-146.
- KOGAN G, SOLTES L, STERN R, GEMEİNER P (2007) Hyaluronic acid: a natural biopolymer with a broad range of biomedical and industrial applications. *Biotechnology Letters*, 29, 17-25.
- KORKUSUZ F, ŐENKÖYLÜ A (2004) Kıkırdak doku mühendisliği. *TODBİD*, 3, 3-4.
- KREUTER J (2001) Nanoparticulate systems for brain delivery of drugs. *Advanced Drug Delivery Reviews* 47, 65-81.
- KUMARI A, YADAV SK, YADAV SC (2010) Biodegradable polymeric nanoparticles based drug delivery systems. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*, 75, 1-18.
- LANG J D, MCARDLE PJ, MATALON S (2002) Oxidant-antioxidant balance in acute lung injury. *Chest Journal*, 122, 314-320.

- LARSEN N E, LOMBARD KM, PARENT EG, BALAZS EA (1992) Effect of hylan on cartilage and chondrocyte cultures. *Journal of Orthopaedic Research*, 10,23-32.
- LEE S J (2000) Cytokine delivery and tissue engineering. *Yonsei Medical Journal* ,41,704-719.
- LEGNANI C, VENTURA A, TERZAGHÌ C, BORGIO E, ALBÌSETTÌ W, (2010) Anterior cruciate ligament reconstruction with synthetic grafts. A review of literature. *International Orthopaedics*, 34, 465-471.
- LEXER E (1908) Substitution of whole or half joints from freshly amputated extremities by free plastic operation. *Surgery Gynecology Obstetrics*, 6, 601-607.
- LI W Y, XU L N, CHEN J (2005) Co₃O₄ nanomaterials in lithium-ion batteries and gas sensors. *Advanced Functional Materials*, 15,851-857.
- LIU Y, LIM J, TEOH SH (2013) Development of clinically relevant scaffolds for vascularised bone tissue engineering. *Biotechnology Advances*, 31, 688-705.
- LIVERI V T (2006) Controlled synthesis of nanoparticles in microheterogeneous systems, Ed. Lockwood D J, Springer US, Italy, 115-164.
- LONGAKER M. T, CHIU ES, HARRISON MR, CROMBLEHOLME TM, (1989) Studies in fetal wound healing. IV. Hyaluronic acid-stimulating activity distinguishes fetal wound fluid from adult wound fluid. *Annals of Surgery*, 210, 667.
- LU Y C, EVANS C H, GRODZIŃSKY AJ (2011) Effects of short-term glucocorticoid treatment on changes in cartilage matrix degradation and chondrocyte gene expression induced by mechanical injury and inflammatory cytokines. *Arthritis Research & Therapy*, 13, R142.
- LYNCH S E, SAMUEL E, ROBERT E, (1999) Use of rhpdgf to improve bone and periodontal regeneration. In: Tissue Engineering Applications in Maxillofacial Surgery and Periodontics. Ed. S E LYNCH, R E MARX, M NEVINS, L A WISNER-LYNCH, Quintessence Publishing Co, p: 87-103.
- MANKIN H J, BUCKWALTER J A, GRODZIŃSKY A J (2000) Articular cartilage structure, composition, and function. *Orthopaedic*, 2, 443-470.
- MARTIN L J, ABDULLA N A, BRAMBRINK A M, KIRSCH J R, SIEBER F E, CAÏLLIAU C P (1998) Neurodegeneration in excitotoxicity, global cerebral ischemia, and target deprivation: a perspective on the contributions of apoptosis and necrosis. *Brain Research Bulletin*, 46, 281-309.
- MEYER K, PALMER J W (1934) The polysaccharide of the vitreous humor. *Journal of Biological Chemistry*, 107, 629-634.

