



TÜRKİYE CUMHURİYETİ
MARMARA ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

**TRANSFORME BÜYÜME FAKTÖRÜ İÇEREN FARKLI
FARMASÖTİK DOZAJ FORMLARININ HAZIRLANMASI VE
ETKİNLİKLERİNİN HÜCRE KÜLTÜRÜ TEMELLİ OLARAK
ARAŞTIRILMASI**

AYSUN ÇELİK SOYSAL

DOKTORA TEZİ

FARMASÖTİK BİYOTEKNOLOJİ ANABİLİM DALI

DANIŞMAN
PROF. DR. ALİ DEMİR SEZER

2020-İSTANBUL

BEYAN

Bu tez çalışmasının kendi çalışmam olduğunu, tezin planlanmasından yazımına kadar bütün safhalarda etik dışı davranışımın olmadığını, bu tezdeki bütün bilgileri akademik ve etik kurallar içinde elde ettiğimi, bu tez çalışması ile elde edilmemiş bütün bilgi ve yorumlara kaynak gösterdiğimi ve bu kaynakları da kaynaklar listesine aldığımı, yine bu tezin çalışılması ve yazımı sırasında patent ve telif haklarını ihlal edici bir davranışımın olmadığını beyan ederim.

Aysun ÇELİK SOYSAL



TEŞEKKÜR

Tez çalışmam boyunca yapıcı eleştirileriyle beni destekleyen ve tecrübesiyle bana yol gösteren saygıdeğer hocam Farmasötik Biyoteknoloji Ana Bilim Dalı Başkanı ve tez danışmanım Prof. Dr. Ali Demir SEZER'e,

Çalışmam boyunca her türlü yardım ve desteğini esirgemeyen hocam Dr. Öğr. Üyesi Suna ÖZBAŞ'a,

Doktora eğitimimde öğretmiş olduğu bilgiler ışığında ilerlediğim, öğrencisi olmaktan gurur duyduğum Prof. Dr. Jülide AKBUĞA'ya,

Tez laboratuvar çalışmalarım boyunca ilgileri, destekleri ve laboratuvar imkanlarıyla yanımda olan Prof. Dr. Timuçin UĞURLU ve Dr. Öğr. Üyesi Sevinç ŞAHBAZ hocalarıma,

Farmasötik Biyoteknoloji Anabilim Dalı çalışma arkadaşlarım Arş. Gör. Ceyda EKENTOK ATICI, Arş. Gör. Murat DOĞAN ve Arş. Gör. Birnur Cömez'e,

Bugünlere gelmemde en büyük paya sahip olan, destekleriyle beni ayakta tutan sevgili ailem; kardeşim Aygün ÇELİK'e, babam Saffet ÇELİK'e ve eşim Yasin SOYSAL'a sevgi ve teşekkürlerimi sunarım.

Dünyaya geldiğim andan, 2017 yılında aramızdan ayrılana dek; her koşulda yanımda olan, hayata dair birçok şeyi bana öğreten, derdimi sıkıntımı en çok çeken, hiçbir fedakarlıktan kaçınmayıp ülkeme faydalı, bilinçli bir birey olmamı sağlayan, evladı olmaktan gurur duyduğum sevgili annem **Ayten ÇELİK** 'e teşekkürü borç bilir ve tezimi kendisine ithaf ederim.

Bu tez, Marmara Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Komisyonu Başkanlığı tarafından (SAG-C-DRP-090217-0042) numaralı proje ile desteklenmiştir.

İÇİNDEKİLER

Sayfa No

I. BEYAN.....	i
II. TEŞEKKÜR.....	ii
III. İÇİNDEKİLER.....	iii
IV. KISALTMALAR ve SİMGELER	x
V. ŞEKİL LİSTESİ	xii
VI. RESİM LİSTESİ.....	xix
VII. TABLO LİSTESİ.....	xx
1. ÖZET.....	1
2. SUMMARY.....	2
3. GİRİŞ VE AMAÇ.....	3
4. GENEL BİLGİLER	6
4.1. Deri	6
4.1.1. Derinin Yapısı	6
4.1.1.1. Epidermis	6
4.1.1.2. Epidermis Tabakaları	8
4.1.1.3. Dermis	10
4.1.1.4. Hipodermis	12
4.1.1.5. Deri Uzantıları	12
4.1.1.6. Derinin Fonksiyonları	12
4.2. Deriden Geçiş İle İlgili Bilgiler	15
4.2.1. Transselüler (intraselüler) geçiş	16
4.2.2. İnterselüler(paraselüler) geçiş	16
4.2.3. Deri uzantıları aracılığıyla geçiş	17
4.2.4. Geçirgenliği artırmak için uygulanan stratejiler	17
4.2.4.1. İlaç-taşıyıcı ilişkisi	18
4.2.4.2. Deri katmanlarında modifikasyon	19
4.2.4.3. Deri katmanlarının kaldırılması	20
4.2.4.4. Elektriksel teknikler	21
4.3. Yara	23
4.3.1.Yara Tipleri	23
4.3.2. Yara İyileşmesi	24

4.3.2.1. Hemostaz	25
4.3.2.2. İnflamasyon	25
4.3.2.3. Proliferasyon/ granülasyon	26
4.2.3.4. Remodeling/ maturasyon	26
4.3.3. Yara iyileşmesinde rol alan büyüme faktörleri	27
4.4. Transforme Edici Büyüme Faktörü Beta (TGF- β)	31
4.4.1. Transforme edici büyüme faktörü beta (TGF- β) ailesi ve yapısı	31
4.4.2. TGF- β 'nın reseptör ve hücre içi sinyalizasyon mekanizması.....	32
4.4.3. Yara iyileşmesinde TGF- β	34
4.4.3.1. Yara bölgesinde TGF- β ekspresyonu	37
4.4.3.2. TGF- β 1 ve TGF- β 2 proteinlerin antikorlarla nötralize edilmesi	39
4.5. İlaç taşıyıcı polimerler	41
4.5.1. Poli(laktik-ko-glikolik asit) (PLGA)	44
4.5.1.1. PLGA'nın yara iyileşme üzerine etkisi	46
4.5.2. Polivinil alkol (PVA)	47
4.5.2.1 Polivini alkol yapısı	47
4.5.2.2. Polivinil alkolün genel özellikleri	47
4.5.3. Kitozan	48
4.5.3.1. Kitozan yapısı ve eldesi	48
4.5.3.2. Kitozanın fizikokimya özellikleri	48
4.5.3.3. Kitozanın farmasötik kullanım alanları	49
4.5.3.4. Kitozanın yara iyileşme üzerine etkisi	49
4.5.4. Dendrimerler	50
4.5.4.1. Tanımı ve Genel Özellikleri	50
4.5.4.2. Dendrimerlerin Yapısı	52
4.5.4.3. Dendrimerlerin Adlandırılması	52
4.5.4.4. Dendrimerlerin ilaç taşıyıcı sistem olarak gerekli özellikler	53
4.5.4.5. Dendrimerlerin fizikokimyasal özellikleri	53
4.5.4.6. Dendrimer tipleri	55
4.5.4.7. Dendrimer sentez metodları	57
4.5.4.8. Dendrimerler yoluyla ilaç dağıtım mekanizması	59
4.5.4.9.Dendrimerlerin farmasötik uygulama alanları	60

4.6. Kullanılan Farmasötik Şekiller	66
4.6.1. Nanopartiküller	66
4.6.1.1. Tanımı ve genel özellikleri	66
4.6.1.2. Nanopartiküllerin hazırlanış yöntemleri	67
4.6.1.2.1. Emülsiyon-solvent buharlaştırma yöntemi	67
4.6.1.2.2. Tuzla çöktürme yöntemi	67
4.6.1.2.3. Emülsiyon-difüzyon yöntemi	68
4.6.1.2.4. Nanopresipitasyon	68
4.6.1.2.5. Polimerizasyon yöntemi	68
4.6.1.2.6. Diyaliz	69
4.6.1.2.7. Koaservasyon veya iyonik jelasyon yöntemi	69
4.6.1.2.8. Süperkritik akışkan teknolojisi (SCF)	69
4.6.1.3. PLGA nanopartiküllerin hazırlanması	70
4.6.1.4. PLGA nanopartiküllerin farmakokinetik ve bidağılım profili	70
4.6.1.5. PLGA nanopartiküllerde ilaç salım davranışı	71
4.6.2. Hidrojeller	72
4.6.2.1. Tanımı	72
4.6.2.2. Hidrojellerin genel özellikleri	73
4.6.2.3. Hidrojellerde kullanılan polimerler	74
4.6.2.4. Hidrojellerin sınıflandırılması	75
4.6.2.4.1. Polimerik kompozisyona göre hidrojellerin sınıflandırılması	75
4.6.2.4.2. Hidrojellerin konfigürasyon temelli sınıflandırılması	75
4.6.2.5. Hidrojellerin farmasötik kullanım özellikleri	75
4.6.2.4.3. Yüklerine göre hidrojellerin sınıflandırması	76
4.6.2.5. Hidrojellerin ilaç salım mekanizmaları	76
4.6.2.5.1. Difüzyon kontrollü salım sistemleri	76
4.6.2.5.2. Şişme kontrollü salım mekanizması	77
4.6.2.5.3. Kimyasal kontrollü salım mekanizması	77
4.6.2.6. Hidrojellerin farmasötik uygulamaları	78
5. GEREÇ ve YÖNTEM	79
5.1. Araç ve Gereçler	79
5.1.1. Kullanılan kimyasal maddeler ve sarf malzemeleri	79

5.1.2. Kullanılan cihazlar	81
5.1.3. Kullanılan hücre hatları	83
5.1.4. Besiyeri ve çözeltiler	83
5.1.4.1. Besiyerleri	83
5.1.4.2. Çözeltiler	83
5.2. YÖNTEM.....	86
5.2.1. rhTGF- β 1 proteinin rekonstitüsü.....	86
5.2.2. Rekonstitüe edilen TGF- β 1 proteinin kontrolleri	86
5.2.2.1. SDS Poliakrilamid jel elektroforezi	86
5.2.2.2. TGF- β 1 biyoaktivite kontrolü	86
5.2.3. rhTGF- β 1 ait standart eğrinin hazırlanması	87
5.2.4. TGF- β 1 içeren <i>in vitro</i> salım ve enkapsülasyon örneklerinin aktivasyonu.....	88
5.2.5. rhTGF- β 1 içeren farmasötik dozaj formlarının hazırlanması ve karakterizasyonu	88
5.2.5.1. PLGA nanopartiküllerin hazırlanması	88
5.2.5.2. Hazırlanan PLGA nanopartiküllerin karakterizasyonu	89
5.2.5.2.1. PLGA nanopartiküllerin boyut, zeta potansiyal ve polidispers indeksi....	89
5.2.5.2.2. TGF- β 1 içeren PLGA nanopatiküllerin verimi	89
5.2.5.2.3. PLGA nanopartiküllerin enkapsülasyon etkinliği	89
5.2.5.2.4. PLGA nanopartiküllerin taramalı elektron mikroskop analizi.....	90
5.2.5.2.5. PLGA nanopartiküllerin fourier dönüşümlü kızılötesi spektroskopisi (FT-IR).....	90
5.2.5.2.6. PLGA nanopartiküllerin diferansiyel taramalı kolorimetrik (DSC) analizi.....	90
5.2.5.2.7. PLGA nanopartiküllerin <i>in vitro</i> salım çalışmaları	90
5.2.5.2.8. Nanopartiküllerinin <i>in vitro</i> biyoadezyon çalışmaları	91
5.2.6. PVA/Kitozan hidrojellerin hazırlanması ve karakterizasyonu	92
5.2.6.1. PVA/Kitozan hidrojellerin hazırlanması	92
5.2.6.2. PLGA nanopartikül içeren PVA/Kitozan hidrojellerin hazırlanması	92
5.2.6.3. PVA/Kitozan hidrojellerin karakterizasyonu.....	93
5.2.6.3.1. PVA/Kitozan hidrojellerin fourier dönüşümlü kızılötesi spektroskopisi (FT-IR).....	93

5.2.6.3.2. PVA/Kitozan hidrojenlerin taramalı elektron mikroskop analizi.....	93
5.2.6.3.3 PVA/Kitozan hidrojenlerin su tutma kapasitesi	93
5.2.6.3.4. PVA/Kitozan hidrojenlerin <i>in vitro</i> salım alışmaları	94
5.2.6.3.5 PVA/Kitozan hidrojenlerin <i>in vitro</i> biyoadezyon alışmaları	94
5.2.6.3.6. PVA/Kitozan hidrojenlerin mekanik zellikleri	96
5.2.6.3.7. PVA/Kitozan hidrojenlerin viskozite lümleri	99
5.2.7. PAMAM/PVA hidrojenlerin hazırlanması ve karakterizasyonu	99
5.2.7.1. PAMAM/PVA hidrojenlerin hazırlanması	99
5.2.7.2. PAMAM/PVA hidrojenlerin karakterizasyonu	100
5.2.7.2.1. PAMAM/PVA hidrojenlerin FT-IR spektroskopisi	100
5.2.7.2.2. PAMAM/PVA hidrojenlerin su tutma kapasitesi	100
5.2.7.2.3. PAMAM/PVA hidrojenlerin <i>in vitro</i> salım alışması	101
5.2.8. Hücre Kültürü alışmaları	101
5.2.8.1. Hücre canlılığı deneyi (MTT testi)	101
5.2.8.2. BrdU hücre proliferasyon deneyi	102
5.2.8.3. <i>In vitro</i> yara iyileşme deneyi (Scratch testi)	102
5.2.9. İstatistiksel Analiz	103
6. BULGULAR.....	104
6.1. Rekonstitüe Edilen rhTGF-β1 Proteininde Yapılan Kontroller	104
6.1.1. Rekonstitüe edilen rhTGF-β1 proteinin SDS-PAGE yöntemi ile kontrolü ...	104
6.1.2. Rekonstitüe edilen rhTGF-β1 biyoaktivite deneyi	104
6.2. rhTGF-β1'e ait Standart Eğri Hazırlanmasına Ait Bulgular	105
6.3. PLGA Nanopartikül Formülasyonlarına Ait Bulgular	106
6.3.1. PLGA nanopartiküllerin boyut, zeta potansiyel ve PDI verilerine ait bulgular.....	106
6.3.2. TGF-β1 içeren PLGA nanopatiküllerin verimine ait bulgular	108
6.3.3. PLGA nanopartiküllerin enkapsülasyon etkinliğine ait bulgular	109
6.3.4. PLGA nanopartiküllerin fourier dönüşümlü kızılötesi spektroskopisine (FT-IR) ait bulgular	109
6.3.5. rhTGF-β1 içeren PLGA nanopartiküllerin morfolojik analizine ait bulgular	112

6.3.6. PLGA nanopartiküllerin diferansiyel taramalı kolorimetrik (DSC) analizine ait bulgular	114
6.3.7. rhTGF- β 1 içeren PLGA nanopartiküllerin <i>in vitro</i> salım çalışmasına ait bulgular	114
6.3.8. rhTGF- β 1 içeren PLGA nanopartiküllerin <i>in vitro</i> biyoadezyon analizlerine ait bulgular.....	115
6.4. PVA/Kitozan Hidrojellerin Hazırlanması ve Karakterizasyonuna Ait Bulgular	123
6.4.1. PVA/Kitozan hidrojellerin fourier dönüşümlü kızılötesi spektroskopisine (FT-IR) ait bulgular.....	123
6.4.2. Hazırlanan PVA/Kitozan hidrojellerin morfolojik incelemesi.....	125
6.4.3. PVA/Kitozan hidrojellerin su tutma kapasitesine ait bulgular	127
6.4.4. PVA/Kitozan hidrojellerin <i>in vitro</i> salım çalışmalarına ait bulgular	128
6.4.5.PVA/Kitozan hidrojellerin <i>in vitro</i> biyoadezyon çalışmalarına ait bulgular...	129
6.4.6. PVA/Kitozan hidrojellerin mekanik özelliklerine ait bulgular	138
6.4.6.1. PVA/Kitozan hidrojellerde sertlik tayinine ait bulgular	138
6.4.6.2. PVA/Kitozan hidrojellerde adeziflik tayinine ait bulgular	139
6.4.6.3. PVA/Kitozan hidrojellerde elastisite tayinine ait bulgular	139
6.4.6.4.PVA/Kitozan hidrojellerde koheziflik tayinine ait bulgular	140
6.4.6.5. PVA/Kitozan hidrojellerde dirençlilik tayinine ait bulgular	141
6.4.7. PVA/Kitozan hidrojellerin viskozite ölçümlerine ait bulgular	149
6.5. PAMAM/PVA Hidrojellerin Hazırlanması ve Karakterizasyonuna Ait Bulgular	149
6.5.1. PAMAM/PVA hidrojellerin fourier dönüşümlü kızılötesi spektroskopisine (FT-IR) ait bulgular	149
6.5.2.PAMAM/PVA hidrojellerin su tutma kapasitesi	152
6.5.3. PAMAM/PVA hidrojellerin <i>in vitro</i> salım çalışması	154
6.6. Hücre Kültürü Çalışmalarına Ait Bulgular	156
6.6.1. Hücre canlılığı deneyine (MTT Deneyi) ait bulgular	156
6.6.1.1. PLGA Nanopartiküllerin hücre canlılığı deneyine (MTT Deneyi) ait bulgular	156

6.6.1.2. PVA/Kitozan hidrojellerin hücre canlılığı deneyine (MTT Deneyi) ait bulgular	159
6.6.1.3. PAMAM/PVA hidrojellerin hücre canlılığı deneyine (MTT Deneyi) ait bulgular	161
6.6.2. BrdU hücre proliferasyon deneyine ait bulgular	164
6.6.2.1. PLGA Nanopartiküllerin BrdU hücre proliferasyon deneyine ait bulgular	164
6.6.2.2. PVA/Kitozan hidrojellerin BrdU hücre proliferasyon deneyine ait Bulgular	167
6.6.2.3. PAMAM/PVA hidrojellerin BrdU hücre proliferasyon deneyine ait Bulgular	169
6.6.3. In vitro yara iyileştirme deneyine (Scratch deneyi) ait bulgular.....	172
7. TARTIŞMA VE SONUÇ	174
8. KAYNAKLAR	196
9. EKLER	223
10. ÖZGEÇMİŞ	239

KISALTMALAR VE SİMGELER

a/h Ağırlık/hacim

DMEM Dulbecco's Modified Eagle's Medium

DMSO Dimetil sülfoksit

DNA Deoksiribonükleik asit

ECM Extracellular matriks, (Ekstrasellüler matriks)

EDTA Etilendiamintetraasetik asit

EGF Epidermal Growth Factor, (Epidermal büyüme faktörü)

h/h Hacim/hacim

FDA Food and Drug Administration, (Gıda ve ilaç dairesi)

FT-IR Fourier Dönüşümlü Kızılötesi Spektroskopisi

HaCaT İnsan Primer Epidermal Keratinosit Hücre Hattı

HCl Hidroklorik Asit

HEPES 4-(2-hydroxyethyl) piperazine-1-ethanesulfonic acid

H₂O Su

HT-2 İnterlökin-2 Bağımlı T lenfosit Hücre Hattı

IL-1 İnterlökin-1

IL-4 İnterlökin-4

IL-2 İnterlökin-2

ml Mililitre

mM Milimolar çözelti

MTT 3-(4,5-Dimethyl-2-thiazolyl)-2,5-diphenyl-2H-tetrazolium bromide

MW Molecular Weight, (Moleküler ağırlık)

N Normal çözelti

NaCl Sodyum klorür

Na₂HPO₄ disodyum hidrojen fosfat

NaH₂PO₄ Sodyum dihidrojen fosfat

NaOH Sodyum hidroksit

ng Nanogram

NIH-3T3 Fare Embriyonel Fibroblast Hücre Hattı

PBS Phosphate Buffer Saline, (Fosfat sodyum klorür tamponu)

PAMAM Poliamidoamin dendrimer

PLA Polilaktik asit

PLGA Polilaktik ko-glikolik asit

PVA Polivinil alkol

RPMI RPMI 1640 besiyeri

(Roswell Park Memorial Institute in 1640 Medium).

SDS Sodyum Dodesil Sülfat, (Sodyum lauril sülfat)

SEM Scanning Electron Microscopy, (Taramalı elektron mikroskobu)

TGF- β Transforming Growth Factor β , (Transforme edici büyüme faktörü β)

Tris Trizma® base, 2-amino-2-hydroxymethyl-1,3-propanediol

Tris-HCl Hidroklorik asit ile pH değeri ayarlanmış Tris çözeltisi

μ g Mikrogram

μ g/ml Mikrogram/mililitre

μ l Mikrolitre

pg Pikogram

ŞEKİLLER LİSTESİ

Şekil 1. Derinin genel yapısı.

Şekil 2. Epidermisin ayrıntılı yapısı.

Şekil 3. Dermisin katmanları.

Şekil 4. Korneositlerin düzenlenmesi ile cilde penetrasyonun şematik yolları “Tuğla ve harç” modeli.

Şekil 5. Yara onarımının farklı aşamalarının şematik gösterimi.

Şekil 6. İnsan TGF beta' nın işlenmiş 112 amino asitlik monomerik birimi.

Şekil 7. Dönüştürücü Büyüme faktörü (TGF- β) reseptörleri ile Smad proteinlerinin aktivasyonu.

Şekil 8. Yara iyileşmesi sırasında TGF- β 'nın çoklu fonksiyonları.

Şekil 9. PLGA yapısı ve hidrolizi.

Şekil 10. PVA yapısı ve eldesi.

Şekil 11. Kitozan modifikasyon tiplerinin temel reaksiyonları.

Şekil 12: Dördüncü jenerasyon dendrimerlerin temsili.

Şekil 13: Iraksak Dendrimer Sentez Metodu.

Şekil 14: Yakınsak Dendrimer Sentez Metodu.

Şekil 15. Dendrimer yüzeyine bağlı ilaç molekülü.

Şekil 16. Dendrimerin iç kavitelerine enkapsüle edilen ilaç molekülü.

Şekil 17. Plazmid DNA ile kompleks haline getirilen dendrimer.

Şekil 18. 50:50, 65:35, 75:25 ve 85:15 poli laktik-ko-glikolik asit için in vivo salım profilleri.

Şekil 19. Hidrojellerde çapraz bağlama metodları.

Şekil 20. Hidrojellerden ilaç salım mekanizması.

Şekil 21. Dilüsyon yöntemi ile TGF- β 1'e ait standart eğrinin hazırlanması.

Şekil 22. Nanopartiküllerde biyoadezyon tayinine ait grafik.

Şekil 23. Hidrojellerde biyoadezyon tayinine ait grafik.

Şekil 24. Hidrojellerde sertlik tayinine ait grafik.

Şekil 25. Hidrojellerde adeziflik tayinine ait grafik.

Şekil 26. Hidrojellerde koheziflik tayinine ait grafik.

Şekil 27. Hidrojellerde elastikiyet tayinine ait grafik.

Şekil 28. rhTGF- β 1protein biyolojik aktivite testi.

Şekil 29. rhTGF-B1 standart eğrisi.

Şekil 30. PLGA nanopartiküllerin boyut analizi.

Şekil 31. PLGA 503H (L:G; 50:50) polimerin fourier dönüşümlü kızılötesi spektroskopisi.

Şekil 32. TGF- β 1 proteinin fourier dönüşümlü kızılötesi spektroskopisi.

Şekil 33. F3 kodlu PLGA np'nin fourier dönüşümlü kızılötesi spektroskopisi.

Şekil 34. E3 kodlu PLGA np'nin fourier dönüşümlü kızılötesi spektroskopisi.

Şekil 35. TGF- β 1 içeren ve içermeyen PLGA nanopartiküllerin DSC analizi.

Şekil 36. rhTGF- β 1 proteinin PLGA np'den salım grafiği.

Şekil 36.1. rhTGF- β 1 proteinin PLGA nanopartiküllerden 72 saatlik salım grafiği.

Şekil 37. B1 kodlu PLGA nanopartikülün *in vitro* biyoadezyon grafiği.

Şekil 38. B2 kodlu PLGA nanopartikülün *in vitro* biyoadezyon grafiği.

Şekil 39. B3 kodlu PLGA nanopartikülün *in vitro* biyoadezyon grafiği.

Şekil 40. D1 kodlu PLGA nanopartikülün *in vitro* biyoadezyon grafiği.

Şekil 41. D2 kodlu PLGA nanopartikülün *in vitro* biyoadezyon grafiği.

Şekil 42. D3 kodlu PLGA nanopartikülün *in vitro* biyoadezyon grafiği.

Şekil 43. F1 kodlu PLGA nanopartikülün *in vitro* biyoadezyon grafiği.

Şekil 44. F2 kodlu PLGA nanopartikülün *in vitro* biyoadezyon grafiği.

Şekil 45. F3 kodlu PLGA nanopartikülün *in vitro* biyoadezyon grafiği.

Şekil 46. H1 kodlu PLGA nanopartikülün *in vitro* biyoadezyon grafiği.

Şekil 47. H2 kodlu PLGA nanopartikülün *in vitro* biyoadezyon grafiği.

Şekil 48. H3 kodlu PLGA nanopartikülün *in vitro* biyoadezyon grafiği.

Şekil 49. J1 kodlu PLGA nanopartikülün *in vitro* biyoadezyon grafiği.

Şekil 50. J2 kodlu PLGA nanopartikülün *in vitro* biyoadezyon grafiği.

Şekil 51. J3 kodlu PLGA nanopartikülün *in vitro* biyoadezyon grafiği.

Şekil 52. Kitozan (orta moleküler ağırlıklı) polimerin fourier dönüşümlü kızılötesi spektroskopisi.

Şekil 53. PVA polimerinin fourier dönüşümlü kızılötesi spektroskopisi.

Şekil 54. PVA/Kitozan hidrojellerden H3_(3) ve H5_(3) formülasyonlarının fourier dönüşümlü kızılötesi spektroskopisi.

Şekil 55. PVA/Kitozan hidrojellerin zamana bağlı su tutma yüzdeleri.

Şekil 56. rhTGF- β 1 proteinin F kodlu nanopartikülden ve H5 kodlu hidrojelden salım grafiği.

Şekil 57. H1_(1) kodlu PVA/Kitozan hidrojel formülasyonunun *in vitro* biyoadezyon grafiği.

Şekil 58. H1_(2) kodlu PVA/Kitozan hidrojel formülasyonunun *in vitro* biyoadezyon grafiği.

Şekil 59. H1_(3) kodlu PVA/Kitozan hidrojel formülasyonunun *in vitro* biyoadezyon grafiği.

Şekil 60. H2_(1) kodlu PVA/Kitozan hidrojel formülasyonunun *in vitro* biyoadezyon grafiği.

Şekil 61. H2_(2) kodlu PVA/Kitozan hidrojel formülasyonunun *in vitro* biyoadezyon grafiği.

Şekil 62. H2_(3) kodlu PVA/Kitozan hidrojel formülasyonunun *in vitro* biyoadezyon grafiği.

Şekil 63. H3_(1) kodlu PVA/Kitozan hidrojel formülasyonunun *in vitro* biyoadezyon grafiği.

Şekil 64. H3_(2) kodlu PVA/Kitozan hidrojel formülasyonunun *in vitro* biyoadezyon grafiği.

Şekil 65. H3_(3) kodlu PVA/Kitozan hidrojel formülasyonunun *in vitro* biyoadezyon grafiği.

Şekil 66. H4_(1) kodlu PVA/Kitozan hidrojel formülasyonunun *in vitro* biyoadezyon grafiği.

Şekil 67. H4_(2) kodlu PVA/Kitozan hidrojel formülasyonunun *in vitro* biyoadezyon grafiği.

Şekil 68. H4_(3) kodlu PVA/Kitozan hidrojel formülasyonunun *in vitro* biyoadezyon grafiği.

Şekil 69. H5_(1) kodlu PVA/Kitozan hidrojel formülasyonunun *in vitro* biyoadezyon grafiği.

Şekil 70. H5_(2) kodlu PVA/Kitozan hidrojel formülasyonunun *in vitro* biyoadezyon grafiği.

Şekil 71. H5_(3) kodlu PVA/Kitozan hidrojel formülasyonunun *in vitro* biyoadezyon grafiği.

Şekil 72. H1_(1) kodlu PVA/Kitozan hidrojel formülasyonunun mekanik özellik grafiği.

Şekil 73. H1_(2) kodlu PVA/Kitozan hidrojel formülasyonunun mekanik özellik grafiği.

Şekil 74. H1_3 kodlu PVA/Kitozan hidrojel formülasyonunun mekanik özellik grafiği.

Şekil 75. H2_1 kodlu PVA/Kitozan hidrojel formülasyonunun mekanik özellik grafiği.

Şekil 76. H2_2 kodlu PVA/Kitozan hidrojel formülasyonunun mekanik özellik grafiği.

Şekil 77. H2_3 kodlu PVA/Kitozan hidrojel formülasyonunun mekanik özellik grafiği.

Şekil 78. H3_1 kodlu PVA/Kitozan hidrojel formülasyonunun mekanik özellik grafiği.

Şekil 79. H3_2 kodlu PVA/Kitozan hidrojel formülasyonunun mekanik özellik grafiği.

Şekil 80. H3_3 kodlu PVA/Kitozan hidrojel formülasyonunun mekanik özellik grafiği.

Şekil 81. H4_1 kodlu PVA/Kitozan hidrojel formülasyonunun mekanik özellik grafiği.

Şekil 82. H4_2 kodlu PVA/Kitozan hidrojel formülasyonunun mekanik özellik grafiği.

Şekil 83. H4_3 kodlu PVA/Kitozan hidrojel formülasyonunun mekanik özellik grafiği.

Şekil 84. H5_1 kodlu PVA/Kitozan hidrojel formülasyonunun mekanik özellik grafiği.

Şekil 85. H5_2 kodlu PVA/Kitozan hidrojel formülasyonunun mekanik özellik grafiği.

Şekil 86. H5_3 kodlu PVA/Kitozan hidrojel formülasyonunun mekanik özellik grafiği.

Şekil 87. PAMAM G5 polimerin fourier dönüşümlü kızılötesi spektroskopisi.

Şekil 88. F1_(1) (mavi) ve F4_(1) (kırmızı) kodlu PAMAM/PVA hidrojellerin fourier dönüşümlü kızılötesi spektroskopisi.

Şekil 89. F2_(1) (kırmızı) ve F5_(1) (siyah) kodlu PAMAM/PVA hidrojellerin fourier dönüşümlü kızılötesi spektroskopisi..

Şekil 90. F3_(1) (mavi) ve F6_(1) (kırmızı) kodlu PAMAM/PVA hidrojellerin fourier dönüşümlü kızılötesi spektroskopisi

Şekil 91. PAMAM/PVA hidrojellerin zamana bağlı su tutma yüzdeleri.

Şekil 92. rhTGF- β 1 proteinin PAMAM/PVA hidrojellerden salım grafiği.

Şekil 93. NIH-3T3 fibroblast hücre hattında PLGA nanopartiküllerin ve H5 kodlu PVA/Kitozan hidrojelin sitotoksosite % grafiği.

Şekil 94. HaCaT keratinosit hücre hattında PLGA nanopartiküllerin ve H5 kodlu PVA/Kitozan hidrojelin sitotoksosite % grafiği.

Şekil 95. NIH-3T3 fibroblast hücre hattında PVA/Kitozan hidrojellerin sitotoksosite % grafiği.

Şekil 96. HaCaT keratinosit hücre hattında PVA/Kitozan hidrojellerin sitotoksosite % grafiği.

Şekil 97. NIH-3T3 fibroblast hücre hattında PAMAM/PVA hidrojellerin sitotoksosite % grafiği.

Şekil 98. HaCaT keratinosit hücre hattında PAMAM/PVA hidrojellerin sitotoksosite % grafiği.

Şekil 99. NIH-3T3 fibroblast hücre hattında PLGA nanopartiküllerin hücre proliferasyon % grafiği.

Şekil 100. HaCaT keratinosit hücre hattında PLGA nanopartiküllerin hücre proliferasyon % grafiği.

Şekil 101. NIH-3T3 fibroblast hücre hattında PVA/Kitozan hidrojellerin hücre proliferasyon % grafiği.

Şekil 102. HaCaT keratinosit hücre hattında PVA/Kitozan hidrojellerin hücre proliferasyon % grafiği.