- MILLER M D, Thompson S R, HART J A (2012) Joints. In: Review of orthopaedics. Ed. T COSKER, S ELSAYED, Elsevier Health Sciences, America, p: 39-48
- MILLER J C, SERRATO R, REPRESAS-CARDENAS J M, KUNDAHL G, (2004) The handbook of nanotechnology. Business, policy, and intellectual property law, John Wiley & Sons. Part 1.
- MOHANRAJ V, CHEN Y (2006) Nanoparticles-a review. *Tropical Journal of Pharmaceutical Research*, 5, 561-573.
- MONTASERI A, BUSCH F, MOBASHERI A, BUHRMANN C, ALDINGER C, RAD J S, SHAKIBAEI M (2011) IGF-1 and PDGF-bb suppress IL-1 β -induced cartilage degradation through down-regulation of NF- κ B signaling: involvement of Src/PI-3K/AKT pathway. *Plos One* 6, e28663.
- MORELAND L W (2003) Intra-articular hyaluronan (hyaluronic acid) and hylans for the treatment of osteoarthritis: mechanisms of action. *Arthritis Res Ther*, 5, 54.
- MOZAFARI M, Mortazavi S (2005) Nanoliposomes: from fundamentals to recent developments. Ed. M MOZAFARI, Trafford Pub. Ltd, Oxford, UK p: 112-123.
- MYNATT R, HALE S A, GILL R M, PLONTKE S K, SALT A N (2006) Demonstration of a longitudinal concentration gradient along scala tympani by sequential sampling of perilymph from the cochlear apex. *Journal of the Association for Research in Otolaryngology*, 7, 182-193.
- NAMAVAR F, RUBINSTEIN A, SABIRIANOV R F, THIELE G M (2012) Engineered Nanostructured Coatings for Enhanced Protein Adsorption and Cell Growth. *MRS*, 1418, 2-4.
- NIELSEN H M, ANDREASSEN T T, LEDET T, OXLUND H (1994) Local injection of TGF- β increases the strength of tibial fractures in the rat. *Acta Orthopaedica Scandinavica*, 65, 37-41.
- O'DRISCOLL S W, FITZSIMMONS JS, COMMISSO CN (1997) Role of oxygen tension during cartilage formation by periosteum. *Journal of Orthopaedic Research*, 15, 682-687.
- ÖĞÜT S, ATAY E (2012) Yaşlılık ve oksidatif stres. *Süleyman Demirel Üniversitesi Tıp Fak. Dergisi*, 19, 68-74.
- ÖZKAN, B. (2015). Diimin karbonil molibden (0) ve tungsten (0) komplekslerinin sentezi ve karakterizasyonu, Pamukkale Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü.
- PAGNOTTO M, WANG Z, KARPİE J C, FERRETTI M, XIAU X, CHU CR (2007) Adeno-associated viral gene transfer of transforming growth factor- β 1 to human mesenchymal stem cells improves cartilage repair. *Gene Therapy*, 14, 804-813.

- PIETROGRANDE V, MELANOTTE P L, AGNOLA B D, ULIVÌ M, PERBELLINI A (1991) Hyaluronic acid versus methylprednisolone intra-articularly injected for treatment of osteoarthritis of the knee. *Current Therapeutic Research*, 50, 691-701.
- PLACE E S, EVANS N D, STEVENS M M (2009) Complexity in biomaterials for tissue engineering. *Nature Materials*, 8, 457-470.
- RAMESH A, PATTABHÌ A, RAVÌ M (2016) Assays Used in vitro to Study Cancer Cell Lines. *Life Science Research*, 01, 19-24.
- RAO J P, GECKELER K (2011) Polymer nanoparticles: preparation techniques and size-control parameters. *Progress in Polymer Science*, 36, 887-913.
- RAO C N R., MULLER A, CHEETHAM A (2006) The chemistry of nanomaterials: synthesis, properties and applications, Ed. R RAO, A MULLER, A CHEETHAM. *John Wiley & Sons*.213-137.
- ROSIER R, O'KEEFE R. (1998) Autocrine regulation of articular cartilage. *Instructional Course Lectures*, 47, 469-475.
- SAHINER N, JIA X (2008) One-Step Synthesis of Hyaluronic Acid-Based (Sub) micron Hydrogel Particles: Process Optimization and Preliminary Characterization. *Turkish Journal of Chemistry* 32, 397-409.
- SAHOO P, PANDA H S, BAHADUR D (2013) Studies on the stability and kinetics of drug release of dexamethasone phosphate intercalated layered double hydroxides nanohybrids. *Materials Chemistry and Physics*, 142, 106-112.
- SAHOO S K, DILNAWAZ F, KRISHNAKUMAR S (2008) Nanotechnology in ocular drug delivery. *Drug Discovery Today*, 13, 144-151.
- SALGADO A J, COUTINHO OP, REIS RL (2004) Bone tissue engineering: state of the art and future trends. *Macromolecular Bioscience*, 4, 743-765.
- SAMANCI N, BALCI N (2001) Kortikosteroidler Ve Klinikte Kullanımları. *Turkiye Klinikleri Journal of Medical Sciences*, 21, 131-140.
- SARI A, TUNCER S, AYHAN S, ELMAS C, OZOGUL C, LATİFOĞLU O (2006) What wrapped perichondrial and periosteal grafts offer as regenerators of new tissue. *Journal of Craniofacial Surgery*, 17, 1137-1143.
- SELLNER S, KOCABEY S, ZHANG T, NEKOLLA K, HUTTEN S, KROMBACH F, LİEDL T, REHBERG M (2017) Dexamethasone-conjugated DNA nanotubes as anti-inflammatory agents in vivo. *Biomaterials*, 134, 78-90.