Şekil 103. NIH-3T3 fibroblast hücre hattında PAMAM/PVA hidrojellerin hücre proliferasyon % grafiği.

Şekil 104. HaCaT keratinosit hücre hattında PAMAM/PVA hidrojellerin hücre proliferasyon % grafiği.

RESİMLER LİSTESİ

Resim 1. Texture cihazı ile PLGA nanopartiküllerin biyoadezyon ölçümü.

Resim 2. Rekonstitüe edilen rhTGF- β 1proteinin SDS-PAGE görüntüsü.

Resim 3. F3 kodlu PLGA nanopatiküllerin SEM görüntüsü (x15000).

Resim 4. J3 kodlu PLGA nanopartikül SEM görüntüsü (x10000).

Resim 5. H3_3 kodlu hidrojel formülasyonunun SEM görüntüsü (x100).

Resim 6. H5_3 hidrojel formülasyonunun SEM görüntüsü (x150).

Resim 7. NIH-3T3 fibroblast hücre migrasyonu görüntüleri.

Resim 8. HaCaT keratinosit hücre migrasyonu görüntüleri.



TABLÖLER LİSTESİ

Tablo 1. Kimyasal penetrasyon artırıcılar.

Tablo 2. Akut ve kronik yaralarda yer alan büyüme faktörleri ve sitokinlerin salındığı hücreler ve etkileri.

Tablo 3. Yara iyileşmesinde yer alan hücresel mediyatörler üzerine TGF- β 1'in etkisi.

Tablo 4. İlaç taşıyıcı sisteminde kullanılan polimerler.

Tablo 5. Hidrojelde kullanılan polimerler.

Tablo 6. Hidrojellerin Farmasötik Uygulamaları.

Tablo 7. PLGA nanopartiküllerin formülasyonları.

Tablo 8. PVA/kitozan hidrojel formülasyonları.

Tablo 9. PAMAM/PVA hidrojellerin formülasyonu.

Tablo 10. rhTGF- β 1 proteinin standart eğri absorbans değerleri.

Tablo 11. PLGA nanopartiküllerin boyut, yüzey yükü ve PDI değerleri.

Tablo 12. TGF- β 1 içeren PLGA nanopartiküllerin % verimleri.

Tablo 13. TGF- β 1 içeren PLGA nanopartiküllerin enkapsülasyon etkinliği ve in vitro biyoadesyon ölçüm sonuçları.

Tablo 14. PVA/Kitozan hidrojellerin su tutma kapasitesi.

Tablo 15. PVA/Kitozan hidrojellerin in vitro biyoadesyon ve viskozite ölçüm sonuçları.

Tablo 16. PVA/Kitozan hidrojel formülasyonlarının mekanik özelliklerinin analiz değerleri.

Tablo 17. PVA/Kitozan hidrojellerin sertlik sonuçları.

Tablo 18. PVA/Kitozan hidrojellerin adezivite sonuçları.

Tablo 19. PVA/Kitozan hidrojellerin elastisite sonuçları.

Tablo 20. PVA/Kitozan hidrojellerin kohezivite sonuçları.

Tablo 21. PVA/Kitozan hidrojellerin dirençlilik.

Tablo 22. F1 kodlu PAMAM/PVA hidrojellerin su tutma kapasitesi.

Tablo 23. F2 kodlu PAMAM/PVA hidrojellerin su tutma kapasitesi.

Tablo 24. F3 kodlu PAMAM/PVA hidrojellerin su tutma kapasitesi.

Tablo 25. PAMAM/PVA hidrojellerin in vitro salım % sonuçları.

Tablo 26. PLGA nanopartiküllerin NIH-3T3 hücre hattındaki sitotoksikite sonuçları.

Tablo 27. PLGA nanopartiküllerin HaCaT hücre hattındaki sitotoksisite sonuçları.

Tablo 28. PVA/Kitozan hidrojellerin NIH-3T3 hücre hattındaki sitotoksisite sonuçları.

Tablo 29. PVA/Kitozan hidrojellerin HaCaT hücre hattındaki sitotoksisite sonuçları.

Tablo 30. PAMAM/PVA hidrojellerin NIH-3T3 hücre hattındaki sitotoksisite sonuçları.

Tablo 31. PAMAM/PVA hidrojellerin HaCaT hücre hattındaki sitotoksisite sonuçları.

Tablo 32. PLGA nanopartiküllerin NIH-3T3 hücre hattındaki hücre proliferasyon sonuçları.

Tablo 33. PLGA nanopartiküllerin HaCaT hücre hattındaki hücre proliferasyon sonuçları.

Tablo 34. PVA/Kitozan hidrojellerin NIH-3T3 hücre hattındaki hücre proliferasyon sonuçları.

Tablo 35. PVA/Kitozan hidrojellerin HaCaT hücre hattındaki hücre proliferasyon sonuçları.

Tablo 36. PAMAM/PVA hidrojellerin NIH-3T3 hücre hattındaki hücre proliferasyon sonuçları.

Tablo 37. PAMAM/PVA hidrojellerin HaCaT hücre hattındaki hücre proliferasyon sonuçları.

1. ÖZET

Transforme Büyüme Faktörü İçeren Farklı Farmasötik Dozaj Formlarının Hazırlanması ve Etkinliklerinin Hücre Kültürü Temelli Olarak Araştırılması

Aysun ÇELİK SOYSAL

Farmasötik Biyoteknoloji Anabilim Dalı

Danışman: Prof. Dr. Ali Demir SEZER

Amaç: Tez kapsamında; TGF- β 1 proteini kullanılarak farklı farmasötik formlar hazırlanması, etkinliklerinin ve protein stabilitesine katkısının yara iyileşme mekanizmasında rol alan hücrelerde gösterilmesi amaçlanmıştır.

Gereç ve yöntem: TGF- β 1 proteini için 3 farklı taşıyıcı sistem geliştirilmiştir. Bu formülasyonlar PLGA nanopartiküller, PVA/Kitozan hidrojeller ve PVA/PAMAM hidrojellerdir. PLGA nanopartiküller ikili emülsiyon çözücü buharlaştırma yöntemi ile elde edilmiştir. PVA/Kitozan ve PVA/PAMAM hidrojeller ise fiziksel jelleşme metodu olan dondur-çöz yöntemi ile hazırlanmıştır.

Bulgular ve sonuçlar: Hazırlanan polimerik ilaç taşıyıcı sistemlerin karakterizasyon çalışmaları yapılmıştır. Daha sonra NIH-3T3 ve HaCaT hücre hatlarında test edilmiş ve özellikle serbest protein ile kıyaslandığında protein stabilitesinin yanı sıra, hücrelerin canlılığını ve proliferasyonunu artırdığı bulunmuştur. Optimize edilen formülasyonlar ile migrasyon çalışması yapılmış ve artırdığı gözlemlenmiştir. Geliştirilen formülasyonlar arasında kombinasyon sistemler oluşturularak karakterizasyon analizleri yapılmış ve elde edilen sonuçların kıyaslaması hücre temelli olarak araştırılmıştır.

Anahtar Kelimeler: PLGA Nanopartikül, PVA/Kitozan Hidrojel, PVA/PAMAM Hidrojel, TGF- β 1, Yara iyileşmesi.

2. SUMMARY

Preparation of Different Pharmaceutical Dosage Forms Containing Transforming Growth Factor and Investigation of Their Activities Based on Cell Culture

Aysun ÇELİK SOYSAL

Pharmaceutical Biotechnology Department

Supervisor: Prof. Dr. Ali Demir SEZER

Objective: Within the scope of the thesis; It is aimed to prepare different pharmaceutical forms using TGF- β 1 protein and to demonstrate their efficacy and contribution to protein stability in cells involved in wound healing mechanism.

Materials and Method: Three different delivery systems have been developed for TGF- β 1 protein. These formulations are PLGA nanoparticles, PVA/Kitozan hydrogels and PVA/PAMAM hydrogels. PLGA nanoparticles were obtained by double emulsion solvent evaporation method. PVA/Kitozan and PVA/PAMAM hydrogels are prepared by the freeze-thaw method, which is the physical gelling method.

Results and Conclusion: Characterization studies of prepared polymeric drug delivery systems have been carried out. It was then tested on NIH-3T3 and HaCaT cell lines and was found to increase cell viability and proliferation, as well as protein stability, especially when compared to free protein. Migration has been done with optimized formulations and it has been observed to increase. Characterization analyses were carried out by creating combination systems among the formulations developed and the comparison of the obtained results was investigated based on cells.

Keywords: PLGA Nanoparticle, PVA/Kitozan Hydrogel, PVA/PAMAM Hydrogel, TGF- β 1, Wound healing.

3. GİRİŞ ve AMAÇ

Genel olarak yara, doku zedelenmesi veya bütünlüğünün bozulması olarak tanımlanmaktadır. Deri; epidermis ve dermis koruyucu bariyerlerinden oluşur ve bu bariyerler hasar aldığı anda yara iyileşmesi tek bir bölgeyle sınırlı kalmayıp; hücreler, fizyolojik ve biyokimyasal birçok sistemi içermektedir. Sağlık alanında, geçmişten günümüze kadar yara ve yanık tedavisi sağlıkta önemli yer tutmaktadır. Yaranın çabuk iyileşmesi, hem hasta refahı hem de enfeksiyon riskini önlemek için istenen bir durumdur. Yara iyileşmesi kompleks bir sistem olup birçok mekanizmayı içeren bir prosesdir. İnflamasyon, hücre proliferasyonu, matriks oluşumu, yeniden doku modellemesi bu prosesi oluşturmaktadır. Birçok büyüme faktörü ve reseptörleri de bu mekanizmada anahtar rol oynamaktadır. Bu süreci hızlandırmak için yara iyileşmesinde rol alan birçok sitokin ve büyüme faktörüyle çeşitli çalışmalar yapılmıştır. Bu sitokin ve büyüme faktörleri arasında IL-1, IL-6, TNF- α , EGF, FGF-2, VEGF, PDGF ve TGF- β başlıca yer almaktadır (Martin, 1997; Hardwicke ve ark., 2008; Demidova-Rice ve ark., 2012).

Yara iyileşmesinde en önemli modulatorlerden biri TGF- β ' dır. Büyük oranda plateletler olmak üzere, aktive olmuş makrofajlar, nötrofiller, fibroblastlar, keratinositler, T-lenfositler ve endotel hücreler tarafından üretilmektedir. Transforme edici büyüme faktörü (TGF- β) asidik, ısı-stabil, disülfid bağlı homodimerik bir proteindir ve 112 amino asitten oluşur. Moleküler ağırlığı ise yaklaşık 25 kDa' dur. Ayrıca TGF- β etkili bir sitokin görevi görüp makrofajlar ve fibroblastlar için kemoaktran ve mitojeniktir. Ekstraselüler matriks proteinlerin sentezini ve integrinlerin ekspresyonunu stimule etmektedir. Endotel hücrelerin sayısını artırarak anjiyogeneze etkisiyle yeni granülasyon doku oluşumunu sağlamaktadır ve epidermal hücrelerin göçünü stimule etmektedirler. Memelilerde TGF- β 'nın % 64–85 amino asit sekans homolojisi gösteren 3 tane izoformu (β -1, β -2, β -3) bulunmaktadır. *In vitro*, TGF- β 'lar birçok hücre tipinde etkilidir. Memelilerde yara onarımı sırasında üç TGF- β formu da rol almaktadır. Farklı gen ürünleri olduğu için *in vitro* çalışmalarda yara iyileşmesinde izoformlar arasında potans ve biyolojik aktivite farklılığı gösterilmiştir. TGF- β 'nın üç izoformu bulunmasına rağmen, TGF- β 1 yara iyileşmesinde daha baskın olan formdur.

TGF- β ; bir heteromerik reseptör kompleksi olan TGF- β 1 ve TGF- β 2 reseptörlerine bağlanıp, smad hücre içi sinyal yolağını kullanarak etkisini göstermektedir Puolakkainen ve ark., 1995; O'Kane ve Ferguson, 1997; Le ve ark., 2012).

Yara iyileşmesinde çeşitli protein ve sitokinlerin direkt veya farklı taşıyıcı sistemler ile çalışmaları bulunmaktadır. TGF- β 1'i tercih etmemizin amacı yara iyileşme fazlarında erken fazda yer almaya başlayıp sonraki fazlarda da etkinliği devam eden bir sitokin olmasıdır. Bu proteinin tedavide uygulanmasında; degradasyonunu önlemek, uzun süre stabilitesini, kontrollü salımını sağlamak ve taşıyıcı sistemle beraber kombine etki oluşturması için farklı iki farmasötik form seçilerek etkinliklerinin gösterilmesi amaçlanmıştır. Bu çalışmada biyouyumlu bir polimer olan PLGA (polilaktik-ko-glikolik asit) seçilerek *in vitro* protein stabilitesinin sağlanması ve geliştirilen nanopartikül formülasyonu ile PLGA'dan gelen laktat indüksiyonunun hücre proliferasyon üzerine kombine etkisi amaçlanmıştır. Ayrıca, topikal uygulama açısından kolaylık sağlayan hidrojel formülasyonları geliştirilmiştir. Geliştirilen PVA/Kitozan hidrojel formülasyonları içerisine optimum PLGA nanopartikül formülasyonu seçilerek hem topikal uygulamada refahlık hem de polimer kaynaklı proliferatif etkinin incelenmesi amaçlanmıştır.

Dendrimerler 1980'li yılların başında Tomalia ve arkadaşlarının keşfiyle ortaya çıkmıştır. Dallanmış yapısıyla kısa zamanda birçok çalışmayla popüler ilaç taşıyıcı sistemler arasında yer almıştır. Diğer taraftan bu çalışma kapsamında bilinen polimer yapısından farklı dallanmış yapıya sahip olan dendrimerler ile hidrojel formülasyonları geliştirilmesi ve bu formülasyonların *in vitro* yara iyileşme etkinliğinin incelenmesi amaçlanmıştır (Parveen ve Sahoo, 2006; Nanjwade ve ark., 2009; Çırpanlı, 2009; Mohammadi-Samani ve Taghipour, 2015).

Bu çalışmada yara iyileşme mekanizmasında önemli yer tutan TGF- β 1 proteini ile PLGA nanopartiküller, PLGA nanopartikül içeren PVA/Kitozan hidrojeller ve direkt TGF- β 1 proteini içeren PAMAM/PVA hidrojeller geliştirilmiştir. Bu formülasyonların hiçbirisi sitotoksik olmayıp hücre canlılığına büyük oranlarda katkı sağlamıştır. Geliştirilen bu formların *in vitro* etkinliği ve kombine pozitif etkileri *in vitro* yara iyileşme çalışmalarında gösterilmiştir. Bunlara

ek olarak geliştirilen formülasyonlar protein stabilitesini artırarak yara iyileşme prosesinde proteazlara karşı korunma sağlamışlardır.



4. GENEL BİLGİLER

4.1. Deri

Deri, vücudun en büyük organıdır. Erişkinlerde yaklaşık 1.5–2 m²’ lik bir alan büyüklüğünde ve yaklaşık 4 kg ağırlığındadır. Deri; heterojen bir organdır ve birden fazla yapıyı içermektedir. Santimetrekare başına yaklaşık üç milyon mikroorganizmaya ev sahipliği yapmakla birlikte immünolojik fonksiyonlara da sahiptir. Vücudun farklı bölgelerinde farklı kalınlıklardadır ve deri yüzeyi pH değeri yaklaşık 5.5 olan asit bir mantoya sahiptir. Başta yara tedavisi olmak üzere transdermal sistemler aracılığıyla birçok hastalığın tedavi edilmesinde oldukça tercih edilen tedavi uygulama bölgesidir (Richardson, 2003; Kielhorn ve ark., 2006; Değim, 2008).

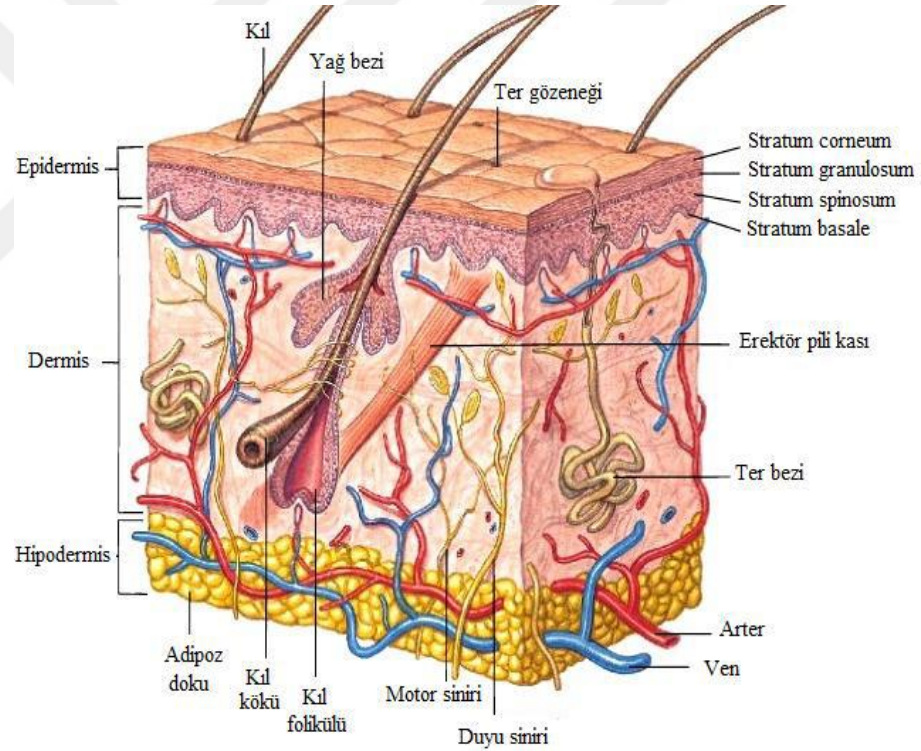
4.1.1. Derinin yapısı

Deri, vücudun içeriğini bir arada tutan, dıştan içe epidermis, dermis ve hipodermis yapılarından oluşmaktadır.

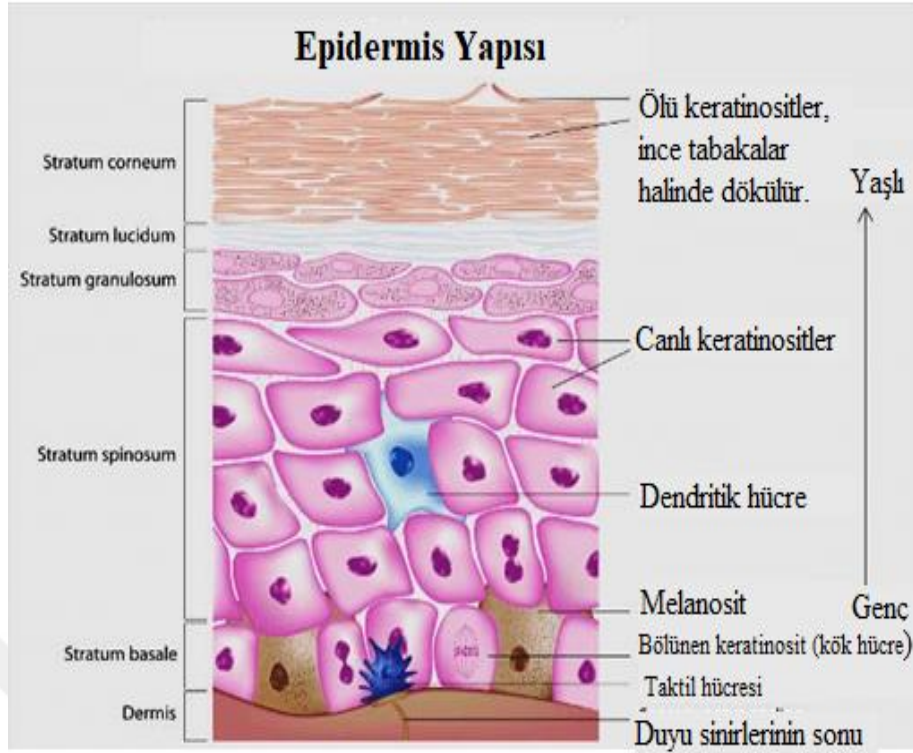
4.1.1.1. Epidermis

Epidermis derinin en dış tabakasıdır ve vücudun farklı bölgelerine bağlı olarak yaklaşık 0.05-1 mm kalınlığındadır (Maibach ve Honari, 2014). Beş ayrı hücre katmanına sahiptir ancak kan damarları ve sinir uçları yoktur. Vücudun çoğu bölgesi dört katmana sahiptir, fakat ayak ve el derisi sürtünmeye maruz kalan bölgeler olarak deride beşinci katmanı (*Stratum lusidum*) bulundurmaktadır (Kielhorn, 2006). Keratinositler, melanositler ve Langerhans hücreleri epidermiste bol miktarda bulunmaktadır. Keratinositler, sürekli olarak bazal laminada üretilirler, olgunlaşma ve farklılaşma sürecinden sonra yüzeye göç etmektedirler. Keratinositler farklılaştıkça; *Stratum bazale*, *Stratum spinosum*, *Stratum granulozum*, *Stratum lusidum* ve *Stratum korneum* olarak bilinen 5 tabakayı oluşturmaktadır. Bazal tabakadan *stratum korneum*a kadar keratinosit geçiş süresi yaklaşık 14 gündür, kendi içerisinde *stratum korneum* döngüsü de ikinci bir 14 gün sürmektedir fakat bazı inflamasyon koşulları bu süreci etkilemektedir. *Stratum korneum*; lipid membranların ana bileşenleri olan serbest yağ asitleri, seramidler ve sterollerden oluşmaktadır ve deride koruyucu bir bariyer görevi görmektedir (Bouwstra ve Ponc, 2006).

*Stratum korneum*daki melanositler, esas olarak bazal katmanda bulunan, nöral krest hücrelerinden köklenen, pigment sentezleyen dendritik hücrelerdir. Merkel hücreleri, bazal tabakada da bulunan mekanosensör reseptörlerdir. Langerhans hücreleri ise, epidermiste dendritik antijen işleyen ve sunan hücrelerdir. Çoğu suprabazal pozisyonda bulunan hücreler, toplam epidermal hücre popülasyonunun % 2-8'ini oluşturmaktadır. Dermal-epidermal bağlantısı (DEJ), epidermis ve dermis arasındaki arayüzeyi oluşturan bir bazal membran bölgesidir. DEJ'in başlıca işlevleri, epidermis ve dermisi birbirine bağlamak ve dış kuvvetlere karşı direnç sağlamaktır (Maibach ve Honari, 2014).



Şekil 1. Derinin genel yapısı ([http://encyclopedia.lubopitko.bg.com/structure of skin.html](http://encyclopedia.lubopitko.bg.com/structure%20of%20skin.html)) Erişim tarihi: 17.12.2018



Şekil 2. Epiderminin ayrıntılı yapısı (Alsaab ve ark., 2016).

4.1.1.2. Epidermis tabakaları

a. Stratum korneum

Stratum korneum, epiderminin en yüzeyindeki ve dış ortama maruz kalan tabakasıdır. Bu tabaka 15-30 hücre sırasına sahiptir. Bu katmanda keratin proteini ile dolu ölü hücreler yer almaktadır. Hareket halinde vücuttan *stratum korneum* 'daki ölü tabaka toz gibi dökülmektedir. Bu kuru, ölü tabaka mikropların nüfuz etmesini ve alttaki dokuların dehidrasyonunu önlemeye yardımcı olur ve daha hassas olan alttaki tabakalar için aşınmaya karşı mekanik bir koruma sağlamaktadır. Bu katmandaki hücreler periyodik olarak dökülür ve yerine *stratum granulozum*'dan (veya avuç içlerinde ve ayak tabanlarında *stratum lusidum*'dan) itilen yeni hücreler gelmektedir. Tüm tabaka yaklaşık 4 haftalık bir süre boyunca değişmektedir. Mikrodermabrazyon gibi kozmetik uygulamalar, kuru üst tabakanın bir kısmının çıkarılmasına yardımcı olur ve cildin taze, sağlıklı görünmesini amaçlamaktadır (Alkilani ve ark., 2015).

b. Stratum lusidum

Stratum lusidum, *stratum granulozum*'un hemen üstünde ve *stratum korneum*'un altında bulunan pürüzsüz, yarı saydam görünümlü bir epidermis

tabakasıdır. Yaklaşık 5 hücre sırasından oluşmaktadır. Avuç içi ve ayak tabanı gibi aşınma ve yıpranmaya maruz kalan vücut bölgelerinde bulunmaktadır. *Stratum lusidum*'u oluşturan keratinositler ölüdür ve düzleşmiştir. Bu hücreler, keratohyalin kökenli, lipid bakımından zengin berrak bir protein olan eleidinden oluşmuştur ve bu hücrelere şeffaf (yani berrak) görünümünü veren ve suya karşı bir bariyer oluşturacak şekilde sıralanmıştır (Alkilani ve ark., 2015).

c. Stratum granülozum

Stratum granülozum, *stratum spinosum*'dan itildikçe yassı bir görünüme sahiptir. Hücreler üç ila beş katman derinliğinde düzleşir ve hücre zarları kalınlaşmaktadır. Lifli olan keratin proteinlerini ve hücrelerde lamel granül olarak biriken keratohyalin proteinlerini üretirler. Bu iki protein, *stratum granülozum*'daki keratinosit kütlelerinin büyük kısmını oluşturarak katmana taneli (yassı) bir görünüm kazandırır. Hücreler ölürken çekirdekler ve hücre organelleri parçalanır ve bunun sonucunda açığa çıkan keratin, keratohyalin ve hücre membran kalıntıları *stratum lusidum*, *stratum korneum* ve saç ile tırnak yapılarını oluşturmaktadır. Sonraki katmanlara öncü keratin üretmektedir (Alkilani ve ark., 2015).

d. Stratum spinosum

Stratum spinosum, desmozom adı verilen bir yapıyla hücrelere katılan, çıkıntılı hücre nedeniyle görünüşte dikenli bir yapıya sahiptir. Desmozomlar birbirine kenetlenir ve hücreler arasındaki bağı güçlendirirler. Bu katmanın “dikenli” yapısı boyama işlemi sonucunda görülmektedir. Boyanmamış epidermis numuneleri bu karakteristik görünümü sergilemezler. *Stratum spinosum*, *stratum bazale* katmanındaki hücre bölünmesi sonucu oluşan sekiz ila on tabaka keratinositden oluşmaktadır. Bu katmanın keratinositleri arasında serpiştirilmiş, Langerhans hücreleri yer almaktadır ve bu hücreler tabakada meydana gelen bakteriyel, yabancı partiküller ve hasarlı hücreler ile ilgili durumlarda yapıyı sararak bir makrofaj işlevi gören dendritik bir hücre türüdür. Keratin filament demetleri içermektedir. Bu katman cildi bir arada tutmaktadır (Abdo ve ark., 2020).

e. Stratum bazale

Stratum bazale (*stratum germinativum* olarak da adlandırılır) en derin epidermal tabakadır ve epidermisi, dermisin katmanları altında bulunan bazal laminaya bağlamaktadır.

Tabaka bazalındaki hücreler, bazal membran olarak adlandırılan, iç içe geçen kolajen lifleri yoluyla dermise bağlanır. Dermal papilla olarak bilinen parmak benzeri çıkıntılı yapı dermisin yüzeysel kısmında bulunur. Dermal papilla, epidermis ve dermis arasındaki bağlantının gücünü artırır; katlanma ne kadar büyük olursa, bağlantılar o kadar güçlü olmaktadır (Alkilani ve ark., 2015).

4.1.1.3. Dermis

Dermis; epidermis ve hipodermis arasında bulunan sinir ve vasküler yapıların yanı sıra epidermal olarak türetilmiş uzantıları barındıran tümleşik fibröz ve hücresel matris sistemidir. Fibroblastlar, makrofajlar, mast hücreleri ve dolaşımdaki bağışıklık hücreleri dahil olmak üzere birçok hücre tipi dermiste bulunmaktadır. Dermis, cildin esnekliğinden ve gerilme yetilerinden sorumludur ve mekanik hasara karşı koruma sağlamaktadır. Derideki su miktarını fonksiyonu düzenlemede yardımcı olmaktadır. Ayrıca dermis, duyuşal uyarıcı reseptörlerini ve yara iyileşmesinde de anahtar rol alan elementleri içermektedir (Chu, 2012).

Kan ve lenf damarları, sinirler ve saç folikülleri ve ter bezleri gibi diğer yapılar burada yer almaktadır. Dermis, fibroblastlar tarafından üretilen elastin ve kolajen liflerin birbirine bağlı bir ağını oluşturan iki bağ dokusu katmanından oluşmaktadır ve içerdği lif tiplerinden dolayı aşağıdaki fonksiyonları yerine getirebilmektedir:

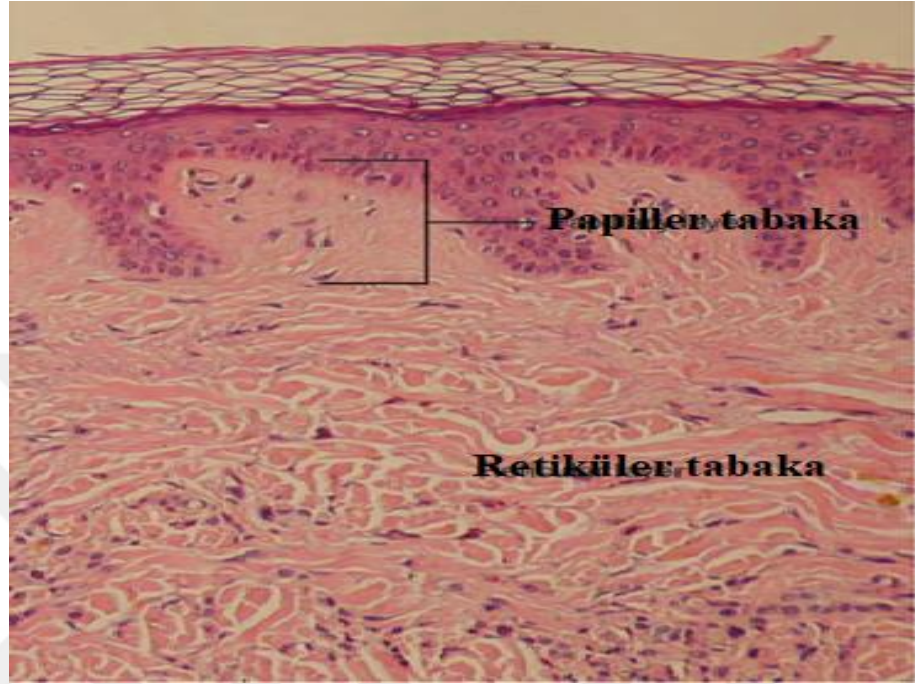
- Güç sağlamak için kollajen;
- Derinin gerilmesine izin veren elastin
- Deriye uygulanan mekanik kuvvetlerin dağılmasına yardımcı olan retiküler

lifler bulunmaktadır.

Dermis içindeki birçok hücre, deriyi onarmaya ve korumaya yardımcı olmaktadır (Hinchliff, 1996). Fibroblastlar ve doku makrofajları yara iyileşmesinde esansiyeldir. Doku mast hücreleri, yabancı maddelere yanıt olarak histamin ve heparin üretmektedir. Nötrofiller ve lenfositler gibi hücreler ise, travmaya yanıt olarak çevre dokularda kan damarlarından dışarı çıkabilmektedir (Silverthorn, 2001).

Dermis, iki ana katmandan oluşmaktadır. Bunlar epidermisin yakınındaki papiller tabaka ve daha derinde yer alan retiküler tabakadır. Bazal membran papiller dermisi ve epidermisi ayırmaktadır. Papiller tabakanın ve epidermisin dalgalı doğal yüzeyi, kesme kayma kuvvetleri uygulandığında iki tabakanın ayrılma olasılığının

düşük olduğu anlamına işaret etmektedir. Derideki su toplamış kabarcıklar, tabakaların aşırı kesme kuvvetleri ile ayrılmasına bir örnektir (Silverthorn, 2001; Seeley ve ark., 2003).