- SHIN H, JO S, MİKOS AG (2003) Biomimetic materials for tissue engineering. *Biomaterials*, 24, 4353-4364.
- SILVA M. A, CRAWFORD A, MUNDY JM, CORRELO VM, SOL P, (2010) Chitosan/polyester-based scaffolds for cartilage tissue engineering: assessment of extracellular matrix formation. *Acta Biomaterialia*, 6, 1149-1157.
- SMITH M, GHOSH P. (1987) The synthesis of hyaluronic acid by human synovial fibroblasts is influenced by the nature of the hyaluronate in the extracellular environment. *Rheumatology International*, 7, 113-122.
- SOIBERMAN U, KAMBHAMPATI SP, WU T, MISHRA MK, OH Y, SHARMA R, WANG J, YIU S, STARK WJ, KANNAN RM (2017) Subconjunctival injectable dendrimer-dexamethasone gel for the treatment of corneal inflammation. *Biomaterials*, 125, 38-53.
- SOPPIMATH K S, AMINABHAVI TM, KULKARNI AR, RUDZINSKI WE (2001) Biodegradable polymeric nanoparticles as drug delivery devices. *Journal Of Controlled Release*, 70, 1-20.
- STANBURY R M, GRAHAM E M (1998). Systemic corticosteroid therapy—side effects and their management. *British Journal of Ophthalmology*, 82, 704-708.
- STANDRING S (2015) Cell tissues and systems. In: Gray's Anatomy The Anatomical Basis of Clinical Practice. Ed. C B WIGLEY, Elsevier Health Sciences, Section 1.
- STÖVE J, SCHÖNIGER R, HUCH K, BRENNER R, GÜNTHER KP, PUHL W, SCHARF HP (2002) Effects of dexamethasone on proteoglycan content and gene expression of IL-1 β -stimulated osteoarthrotic chondrocytes in vitro. *Acta Orthopaedica Scandinavica*, 73, 562-567.
- STRAUSS E J, et al. (2005) Biochemical and biomechanical properties of lesion and adjacent articular cartilage after chondral defect repair in an equine model. *The American Journal of Sports Medicine*, 33, 1647-1653.
- STREETER G L (1949) Developmental horizons in human embryos; a review of the histogenesis of cartilage and bone. *Contributions to Embryology*, 33, 149-168.
- SWITZER J A (1997) Electrodeposition of Nanoscale Architectures Handbook of nanophase materials, Ed. A Goldstein, Marcel Dekker, America, 63-83.
- ŞENGEL-TÜRK C T, HASÇIÇEK C, GÖNÜL N (2007) Nanoparticulate Drug Delivery Systems For Targeting The Drugs To The Brain. *Journal of Neurological Sciences (Turkish)* 24, 254-263.
- ŞİMŞEK N (2001) Kıkırdak Doku Kemik Doku 6. baskı, Ankara.