Şekil 3. Dermisin katmanları: Dermisin iki bileşeni olan papiller ve retiküler tabakayı göstermektedir. Her ikisi de bir diğerine uzanan kolajen lifleri ile bağ dokusundan yapılmış olup, arasında belirsiz bir sınır oluşturmaktadır. Epidermise uzanan dermal papillalar papiller tabakaya, alttaki yoğun kolajen lif demetleri ise retiküler tabakaya aittir (Seeley ve ark., 2003).

a. Papiller tabakası

Papiller tabaka gevşek, areolar bağ dokusundan oluşmakta, bu da bu tabakanın kolajen ve elastin liflerinin gevşek bir ağ oluşturduğu anlamına gelmektedir. Dermisin bu yüzeysel tabakası, parmak benzeri dermal papilla oluşturmak için epidermisin stratum basale'sine dönüşmektedir. Papiller tabaka içinde fibroblastlar, az sayıda yağ hücreleri (adipositler) ve çok sayıda küçük kan damarları bulunmaktadır. Buna ek olarak, papiller tabaka; bakterileri ve diğer enfeksiyonlarla savaşmaya yardımcı olan fagositleri, savunma hücrelerini, lenfatik kılcal damarlarını, sinir liflerini ve Meissner korpusları adı verilen dokunmatik reseptörleri de içermektedir.

b. Retiküler tabakası

Papiller tabakanın altında yatan, yoğun, düzensiz bağ dokusundan oluşan daha kalın bir tabakadır. Bu tabaka iyi vaskülarize edilmiş ve zengin bir duysal ve sempatik sinir kaynağına sahiptir. Retiküler tabaka, sıkı bir ağ örgüsünden oluşmaktadır. Elastin lifleri cilde bir miktar esneklik kazandırmakla birlikte hareket yeteneği de vermektedir. Kollajen lifleri, hem papiller tabakaya hem de hipodermise uzanan kolajen iplikçikleri ile yapı ve gerilme mukavemeti sağlamaktadır. Ayrıca kolajen, cildi nemlendirmek için suyu bağlamaktadır. Kolajen enjeksiyonları ve Retin-A kremleri; kollajeni dışarıdan vererek ya da kan akışını uyararak derminin onarımı ile cilt turgorunu geri kazandırmaya yardımcı olmaktadır (Seeley ve ark., 2003).

4.1.1.4. Hipodermis

Hipodermis; subkutanöz tabaka olarak da adlandırılan derminin hemen altındaki bir tabakadır ve cildin; kemiklerin ve kasların altındaki fibröz dokuya bağlanmasına hizmet etmektedir. Hipodermis ve dermis arasındaki sınırın ayırt edilmesi oldukça zordur. Hipodermis, iyi bir vaskülerize, gevşek areolar bağ dokusu ve yağ dokusu olarak işlev gören adipoz dokudan oluşmaktadır. Vücut ısı regülasyonunu ve desteğini sağlamaktadır. Ayrıca; kıl foliküllerinin tabanlarını, yağ ve ter bezi kanallarını bulundurmaktadır (Seeley ve ark., 2003).

4.1.1.5. Deri uzantıları

Deri uzantıları arasında yağ bezleri, kıllar, tırnaklar, ekrin (ter) bezleri ve apokrin bezler yer almaktadır. Bu yapılar dermisten kaynaklanıp, epidermis ve dış ortama doğru uzanmaktadır. Embriyonik gelişim sırasında, dermal ve epidermal etkileşimler bu yapıların indüksiyonu ve farklılaşması için kritik öneme sahiptir. (Maibach ve Honari, 2014). Bu uzantılar, deride bulundukları bölgelere göre sayıca değişkenlik göstermektedir. Ekrin bezler vücutta bazı özel bölgeler dışında yaygın olarak bulunmaktadır. Yaklaşık pH'sı 5 olan bir salgı salgılamaktadır. Apokrin bezler ise ergenlik dönemi ile aktif rol alan özellikle koltukaltı, anal bölge ve meme başı ile dış genital bölgelerde yer almaktadır (Saga, 2002).

4.1.1.6. Derinin fonksiyonları

1) Aşınma ve yıpranmadan korunma: Derinin maruz kaldığı sürtünme ve basınç miktarına bağlı olarak değişen kalınlık göz kapaklarında yaklaşık 1mm iken,

el avuçlarında ve ayak tabanlarında ise 1 cm kalınlığında olabilmektedir (Hinchliff, 1996). Deri dayanıklılığı, içindeki çözünmeyen protein keratinin miktarından kaynaklanmaktadır. Deride oluşan sürtünme; subkutanöz yağların amortisör görevi görmesi ile vücudu travmalardan korumaya yardımcı olmaktadır.

2) Enfeksiyon ve kimyasallara karşı koruma: Deri üzerinde çok sayıda mikroorganizma yaşamaktadır, bunlar sağlam ve sağlıklı bir deri tarafından oluşturulan bariyerleri geçemezler. Deride oluşan hasar mikroorganizmaların istilası için bir ortam sunar ve kızarıklık, şişlik, lokalize ısı, ağrı ve ateş ile karakterize bir inflamatuvar tepki ile sonuçlanmaktadır. Kan akımı artar ve enfeksiyonla savaşmak ve dokuları onarmak için lökositler ve makrofajlar hasarlı bölgeye taşınarak onarım sağlanmaktadır (Richardson, 2003).

3) Ultraviyole ışınlarına karşı koruma: Deri, vücudu zararlı ultraviyole (UV) ışınlarından korumaktadır. Epidermiste bulunan melanositler melanin pigmentini üretilip UV ışığını emerek hücresel DNA'ya zarar vermesini önlemektedir (Martini ve Seiger 2003). UV ışığına aşırı maruz kalmak, malign melanoma gibi ciddi hastalıklara yol açmaktadır. Melanin ayrıca saç ve göz irislerinin renginin belirlenmesinde de rol almaktadır. Melanin üretmeyen insanlar albino olarak adlandırılır. Keratinden yapılan kıllar, vücut ısınısını düzenlemenin yanında UV ışınlarından da korumaktadır.

4) Vücut sıcaklığının korunması: Vücut, -52 °C ile + 49 °C arasında değişen sıcaklıklarda çevresel değişikliklere karşı hayatta kalabilmektedir (Hinchliff, 1996). Sabit bir vücut sıcaklığının (37 °C) korunması, derinin önemli bir işlevidir ve bu düzenleme, vücuttaki hücresel enzimlerin normal işleyişi için gereklidir.

5) Artmış sıcaklığa yanıt: Dermisin hemen altındaki deri altı tabakasındaki arterler ve damarlar, dermise kan sağlayan küçük arteriollere ve kılcal damarlara bağlıdır. Kan akımı, bu dermal kan damarlarının dilatasyonu ve daralması ile değiştirilmektedir. Deride kan akışı, ısı kaybetme veya muhafaza etme ihtiyacına yanıt olarak yaklaşık 250 ml/dak ile 3L/dakika arasında değişebilmektedir. Vücudun ısısı yükseldiğinde, dermiste bulunan kan damarları dilate olur ve deriye dokunulduğunda ısınır, pembe veya kırmızı renk oluşmaktadır.

Kan, ısıyı deri yüzeyine taşıyarak vücuttan uzaklaştırmaktadır. Ekrin ter bezleri vücut ısınısını azaltmaya yardımcı olmaktadır. Bu bezler yaklaşık 2–5 milyon

civarındadır (Martini ve Seiger 2003) ve bunların dağılımı farklı vücut bölgelerine göre değişkenlik göstermektedir. Avuç içi ve ayak tabanlarında $400 / \text{cm}^2$ ve sırtta sadece $70 / \text{cm}^2$ vardır (Hinchliff, 1996). Bu bezlerin kendi sinirleri ve kan damarları vardır ve cildin sıcaklığı 35°C 'nin üzerine çıktığında ter üretmektedirler. Terin, % 99'u su; % 1'i sodyum, üre, laktik asit ve potasyumdan oluşmaktadır.

6) Sıcaklığın düşmesine tepki: Soğuk havalarda, ter üretimi ile deri kanlanması azalmaktadır (Marieb, 2003). Deri altı doku ve yağ katmanları ile vücut ısı dengesi sağlanmaktadır. Vücut ısını korumanın diğer bir yolu da vücuttaki kıllardır. Küçük arrektör pili kaslar sayesinde kıllar dikey boyuta geçerek ısı yalıtımını sağlamaktadır.

7) Dış uyaranların alınması: Deri en büyük duyu organıdır ve duyu sinir reseptörleri bir dizi farklı uyararı algılamaktadır; basınç ya da esneme gibi mekanik, ısı ve soğuk açısından termal bunlara örnektir (Marieb, 2003). Dermis boyunca sinir uçları varken epidermisde yoktur. Bunların dağılımı da değişmektedir. Örneğin, parmak uçları ve dudaklar çok hassas duyuşal reseptörlere sahiptir ve oldukça iyi bir duyuşal ayrımcılık sağlamaktadır (Hinchliff, 1996).

8) Emilim ve atılım: Salgı bezleri dermiste kıl foliküllerinin çıkıntıları olarak yer almaktadır. Deriyi suya dayanıklı hale getirmek için lipit yapıda olan, sebum, salgılanmaktadır. Sebum bakterisit özelliğe de sahiptir. Salgı bezleri, kıl folikülleri ve stratum corneum tabakası deriden emilimi ve atılımı sağlamaktadır (Martini ve Seiger, 2003).

9) Besin ve su depolama: Deri hücrelerinde depolanan suya, kan hacmi düştüğünde (Hinchliff, 1996) örneğin hasta hemorajileri gibi acil durumlarda erişilebilmektedir. Deri ayrıca yağ dokusu içinde depolanan trigliseritler (yağ asitleri ve gliserol) formunda potansiyel bir enerji kaynağı da içermektedir (Martini ve Seiger, 2003). UV radyasyonuna maruz kalmak, sadece melanin üretimini teşvik etmekle kalmaz, aynı zamanda dermiste bir kolesterol bileşiğinden (7-dehidro-kolekalsiferol) D vitamini üretimini de başlatmaktadır.

10) İletişim: Hekimler, hastanın sağlığı hakkında, hastaların derisini inceleyerek çok fazla bilgi edinebilmektedir (Hinchliff, 1996). Deride fizyolojik değişiklikler birçok hastalık belirtici olarak yol göstermektedir.

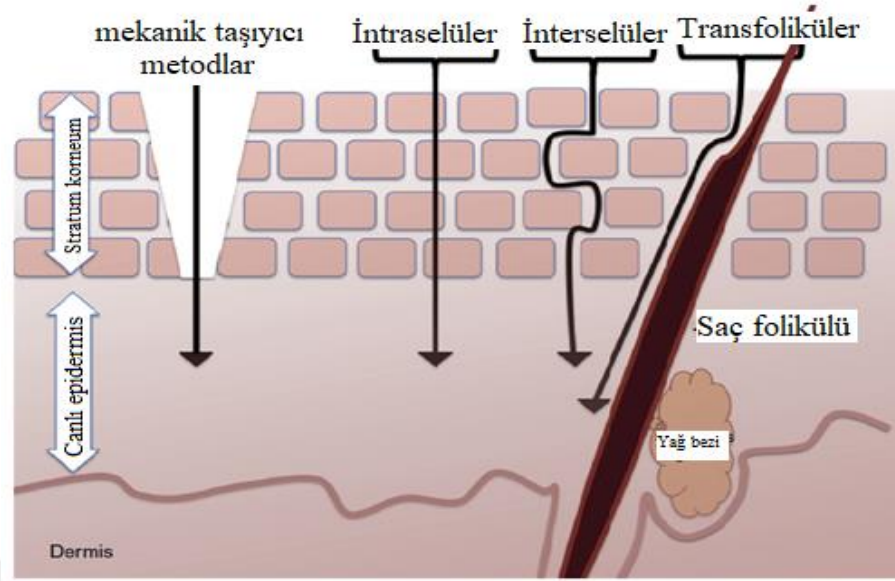
Buna örnek olarak; sıcakta deri kızarması ve ter atımı, ağrı çekerken solgun olma eğilimi, kalp krizi geçiren hastalarda genellikle gri görünüm, deride sarı bir renklenme sarılık belirtisi ve deride mavi renk oluşumu (siyanoz) oksijen eksikliği belirtisi olarak değerlendirilmektedir. Ayrıca; fizyolojik sağlık sadece deri rengi ile değil, görünüşü, elastikiyeti ve hassasiyeti ile de belirtilmektedir (Richardson, 2003).

Günlük yaşamın psikolojik yönleri de deriyi etkilemektedir. Çoğu insan görünümünü iyileştirmeye çalışmakta, saç ve makyaj ile güzelliği amaçlamaktadır fakat cildimiz bazen bizi ele vermektedir. Örnek olarak; utanırken kızarmak, heyecanlandıkça terlemek verilebilir. Ayrıca; “Lie-detektör” testleri, gerçeği belirlemek için bu istemsiz terleme reaksiyonuna dayanmaktadır (Richardson, 2003).

4.2. Deriden Geçiş İle İlgili Bilgiler

Stratum korneum tabakası, 15-30 kat korneositden oluşan 3-20 mikrometre kalınlığındadır. Bu hücreler epidermisde farklılaşarak ‘tuğla’ görüntüsü oluşturmakta ve hücreler arası kolesterol, fosfolipitler ‘harç’ görünümü almaktadır. Transkütanöz su kaybına ve eksojen materyallerin girişine karşı etkili ve sınırlayıcı bir bariyer sağlamaktadır. Bu bariyerin oluşumuna ekstraselüler lipidler katkıda bulunmaktadır. Ekstraselüler lipidlerin (seramidler, kolesterol ve serbest yağ asitleri) düzenlenmesi, bunların hidrofobikliği, bileşimi bariyerin yapısını etkilemektedir. Deriden emilim, farklı vücut bölümleri arasında ve bireyler arasında değişmektedir, bu bölgesel iç ve bireyler arası varyasyonlar kısmen lipid bileşimi ve *stratum korneum* kalınlığındaki değişikliklerle ilgilidir. Bir dizi biyolojik ve anatomik faktör perkütan penetrasyon oranını ve boyutunu etkilemektedir. Birçok ilaç etken maddesi için ilk geçiş etkisi ve advers etkiden dolayı ilaç uygulama yollarından birisi transdermal yoldur. İlacın *stratum korneum*dan geçişinde ilaç partiyon katsayısı önemlidir. Deriden geçiş mekanizmaları 3 şekilde gerçekleşmektedir (**Şekil 4**) (Saga, 2002; Chu, 2012; Maibach ve Honari, 2014).

- Transselüler (intraselüler) geçiş
- İnterselüler (hücreler arası) geçiş
- Deri uzantıları (kıl folikülleri, yağ ve ter bezleri) aracılığıyla geçiş



Şekil 4. Korneositlerin düzenlenmesi ile cilde penetrasyonun şematik yolları
“Tuğla ve harç” modeli (Werner ve Grose, 2003).

4.2.1. Transselüler (intraselüler) geçiş

İntraselüler geçişte etken madde hücrelerin içinden geçmektedir. Etken madde öncelikle *stratum korneum*u geçip hücrelerin lipit yapılı membranını daha sonra ise hidrofilik hücre ortamını geçmesi gerekmektedir. Deriye bu yol ile geçiş uzun bir süreç almaktadır (Değim, 2009; Chu, 2012; Maibach ve Honari, 2014). Bu yol, hidrofilik molekülleri aktarmak için uygun bir yol oluştursada bir dirençle karşılaşır, çünkü moleküller her hücrenin lipofilik zarından, daha sonra keratin içeren hidrofilik hücresel içeriklerden ve daha sonra hücrenin fosfolipid iki tabakasından geçmelidir. Bu nedenle, penetranın hücre matriksinden geçmesi için bölümlendirme ve difüzyon aşaması gereklidir (Flynn, 1996; McCarley ve Bunge, 2001). Bu yolla çok az ilaç deriden geçiş sağlamaktadır. Transselüler yol, keratin yapısını değiştirerek korneositlerin geçirgenliğini arttırmak için üre gibi bir penetrasyon artırıcı kullanıldığında önemlidir (Morrow ve ark., 2007; Nafisi ve Maibach, 2018).

4.2.2. İnterselüler(paraselüler) geçiş

Bu geçiş, hücreler arası boşluk kullanılarak yapılmaktadır. Etken madde bu yolda; hücre membran protein ve lipit yapılarıyla etkileşmektedir. İntraselüler geçişe göre daha hızlıdır. Küçük molekül ağırlıklı maddeler bu geçişi kullanabilmektedir (Değim, 2009; Chu, 2012; Maibach ve Honari, 2014). Bu yolun bariyer özelliği, korneositlerin oluşturduğu kıvrımlı yapıdan kaynaklanmaktadır.

Dolayısıyla etken madde, lipit tabakalara bölünerek ve iç tarafa difüze edilerek alternatif lipitlerden ve sulu alanlardan geçmek zorundadır. Küçük moleküller; lipofilikleri, çözünürlükleri, moleküler ağırlık ve hidrojen bağı yetenekleri gibi fizikokimyasal özelliklerine göre bu yol ile geçiş sağlamaktadır. Her ne kadar *stratum korneum* kalınlığı sadece 20 µm olsa da, deriden geçen çoğu molekülün gerçek difüzyon yolu 400 µm civarındadır. Geçirgen moleküllerin gerçek yolundaki 20 katlık artış penetrasyon hızını önemli ölçüde azaltmaktadır. Hücreler arası yol çoğu etken madde için tercih edilmekle beraber esas olarak yüksüz lipofilik moleküller için uygundur (Abdel-Mottaleb ve Lamprecht, 2016; Nafisi ve Maibach, 2018).

4.2.3. Deri uzantıları aracılığıyla geçiş

Bu yolakta maddeler *stratum korneum* tabakasını atlayarak geçiş mekanizması göstermektedirler. Suda çözünürlüğü yüksek olan ve polar maddeler için ter bezleri ve kıl folikülleri deriden geçişte tercih edilmektedir (Saga, 2002; Değim, 2009). Geniş bir difüzyon alanı sağlayan bu yol, bir bileşiğin sistemik dolaşıma ulaşmak için izlemesi gereken en kısa yoldur. Lenf ve kan dolaşımı ile beslenen saç folikülleri nanopartiküllerin penetrasyonu ve muhtemelen sistemik erişim için potansiyel bir hedeftir (Toll ve ark., 2004). Dermal mikrosirkülasyona doğrudan erişime sağlarlar, ancak tüm cilt yüzeyinin sadece % 0.1'ini kapsamaktadır ve bu nedenle ilaç verilmesine minimal katkıda bulunmaktadır (Roberts ve Walters, 2007). Sınırlayıcı olmasına rağmen Liu ve arkadaşlarının yaptığı çalışmada insan göğüs derisinden verilen kafeinin üçte birinin foliküler yol ile absorbe olduğu gösterilmiştir (Liu ve ark., 2011). Moleküllerin sebum içindeki partiyon oranlarında sebumdan epidermisin alt katmanlarına difüzyonu açısından ayrı bir geçiş yolu oluşturmaktadır (Flynn ve Stewart, 1988; Nafisi ve Maibach, 2018).

4.2.4. Geçirgenliği artırmak için uygulanan stratejiler

Transdermal taşıyıcı sistemlerin en önemli dezavantajı deriden geçişin sınırlı olmasıdır. Bu nedenle, geçirgenliği perkütan olarak arttırmak için çeşitli çalışmalar yapılmıştır. **Şekil 5**'te penetrasyonun artırılması için çeşitli stratejiler gösterilmektedir. Temelde bu stratejiler üç mekanizma ile belirlenmektedir:

- 1) *Stratum korneum*'un fizikokimyasal özelliklerini değiştirmek.
- 2) *Stratum korneum*'un hidrasyon özelliklerini değiştirmek.

3) Taşıyıcı mekanizmalar aracılığı ile hücreler arası alandaki lipidlerin ve proteinin yapısını değiştirmek (Csizmazia ve ark, 2012).

4.2.4.1. İlaç-taşıyıcı ilişkisi

1) İlaç ve ön ilaç seçimi

Kullanılacak aktif bileşen, farmakolojik ve/veya fizyokimyasal özellikleri göz önünde bulundurularak seçilmelidir. İlaç seçimi için ideal özellikler şunlardır:

-Difüzyon katsayısı yüksek olduğunda 600 Da'dan küçük moleküller tercih edilmelidir.

-Yağda ve suda iyi çözünürlük göstermelidir.

-Yüksek ve yeterli partisyon katsayısına (1-3) sahip olmalıdır.

-Erime noktası < 200 °F olmalıdır.

-Deride metabolize olmamalıdır (Kataria ve ark, 2014; Kaur ve ark., 2014).

2) İyon çifti

Yüklü moleküller her zaman deriye kolaylıkla nüfuz edemezler. Bununla birlikte, lipofilik iyon çifti tekniği epidermal penetrasyonu artırabilmektedir. Bu teknikte, zıt yüklü moleküller epidermise daha iyi nüfuz ederek etkin maddenin salımını gerçekleştirmektedir. Salınan bu maddeler iyon çifti gibi davranmaktadır. (Goyal AK ve ark., 2013; Goyal G ve ark., 2015). Valenta ve arkadaşları iyon çiftinin etkisinin önemini lignokainin geçirgenliği üzerinde saptamıştır. Difüzyon çalışmaları, farklı pH değerleri olan 4.0, 6.0, 7.0 ve 8.0'da polidimetilsiloksan (PDMS) yoluyla gerçekleştirilmiştir. Kararlı durum lignokain akışı, farklı karşı iyonlar kullanılarak 2.45 kata kadar arttırılmıştır. En yüksek akı lignokain morfolinopropan sülfonat ile ölçülmüştür (Valenta ve ark., 2000). Riserdronat, çeşitli kemik bozukluklarının tedavisinde kullanılan osteoklastik bir inhibitördür. Oldukça iyonize, asidik ve düşük permeabiliteye sahiptir. Tüysüz fare üzerinde in vitro olarak test edilen L-arginin ile iyon çifti çözeltisi sonucunda; akışın ($14.13 \pm 5.49 \mu\text{g} / \text{cm}^2$) 36 kez ($475.18 \pm 94.19 \text{ g} / \text{cm}^2$ ve $511.21 \pm 106.52 \text{ g} / \text{cm}^2$) arttığı gösterilmiştir (Nam ve ark., 2011).

3) Ötektik karışımlar

Çözünürlük, çoğunlukla bir maddenin erime noktasından etkilenen bir faktördür ve deriden geçişte önemlidir. Erime noktası ne kadar düşük olursa, deri

lipitlerinde çözünürlük daha fazla olmaktadır (Garg ve Goyal, 2014). Yüksek erime noktasını düşürmek için ötektik karışımlar tercih edilmektedir.

Ötektik karışımlar, oda sıcaklığında katı formda iken 2 veya daha fazla maddenin belirli oranlarda karışımıyla oluşan ve erime sıcaklığını düşüren karışımlardır (Fiala ve ark., 2010). Örneğin, terpenli ibuprofen, metil nikotinli mentol, yağ asitleri ile propranolol ve mentol ile lignokain verilmektedir.

4.2.4.2. Deri katmanlarında modifikasyon

1) Hidratasyon

Su hem hidrofilik hem de hidrofobik ilaçların deriden nüfuz etmesi için önemlidir. Normal koşullarda, *stratum korneum*'da % 10-20 oranında su bulunmaktadır. Epidermisin hidrasyonu, permeasyonun artırılması için önemli bir parametredir. Bu teknikte, suda uzun süre bekletilmiş deri bol miktarda suyu emebilmektedir. Doğal Nemlendirici Faktör (NMF), korneumun higroskopik özelliği için aracı görevi görmektedir. Temel olarak serbest amino asitler ve bunların tuzlarından oluşmaktadır. Deri hidrasyonu, keratinlerin şişmesine ve lipitlerin paketlenmesine neden olmanın yanı sıra, polar ve polar olmayan yolları da etkilemektedir (Haftak ve ark., 1998).

2) Kimyasal permeabilite artırıcıları

Kimyasal penetrasyon artırıcılar; *stratum korneum*'un lipit yapısını bozarak, hücreler arası proteinle etkileşirler veya ilacın partiyonunu artırarak *stratum korneum*'dan geçişini artırmaya yardımcı olmaktadır (Garg ve ark., 2013).

Kimyasal artırıcılar aşağıdaki özellikleri içermelidir:

- Toksik ve alerjen olmamalıdır.
- Hızlı çalışma aktivitesine sahip olmalıdır.
- Tek yönlü olmalıdır.
- Hem ekspanyanlarla hem de ilaçlarla uyumluluk göstermelidir (Garg ve ark., 2012; Erdal ve ark., 2014). **Tablo 1**'de kimyasal penetrasyon artırıcılar ve örnekleri belirtilmiştir.

Tablo 1. Kimyasal penetrasyon artırıcılar (Abdel-Mottaleb ve Lamprecht, 2016).

Kimyasal gruplar	Örnekler
Hidrokarbonlar	Alkanlar, alkenler, mineral yağlar
Alkoller	Gliserol, glikol, etanol
Asitler	Oleik asit ve diğer yağ asitleri
Aminler	Primer, sekonder ve tersiyer aminler
Amidler	Pirolidon (N-metil-2-pirolidon, 2-pirolidon) azones
Esterler	İzoperopi myristat
Sümfaktanlar	Sodyum lauril sülfat, sorbitan monolaurat, polisorbitat 80, dodesil dimetil amaonyumpropan sülfat.
Terpenler, terpenoitler ve esansiyel yağ asitleri	Mentol, limonen
Sülfoksitler	Dimetil sülfoksit (DMSO)
Lipitler	Fosfolipitler

4.2.4.3. Deri katmanlarının kaldırılması

1) Mikroıǵneler

Mikroıǵneler hem hipodermik ıǵne hem de transdermal yama olarak kullanılmaktadır. Bu aletler, bir ilaç havuzu ve sinirlere ulaşmayan mikroıǵne ıkıntılılarıyla ilaç geirgenliǵine yardımcı olmaktadır. Bu ıǵneler 200-750 mikron uzunluǵundadır ve 150–650 mikroıǵne / cm² olacak şekilde yer almaktadır. ıǵne materyalleri; silikon, metal, şeker ve plastiklerden oluşmaktadır. (Duan ve ark., 2011). Bu mikroıǵneler dört başlıkta toplanmaktadır: (i) Yama yaklaşımı olan (epidermal tabakaya direkt yamayı lokal olarak uygulama), (ii) Kaplama ve deriye batırma yaklaşımı (ilaçla birleştirilen ıǵneler, farmakolojik aktif kısmın salınması ya da nmesi yoluyla gerçekleşmektedir), (iii) Biyobozunur mikroıǵne (ilacın dahil olduǵu biyobozunur polimerik mikroıǵnenin deriye batırılması) ve (iv) İçi boş mikroıǵne (içi boş bir deliǵe sahip ıǵneler ile epidermal yüzeyin delinmesi) (Garg ve ark., 2011). Bu yöntemi içeren birçok klinik araştırmalar bulunmaktadır. İnsülin,

hormonlar, kalsitonin ve çeşitli peptit ve proteinler gibi büyük molekül ağırlıklı ilaçlar için iyi bir yöntem olduğu ileri sürülmektedir (Donnelly ve ark., 2014).

2) Mikrodermabrazyon

Mikrodermabrazyon, seçime bağlı olarak *stratum korneum*'u kaldırarak deriden geçirgenliğin artırılması esasına dayanmaktadır. Deride açılan bu kesinin derinliği hastanın ihtiyacına bağlıdır. Bu teknik; peptitler, insülin ve aşılar gibi büyük moleküler ağırlıklı ilaçlar için oldukça önem teşkil etmektedir. Bu yöntemde, epiderminin tamamen çıkarılması tercih edilmemektedir. Skountzou ve arkadaşlarının yaptığı çalışmada influenza aşısının topikal yoldan verilmesi yoluyla transkutan immünizasyon gözlemlenmiştir. Dış deri bariyeri, büyük aşı moleküllerinin veya partikül antijenlerin deriden bağışıklık hücrelerine erişmesine izin veren etanol-su hidrasyonu ve mikrodermabrazyon yöntemi ile birlikte kullanılmasıyla aşılabilmektedir (Skountzou ve Kang, 2009).

3) Foliküler taşıma

Ter bezleri ve saç folikülleri zengin invaskülarizasyon içermektedir. Saç folikülleri 172 ± 70 mm, yağ folikülleri 86 ± 37 mm boyutundadır ve ilaç taşıma yollarından biridir. Bu hidrofilik ve aynı zamanda yüksek moleküler ağırlıklı moleküller için topikal preparat hazırlanmasında önem arz etmektedir (Garg ve ark., 2011).

4.2.4.4. Elektriksel teknikler

1) Ultrason

Fonoforez veya sonoforez olarak da adlandırılmaktadır. Bu yöntemde geçirgenlik, ultrasonik dalgalar ile sağlanmaktadır. Mekanizma iki yöntem ile gerçekleşmektedir.

(a) Ses dalgalarının deriye uygulanması ile lipidlerin akışkanlığını artırarak, geçirgenliği transselüler yol ile sağlamaktadır.

(b) Ses dalgalarının deride porlar oluşturması ile protein veya aşılar gibi büyük moleküler ağırlıklı ilaçların geçmesi sağlanmaktadır.

Çalışmalarda bu yöntem hastalarda deksametazon, ketoprofen veya lidokain geçirgenliği için tercih edilmiştir fakat bu yöntemde ses dalgalarının ısı enerjisine dönüşmesi nedeniyle bazı avantaj ve dezavantajları bulunmaktadır.

Avantajları arasında; ilaç penetrasyonunu artırması, kontrollü salımın uygulanması, sistemik etkiye neden olmaması yer almaktadır. Dezavantajları ise; zaman alıcı bir yöntem olması, tahrişe, karıncalanmaya ve yanmaya sebep olmasıdır (Tiwari ve ark., 2004).

2) İyontoforez

İyonize ilacın elektriksel akım ile deriden geçişi olarak tanımlanmaktadır. Galvanik veya voltaik hücre ile 0.5 mA / cm'lik impulsar şeklinde uygulanmaktadır. Pozitif yüklü iyon ve negatif yüklü iyonları çeken katot ve anot sistemini içermektedir. (Garg ve Goyal, 2012). Mekanizması Faraday yasasına dayanmaktadır. Bu yasaya göre, cilde verilen ilaç uygulanan akımla doğru orantılıdır. Cildin pH'sı önemli bir rol oynamaktadır, cilt pH'sı ne kadar yüksek olursa, deri geçirgenliği de o kadar fazla olmaktadır (Dhote ve ark., 2012). Yapılan bir çalışmada, enflamasyon ve atopik dermatit tedavisinde nükleer faktör-kappa B'nin (NF-kappa B) topikal uygulaması incelenmiştir. Sonuçlar iyontoforezin NF-kappa B oligonükleotitin (ODN) transdermal yoldan verilmesi için yararlı ve umut verici bir teknik olduğu gösterilmiştir (Hashim ve ark., 2010). Gomez ve arkadaşlarının başka bir çalışmada, osteoporez tedavisi için topikal kalsiyum ve fosfat iletimini incelemişlerdir. Sonuçlar kemikteki kalsiyum ve fosfatın restorasyonu ile kemik yoğunluğunda bir artış olduğunu göstermiştir (Gomez ve ark., 2012).

3) Magnetoforez

Bu yöntemde, deriye nüfuz eden çözünen maddenin etrafına manyetik alan uygulanmaktadır. Örneğin, benzoik asit diyamanyetik bir maddedir ve manyetik alan etrafa uygulandığında, difüzyon özelliklerini arttırmaktadır. Bu yöntemle ilişkili en büyük sınırlama, *stratum korneum*'un özelliklerini değiştirebilmesidir (Garg ve ark., 2015).