- TAKAHASHI K, GOOMER RS, HARWOOD F, KUBO T, HIRAWASA Y, AMIEL D (1999) The effects of hyaluronan on matrix metalloproteinase-3 (MMP-3), interleukin-1 β (IL-1 β), and tissue inhibitor of metalloproteinase-1 (TIMP-1) gene expression during the development of osteoarthritis. *Osteoarthritis and Cartilage*, 7, 182-190.
- TEMENOFF J S, MIKOS A G (2000) Tissue engineering for regeneration of articular cartilage. *Biomaterials*, 21, 431-440.
- TRIPPEL S B (1998) Potential role of insulinlike growth factors in fracture healing. *Clinical orthopaedics and related research*, 355, 301-313.
- TUNCER S (2014) Çoklu İlaça Dirençli Kanser Hücre Hattına Nanopartiküllerle İlaç Aktarımı. Yüksek lisans tezi. Hacettepe Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü.
- ULRICH-VINTHER M., MALONEY MD, SCHWARZ EM, ROSIER R, (2003) Articular cartilage biology. *Journal of the American Academy of Orthopaedic Surgeons*, 11, 421-430.
- ULUTAŞ K, MENDERES A, KARACA C, ÖZKAL S (2005) Repair of cartilage defects with periosteal grafts. *British. Journal of Plastic Surgery* 58, 65-72.
- VENDITTI I, FONTANA L, FRADOTTI I, CAMETTI C, SENNATO S, MURA F, DELFINI M (2014). Direct interaction of hydrophilic gold nanoparticles with dexamethasone drug: Loading and release study. *Journal of Colloid and Interface Science*, 418, 52-60.
- WAGNER L, YANG O O, GARCIAE-ZEPEDA E A, GE Y, KALAMS S A, WALKER B D (1998) β -chemokines are released from HIV-1-specific cytolytic T-cell granules complexed to proteoglycans. *Nature*, 391, 908-911.
- WAKITANI S, GOTO T, YOUNG RG, MANSOUR JM, GOLDBERG VM, CAPLAN AI (1998) Repair of large full-thickness articular cartilage defects with allograft articular chondrocytes embedded in a collagen gel. *Tissue Engineering*, 4, 429-444.
- WANG X, NELIN L D, KULHMAN J R, MENG X, WELTY S E, LIU Y (2008) The role of MAP kinase phosphatase-1 in the protective mechanism of dexamethasone against endotoxemia. *Life sciences*, 83, 671-680.
- WATTERSON J R. Esdaile J.M (2000) Viscosupplementation: therapeutic mechanisms and clinical potential in osteoarthritis of the knee. *Journal of the American Academy of Orthopaedic Surgeons*, 8, 277-284.
- WEISS C, BAND P (1999) Basic principles underlying the development of viscosupplementation for the treatment of osteoarthritis. *Journal of Clinical Rheumatology*, 5, 2-11.
- XUE H, TU Y, MA T, LIU X, WEN T, CAI M, XIA Z, MEI J (2015) Lactoferrin Inhibits IL-1 β -Induced Chondrocyte Apoptosis Through AKT1-Induced CREB1 Activation. *Cellular Physiology and Biochemistry*, 36, 2456-2465

YAMAGUCHI N, SANDO I, HASHIDA Y, TAKAHASHI H, MATSUNE S (1990) Histologic study of eustachian tube cartilage with and without congenital anomalies: a preliminary study. *Annals of Otolaryngology, Rhinology & Laryngology*, 99, 984-987.

YAMANE S, IWASAKI N, MAJIMA T, FUNAKOSHI T, MASUKO T, HARADA K, MINAMI A, MONDE K, NISHIMURA S (2005) Feasibility of chitosan-based hyaluronic acid hybrid biomaterial for a novel scaffold in cartilage tissue engineering. *Biomaterials*, 26, 611-619.

ZHAO Y, ZUO Y, HUO H, XIAO Y, YANG X, XIN D (2014) Dexamethasone reduces ATDC5 chondrocyte cell viability by inducing autophagy. *Molecular Medicine Reports*, 9, 923-927.



ÖZ GEÇMİŞ

Kimlik Bilgileri

Adı Soyadı : Seval BİRDANE

Doğum Yeri : MERSİN

Medeni Hali : Bekar

E-Posta : birdaneseval@gmail.com

Adresi : Yenişehir Mahallesi 260. Sokak No 5 Yahşihan/Kırıkkale

Eğitim

Lise :Tevfik Sırrı Gür Lise-2007

Lisans : Erciyes Üniversitesi, Fen Edebiyat Fakültesi, Biyoloji-2012

Yüksek Lisans: Kırıkkale Üniversitesi, Sağlık Bilimleri Enstitüsü, Histoloji-Embriyoloji Anabilim Dalı-2017

İş Deneyimi ---

Yabancı Dil: İngilizce

Deneyim Alanları

Doku Bilimleri

Hücre-Kültür Çalışmaları

Tezden Üretilmiş Projeler

Proje No: BAP 2015/76

Proje adı: İlaç aktif madde yüklü hyaluronik asit nanopartiküllerin sentezi ve eklem dejenerasyonlarında kullanımının değerlendirilmesi.

Tezden Üretilmiş Tebliğ ve/veya Poster Sunumu ile Katıldığı Toplantılar

Birdane S, Akçapınar R, Türk M, Karahan S, Şahiner N, 'Evaluation of Dexamethasone Loaded Hyaluronic Acid Nanoparticles for Chondrocyte Viability' 22nd International Biomedical Science and Technology Symposium, Ankara University, Ankara, Turkey (12-14 May 2017)