4) Elektroporasyon

Bu uygulama, milisaniyede >100V olacak şekilde kısa elektriksel iletimleri içermektedir. Bu teknik iki mekanizma ile çalışmaktadır; birincisi lipit çift katmanlarında, korneositlerde por oluşumudur, ancak küçük yüklü moleküller bu yol ile geçemezler. İkincisi, yüksek voltaj uygulayarak epidermiste sulu porlar oluşturarak yüksek geçirgenlik sağlamaktır (Arora ve ark., 2012). Eriksson ve arkadaşları çalışmalarında, prostat kanserini tedavi etmek için prostat spesifik

antijeni kodlayan DNA aşısını elektroporasyon tekniği ile transdermal olarak çalışmışlardır. Prostat kanserinin nüks ettiği hastalarda başarılı biyokimyasal sonuçlar elde ettiklerini bildirmişlerdir (Eriksson ve ark., 2013). Proteinlerin, oligonükleotidlerin, küçük moleküllerin, heparin, insülin, dekstran ve C vitamininin bu yöntemle verilmesi ile ilgili pozitif yönlü çalışmalar bulunmaktadır. Elektroporasyon iki tiptir. Birincisi tersinir elektroporasyon; burada elektrik iletimleri deriden geçirgenlikte kısa süreli artışlar yapar ve hücre canlılığı korunmaktadır. Bu yaklaşım biyoteknoloji ve tıptaki uygulamalarda yer almaktadır. İkincisi ise geri dönüşümsüz elektroporasyon olup; elektrik iletimleri deriden geçirgenliği artırırken, hücre ölümüne veya nekroza yol açmaktadır. Bu yöntem gıda endüstrisinde ve sterilizasyon amaçlı kullanılmaktadır (Marwah ve ark., 2016).

5) Fotomekanik dalga

Bu teknik makromoleküllerin (40 000 Da) iletilmesini sağlamaktadır. Cilt gençleştirme ve akne skarının iyileşmesi gibi dermatolojik alanlarda da kullanımı mevcuttur. Aynı zamanda hedeflendirilmiş polistiren insizyonu ile üretilen lazerle oluşturulan stres basınç dalgası olarak da adlandırılmaktadır (Lee ve ark., 1999).

4.3. Yara

Yara, doku zedelenmesi veya bütünlüğünün bozulması olarak tanımlanmaktadır. Deri; epidermis ve dermis koruyucu bariyerlerinden oluşmaktadır. Bu bariyerler hasar aldığında yara iyileşmesi tek bir bölgeyle kalmaz; hücresel, fizyolojik ve biyokimyasal birçok mekanizmayı içermektedir (Demidova-Rice ve ark., 2012).

4.3.1.Yara tipleri

- **Akut yara:** Yanıklar, travmatik yaralanmalar ve cerrahi olarak oluşturulmuş yaraları içermektedir (Li ve ark., 2007). Onarım süreci düzenli ve zamanında gelişir. Anatomik ve fonksiyonel bütünlük daha iyi kazanılır. Plateletler, keratinositler, immün sistem hücreleri, mikrovasküler hücreler ve fibroblastlar bu proseste önemli rol oynamaktadır (Strodtbeck, 2001).
- **Kronik yara:** İyileşme süreci uzun ve zor olan ya da iyileşemeyen yaraları kapsamaktadır. Akut yaradan farkı kronik yaranın iskemi, hipoksi veya enfeksiyon bulundurmasıdır (Demidova-Rice ve ark., 2012).

- **Abrasyon (Aşınma):** Yüzeysel deri kaybı olabilen, yanıklar gibi sinir uçları ortaya çıkan ağrılı yaralanmalardır.
- **Kesik:** Doku kaybı olmayan neşter gibi keskin bir nesneden kaynaklanan yaralardır.
- **Ülser:** Bağ doku ile birlikte epitel yüzeyde hasarları olan yaralardır.
- **Cerrahi eksizyon:** Bir neşter (keskin bıçak) veya başka bir kesme aleti kullanan bir doktor veya cerrahın neden olduğu yaralardır (Strodtbeck, 2001).

Bu sınıflandırmaya ek olarak Hastalık Kontrol ve Önleme Merkezleri (CDC) tarafından tanımlanan Cerrahi Yara Sınıflandırma Dereceleri (I – IV) belirtilmiştir. Bunlar;

Sınıf I / Temiz: İnflamasyonun ve enfeksiyonun olmadığı, solunum, beslenme, genital veya idrar yolu ameliyat yaralarına ek olarak, temiz kapalı yaralar yer almaktadır.

Sınıf II / Temiz-Kontamine: Solunum, beslenme, genital veya idrar yollarının kontrollü koşullar altında olduğu ve olağandışı bir kontaminasyon olmayan ameliyat yaralarını kapsamaktadır.

Sınıf III / Kontamine: Açık, kaza yaralanmalarını içermektedir. Ayrıca, steril bir teknikte (örneğin açık kalp masajı) veya gastrointestinal yaralanmalar ve enflamasyonun meydana geldiği insizyonlarda, büyük çaplı kırılmalar bu kategoride yer almaktadır.

Sınıf IV / Kirli-Enfekte: Cansız dokuya sahip eski travmatik yaralar ve mevcut klinik enfeksiyonu veya iç organların hasar aldığı yaralanmaları içermektedir (Onyekwelu ve ark., 2017).

4.3.2. Yara iyileşmesi

Temel olarak yara iyileşmesi 4 fazdan oluşmaktadır:

1. Hemostaz
2. İnflamasyon
3. Proliferasyon/ granülasyon
4. Remodeling/ maturasyon (Li ve ark., 2017)

4.3.2.1. Hemostaz

Yara başlangıcında kan ve lenfatik sıvı dışarı çıkmaktadır, bunu takiben koagülan sistem aktive olup hem instrinsik hem ekstrinsik faktör ile kan pıhtılaşma mekanizması aktive olmaktadır. İnstrinsik etki trombositlerden, ekstrinsik etki ise yaralı bölgeden kaynaklanmaktadır. Vazokonstriksiyon sonrası hasarlı endotele plateletler tutunur ve adenosin difosfat (ADP) aracılığıyla yaralı bölgede trombosit kümeleşmesi sağlanmaktadır. Kısa süreli vazokonstriksiyon sonrası damar dilate olarak kan komponentlerinin akışı gerçekleşir. Hemostaz ve enflamasyon fazları ayrı ayrı olarak değerlendirilse de süreç olarak birbiri içerisinde gerçekleşen olaylardır. Beyaz kan hücrelerinin yanı sıra trombositlerden birçok sitokin ve pıhtılaşma faktörü de salınmaktadır (Martin, 1997; Hardwicke ve ark., 2008; Demidova-Rice ve ark., 2012) .

Platelet ilişkili büyüme faktörü (PDGF) , faktör 9, transforme edici büyüme faktörü beta (TGF- β), damar endoteli büyüme faktörü (VEGF), fibroblast büyüme faktörü (FGF) hem anjiyogenezi hem reepitelizasyonu uyarmaktadır. PDGF. fibroblastlar için kemotaktik bir ajan olup TGF- β ile birlikte fibroblast mitozunu uyarak sonraki fazlarda kolajen fibril yapısının oluşumunu sağlamaktadır. Fibrinojenin fibrine dönüşümü ile enflamasyonun hücresel bileşeni olarak yapısal desteği de oluşturmaktadırlar (Habif, 1996; Tocco ve ark., 2012).

4.3.2.2. İnflamasyon

Hemostazın koagülasyon fazında enflamasyon fazı da başlamaktadır. Kemotaktik ajanlarla monositler ve makrofajlar bölgeye toplanır ve ilk 6-8 saat içerisinde polimorfo nükleer lökositler (PMN) yarayı tıkamaktadır. TGF- β damar içinde PMN'lerin migrasyonunu kolaylaştırır ve 24-48 saat içerisinde PMN'ler maksimum sayıya ulaşmaktadır. Makrofajlar ise ölü hücre atıklarını ve bakterileri fagosite etmektedir. FGF, TGF- β ve TGF- α ; PDGF ve aktive olmuş kompleman sistem komponentlerinden C3a ve C5a salımı için kemotaktik rol oynamaktadır. İnflamasyon süresinde, monositler damar dışına çıkarken, makrofajlar bu olayı sonlandırmaktadır. Makrofajlar bu süreci temizlerken bir yandan da 3-4 gün içerisinde çeşitli büyüme faktörlerini üretmektedirler. Endotel hücrelerinin çoğalmasını düz kas hücrelerinin ikiye katlanmasını ve fibroblast çevrenin

oluşmasına aracılık etmektedirler. Yara iyileşmesinde makrofajlardan TGF’ler, sitokinler, IL-1, tümör nekroz faktör (TNF) ve PDGF salınmaktadır (Habif, 1996).

4.3.2.3. Proliferasyon/ granülasyon

Bu faz birçok alt fazı içermektedir. Buradaki alt fazlar iç içe geçmiş bir procestir. Bu alt fazlar fibroplazi, matriks birikimi, anjiyogenez ve tekrar yeni epitelizeasyon olarak adlandırılmaktadır. 5-7 gün içerisinde fibroblastlar yara bölgesine göç etmektedirler. Kolajen yapı bölgeyi sarmaktadır. Normal yara iyileşme sürecinin başında tip 3 kolajen baskın iken sonraki süreçte tip1 kolajen yer almaktadır (Cho ve Lo, 1998). Tropokolajen, tüm kolajen tiplerinin prekürsörüdür ve tropokolajen endoplazmik retikulumda prokolajene dönüşür, prokolajen ekstraselüler boşluğa salınarak peptidazlar aracılığıyla kolajen fibrillerini oluşturmaktadır. Daha sonra heparan sülfat, hyaluronik asit, kondrotin sülfat ve keratin sülfat içeren glikozaminoglikanlar (GAG) ve fibronektinler yarayı sarar ve proteoglikanlar kovalent bağlanarak protein çekirdeği ve bir matriks oluşumunu sağlamaktadırlar (Hardwicke ve ark., 2008; Demidova-Rice ve ark., 2012).

Yara iyileşmesinde anjiyogenez oluşumu; endotelial hücrelerin maturasyonu, migrasyonu ve mitozu ile gerçekleşmektedir. FGF ve VEGF anjiyogenezi modüle etmektedir. Re-epitelizasyon, yara periferine hücre göçü ile oluşmaktadır. Hücreler öncelikle ince bir epitelyum tabaka oluşturur daha sonra epidermal büyüme faktörleriyle yara iyileşmesi devam etmektedir. Bu alt fazların sonucunda temiz ve kontamine olmamış yara 4 hafta gibi bir sürede iyileşmektedir (Tocco ve ark., 2012).

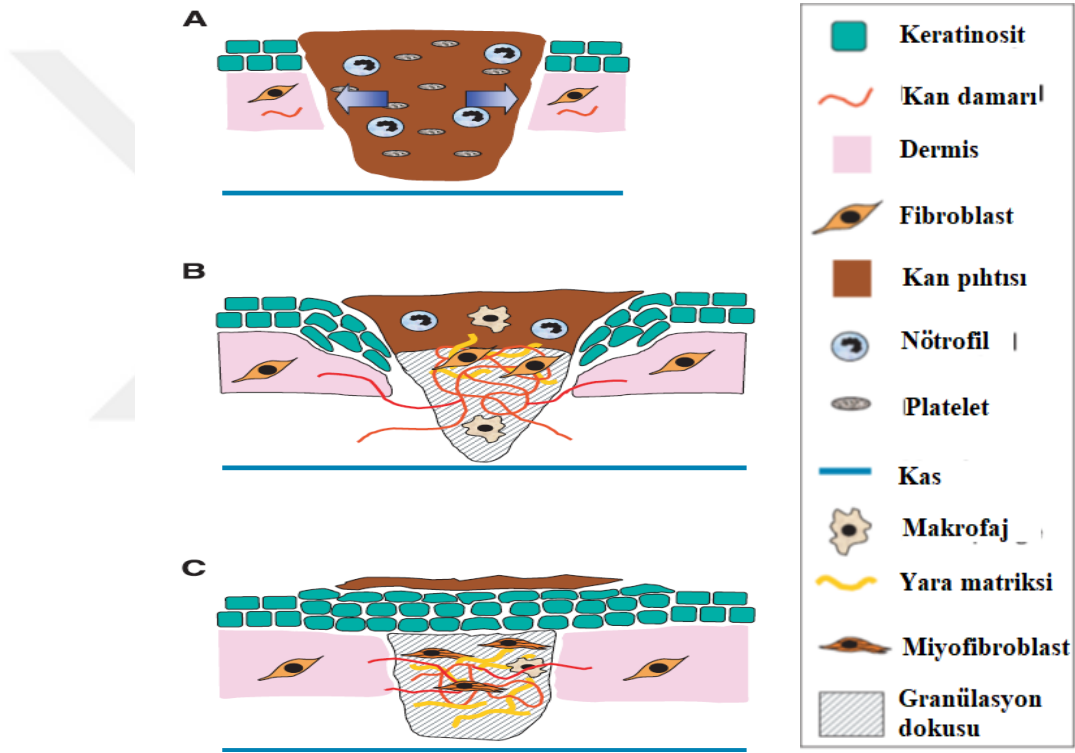
4.3.2.4. Remodeling/ maturasyon

Üç haftanın sonunda yara hızlı değişiklikler geçirerek tekrar modellenir ve bu süreç yara başlangıcından yıllar alabilen bir süreçtir. Kolajen yıkımı ve birikimi dengeli bir formda gerçekleşmektedir. Yara alanında devam eden bir fibroblast proliferasyonu yer almaktadır. Deri, maksimum gerimini 12 hafta sonunda tamamlayarak orijinal haline dönüşmektedir (Habif, 1996; Sorg ve ark., 2017).

4.3.3. Yara iyileşmesinde rol alan büyüme faktörleri

Yara iyileşme mekanizmasında; enflamasyon fazı, yeni doku oluşumu ve dokunun yeniden modellenmesi dahil olmak üzere bir dizi olay yer almaktadır. Yaralı alanın (**Şekil 5**) onarım işlemi, çeşitli büyüme faktörleri, sitokinler ve düşük moleküler ağırlıklı bileşiklerin, yaralı kan damarlarının serumundan ve degranüle

edici trombositlerden salınmasıyla hasardan hemen sonra başlamaktadır. Kan damar yapısının bozulması çapraz bağlı fibrin, fibronektin, vitronektin ve trombospondin gibi ekstraselüler matriks proteinleri ile kan pıhtılaşma mekanizmasını oluşturmaktadır (Clark, 1993; Clark, 1996; Martin, 1997; Werner ve Grose, 2003). Yaralanmadan birkaç saat sonra, inflamatuvar hücreler yara dokusuna göç etmektedirler. İlk olarak nötrofiller bunu takiben monositler ve lenfositler yaralı alana gelmektedir. Mikroorganizmalara karşı savunma olarak çok çeşitli proteinazlar ve reaktif oksijen türevleri üretirler ve hücre debrisini fagosit etmektedirler (Clark, 1993; Karal-Yılmaz ve ark., 2011).



Şekil 5. Yara onarımının farklı aşamalarının şematik gösterimi. **A:** Yaralanmadan 12-24 saat sonra yaralı alan bir kan pıhtısı ile doldurulur. Nötrofiller pıhtıda yer almaktadır. **B:** Yaralanmadan 3-7 gün sonra, nötrofillerin çoğunluğu apoptoza uğramıştır. Bu onarım aşamasında makrofajlar yara dokusunda bol miktarda bulunur. Endotel hücreleri pıhtıya göç eder, çoğalır ve yeni kan damarları oluştururlar. Fibroblastlar, yara dokusuna göç eder ve burada hücre dışı matrisi çoğaltır ve birikirler. Oluşan bu yeni dokuya granülasyon dokusu denir. Keratinositler yara kenarında çoğalırlar ve yaralı dermis ile geçici matrisin üzerine göç ederler. **C:** Yaralanmadan 1-2 hafta sonra yara tamamen granülasyon (devam)

dokusu ile doldurulur. Fibroblastlar, miyofibroblastlara dönüşerek yara büzülmesine ve kolajen birikmesine yol açmıştır. Yara tamamen neoepidermis ile kaplıdır (Werner ve Grose, 2003).

Bu savunma fonksiyonlarına ek olarak, yara onarımında proliferatif fazı başlatan büyüme faktörleri ve sitokinlerin kaynağı olan inflamatuvar hücreleri de önemlidir. Yara kenarında keratinositlerin migrasyonu ve proliferasyonu ile başlar ve bunu, yaranın komşuluğundaki dermal fibroblastların proliferasyonu izlemektedir. Bu hücreler daha sonra geçici matrise göç ederler ve büyük miktarlarda ekstraselüler matriks birikimi gerçekleştirirler. Ayrıca, yara fibroblastları bir kasılma fenotipi kazanır ve yara kontraksiyonunda önemli bir rol oynayan hücre tipi olan miyofibroblastlara dönüşmektedir (Werner ve Grose, 2003). Baskın anjiyogenez, yeni kan damarlarının oluşumuna yol açar ve yara kenarında sinir filizlenmesi meydana getirmektedir. Oluşan bağ doku, çok sayıda kılcacın biraraya gelmesiyle görünüş olarak granülasyon dokusu olarak da bilinmektedir. Son olarak, granülasyon dokusundan olgun yaralara geçiş, sürekli kolajen sentezi ve kolajen katabolizması ile karakterize edilmektedir. Yara dokusu mekanik olarak yetersizdir ve saç folikülleri, yağ bezleri ve ter bezleri de dahil olmak üzere uzantılardan yoksundur. Skarlaşma da bazen aşırı olabilmektedir, bu da hipertrofik skarlar veya keloidlere yol açmaktadır. Buna zıt olarak, memeli embriyolarındaki yara iyileşmesi üçüncü trimesterin başlangıcına kadar, mükemmel bir onarım ile sonuçlanmaktadır. Embriyonik ve yetişkin memeliler arasındaki iyileşme sürecinde temel farklılıklar çalışılmaya devam edilmektedir (Saga, 2002; Werner ve Grose, 2003).

Hücre-hücre ve hücre matriks etkileşimlerinin önemine ek olarak, onarım sürecinin tüm aşamaları çok çeşitli farklı büyüme faktörleri ve sitokinler tarafından kontrol edilmektedir. Bunlar arasında platelet kaynaklı büyüme faktörleri (PDGF), fibroblast büyüme faktörleri (FGF), granülosit-makrofaj koloni uyarıcı faktör (GM-CSF), epidermal büyüme faktörü (EGF), vasküler endotelial büyüme faktörü (VEGF), anjiyopoietinler, insülin benzeri büyüme faktörleri (IGF), sinir büyüme faktörü (NGF), transforme edici büyüme faktörü beta (TGF- β), aktivinler, kemik morfogenetik proteinler (BMP), kemokinler, proinflamatuvar sitokinler, leptin ve interleukin-10 yer almaktadır (Werner ve Grose, 2003; Sorg ve ark., 2017). **Tablo 2**'de akut ve kronik yaralarda rol alan büyüme faktörleri, hücreleri ve etkileri belirtilmiştir.

Tablo 2. Akut ve kronik yaralarda yer alan büyüme faktörleri ve sitokinlerin salındığı hücreler ve etkileri (Barrientos ve ark., 2008).

Büyüme faktörleri	Hücreler	Akut yaradaki etkinlik	Fonksiyon	Kronik yaradaki etkinlik
EGF	Plateletler Makrofajlar Fibroblastlar	Artmış seviyeler	Re-epitelizasyon	Azalmış seviyeler
FGF-2	Keratinositler Mast hücreleri Fibroblastlar Endotel hücreler Düz kas hücreleri Kondrositler	Artmış seviyeler	Granülasyon doku oluşumu Re-epitelizasyon Matriks oluşumu ve yeniden modelleme	Azalmış seviyeler
TGF- β	Plateletler Keratinositler Makrofajlar Lenfositler Fibroblastlar	Artmış seviyeler	İnflamasyon Granülasyon doku oluşumu Re-epitelizasyon Matriks oluşumu ve yeniden modelleme	Azalmış seviyeler
PDGF	Plateletler Keratinositler Makrofajlar Endotel hücreler Fibroblastlar	Artmış seviyeler	İnflamasyon Granülasyon doku oluşumu Re-epitelizasyon Matriks oluşumu ve yeniden modelleme	Azalmış seviyeler
VEGF	Plateletler Nötrofiller Macrofajlar Endotel hücreler Düz kas hücreleri Fibroblastlar	Artmış seviyeler	Granülasyon doku oluşumu	Azalmış seviyeler
IL-1	Nötrofiller Monositler Makrofajlar Keratinositler	Artmış seviyeler	İnflamasyon Re-epitelizasyon	Artmış seviyeler
IL-6	Nötrofiller Makrofajlar	Artmış seviyeler	İnflamasyon Re-epitelizasyon	Artmış seviyeler
TNF- α	Nötrofiller Makrofajlar	Artmış seviyeler	İnflamasyon Re-epitelizasyon	Artmış seviyeler

Transgenik ve knock-out fare teknolojilerinin geliştirilmesi, embriyonik gelişim sırasında birçok farklı genin işlevine yeni bakış açıları sağlamıştır. Bu teknolojiler, genlerin aşırı ekspresyonu yanı sıra embriyonik kök hücrelerde homolog rekombinasyon yoluyla gen knock-out'ları veya dominant negatif mutantların aşırı ekspresyonuna olanak sağlamaktadır. En önemlisi, gen uyarımı veya aşırı ekspresyonun, hem indüklenebilen hem de Cre-lox teknolojilerini kullanarak mekânsal ve zamansal kontrolü proteinlerin işlevlerini belirlemeyi mümkün kılmaktadır (Werner ve Grose, 2003).

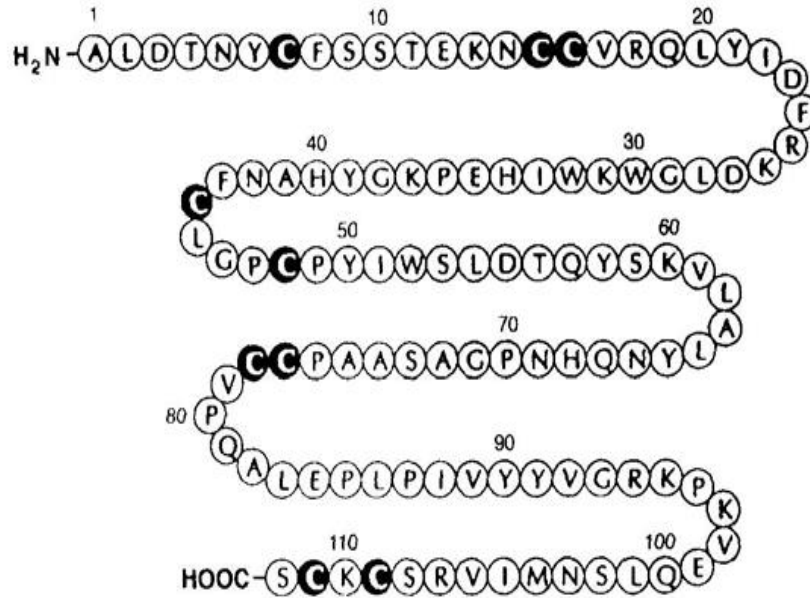
Silinmiş, mutasyona uğramış veya aşırı eksprese edilen genlerin farklı onarım süreçlerinde rolünü açıklamak için kullanılabilen çok sayıda, genetik olarak değiştirilmiş fareler mevcuttur. Geçmiş yıllara göre, yara iyileştirme deneylerinde kullanılan genetik olarak değiştirilmiş farelerin sayısında üssel bir artış görülmüştür ve bu çalışmalar, yara onarımında büyüme faktörlerinin in vivo fonksiyonu ile ilgili birçok veri sağlamıştır (Saga, 2002; Werner ve Grose, 2003).

4.4. Transforme Edici Büyüme Faktörü Beta (TGF- β)

4.4.1. Transforme edici büyüme faktörü beta (TGF- β) ailesi ve yapısı

Transforme edici büyüme faktörü beta (TGF- β), büyük bir protein ailesidir. Bu ailenin içerisinde büyüme ve farklılaşma faktörleri (GDF), kemik morfogenetik proteinler (BMP), aktivinler (ACT), inhibinler (INH), glial kökenli nörotropik faktörler (GDNF) ve anti-Müllerian hormon (AMH) gibi birçok protein yer almaktadır (Poniatowski ve ark., 2015). Transforme edici büyüme faktörü (TGF) ailesi ise tekrar iki aileye ayrılmaktadır. Bunlar TGF- α ve TGF- β 'dır. TGF- α , EGF'ye benzerdir ve ortak bir reseptöre sahiptir. Diğer yandan TGF- β , EGF'den çok farklıdır. TGF- β , çoğu nükleusa sahip hücrelerden, özellikle kanser hücrelerinden salgılanan bir proteindir. TGF- β ayrıca TGF- β 1, TGF- β 2 ve TGF- β 3 olarak alt gruplara ayrılır ve insan kromozundaki genlerin yerleri sırasıyla 19q13, 1q41 ve 14q24 olarak belirtilmektedir (Imanishi, 2000).

Transforme edici büyüme faktörü (TGF- β) asidik, ısıya dayanıklı, disülfid bağlı homodimerik bir proteindir. Moleküler ağırlığı yaklaşık 25 kDa'dır. 112 amino asitten oluşmaktadır. Büyük oranda plateletlerden salgılanmaktadır. Ayrıca; yara bölgesinde lokalize olan makrofajlardan, T-lenfositlerden, endotel hücrelerden, fibroblastlardan da salınmaktadır (Puolakkainen, 1995). **Şekil 6**'da insan TGF- β 'nın 112 amino asitlik monomerik yapısı verilmiştir.



Şekil 6. İnsan TGF beta' nın işlenmiş 112 amino asitlik monomerik birimi (Gombotz ve ark., 2002).

TGF- β etkili bir sitokin olup makrofajlar ve fibroblastlar için kemoaktrant ve mitojeniktir. Ekstraselüler matriks proteinlerin sentezini stimule etmektedirler. Endotel hücrelerin sayısını artırarak anjiyogenez etkisiyle yeni granülasyon doku oluşumunu sağlamaktadır. Epidermal hücrelerin göçünü de stimule etmektedirler (Puolakkainen ve ark., 1995).

Memelilerde TGF- β 'nın % 64–85 amino asit sekans homolojisi gösteren 3 tane izoformu (β -1, β -2, β -3) bulunmaktadır. In vitro, TGF- β 'lar birçok hücre tipinde etkilidirler. Ekstraselüler matriks proteinlerinin ve integrinlerin ekspresyonunu stimule etmektedirler. Memelilerde yara onarımı sırasında üç TGF- β formu da rol almaktadır. Farklı gen ürünleri olduğu için in vitro çalışmalarda yara iyileşmesinde izoformlar arasında farklı potens ve biyolojik aktivite farklılığı gösterilmektedir (Le ve ark., 2012).

4.4.2. TGF- β 'nın reseptör ve hücre içi sinyalizasyon mekanizması

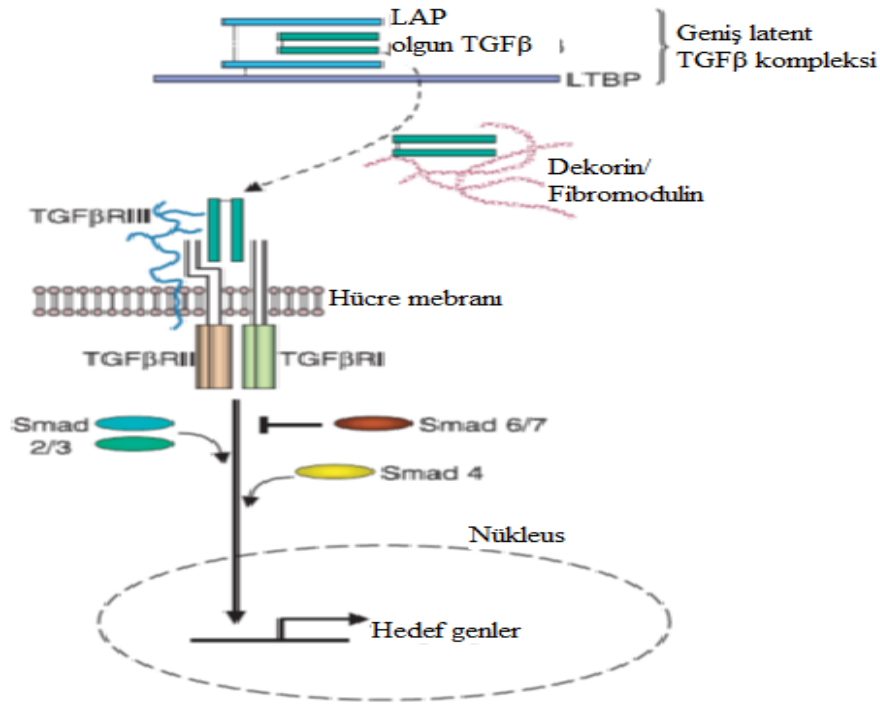
Memeli TGF-beta izoformu (TGF-beta1, 2, 3) latent öncüler olarak sentezlenir, genellikle latent TGF-beta bağlayıcı protein ile kompleks halinde salgılanır, daha sonra proteolitik ayrılma yoluyla hücre dışına çıkarılır. Aktif TGF-beta'lar daha sonra biyolojik fonksiyonlarını reseptör aracılığı ile gerçekleştirmektedir (Puolakkainen ve ark., 1995; Frank ve ark., 1996; Werner ve Grose, 2003).

TGF- β reseptörü, serin treonin kinazlar olan TGF- β RI ve TGF- β RII olarak adlandırılan iki ayrı transmembran glikoproteinden oluşmaktadır. TGF- β ligandı, daha sonra bir heterotetramerik reseptör kompleksi oluşturmak için TGF- β RI'yi uyaran TGF- β RII'ye bağlanmaktadır. TGF- β RII'nin fosforilasyonu, TGF- β RI'in intrasitoplazmik kinazını aktive etmektedir. Daha sonra, hücre içi sinyal yolu, Smad adı verilen proteinler tarafından aktive edilir ve gerçekleştirilir. Sekiz farklı Smad proteini tanımlanmıştır ve genellikle üç kategoriye ayrılmıştır:

1. 1, 2, 3, 5 ve 8 reseptör ilişkili Smadler (R-Smads);
2. Co-Smad (Smad 4);
3. 6 ve 7 olan inhibitör Smadler (I-Smad) (O'Kane ve Ferguson, 1997; Werner ve Grose, 2003; Faler ve ark., 2006).

R-Smad'lar 2 ve 3 oldukça önemlidir çünkü bunlar doğrudan TGF- β reseptör kompleksi ile etkileşime girmektedirler. Diğer R-Smad'lar, kemik morfojenik

proteinlerini bağlayanlar gibi diğer membran reseptörleri ile etkileşime girmektedir. TGF- β membran reseptörüne bağlandıktan sonra, TGF- β R kompleksinin hücre içi kinaz aktivitesi, Smad 2 veya Smad 3'ü fosforile etmektedir ve bu da moleküllerin aktif protein haline gelmesini sağlamaktadır. Smad 2 ve Smad 3'ün ortak bir sinyalizasyon yoluna sahip olmasına rağmen, küçük farklılıklar farklı hücreler etkilere yol açmaktadır. Örneğin, Smad 3 doğrudan DNA ile etkileşebilirken, Smad 2, DNA ile etkileşime girmek ve gen ekspresyonunu etkilemek için başka transkripsiyon faktörlerine ihtiyaç duymaktadır. Fosforile edilmiş Smad 2 veya 3 daha sonra co-Smad protein olan Smad 4 tarafından tanınır ve bağlanır. Bu R Smad / Smad 4 kompleksi daha sonra gen transkripsiyonunu düzenlemek ve TGF-B'nin etkilerini göstermek için çekirdeğe doğru hareket ederler (O'Kane ve Ferguson, 1997; Werner ve Grose, 2003; Faler ve ark., 2006). **Şekil 7'**de TGF- β reseptör aktivasyonu belirtilmiştir.



Şekil 7. Dönüştürücü Büyüme faktörü (TGF- β) reseptörleri ile Smad proteinlerinin aktivasyonu. TGF- β ilk önce latent ilişkili proteine (LAP) bağlanan aktif olmayan bir öncü olarak üretilir. İkincisi latent TGF- β bağlayıcı proteine (LTBP) kovalent olarak bağlanır. (devam)

Aktivasyon üzerine, TGF- β hücre dışı bağlanma proteinleri (dekorin, fibromodulin) tarafından dışarı verilir veya sinyal transdüserine sunan reseptörleri olan (tip II ve tip I) tip III reseptörüne bağlanır. Ligand bağlanması üzerine, TGF- β önce tip II hemen sonra tip I reseptörüne bağlanarak fosforilasyon gerçekleşmektedir. Daha sonra Smad2 ve Smad3'ü bağlayarak fosforile ederler. Fosforlanmış Smad2 ve Smad3, Smad4'e bağlanırlar. Spesifikliği sağlayan ve hedef genlerin aktivasyonuna yol açan diğer transkripsiyon faktörlerine bağlandıkları çekirdeğe translokasyon yaparlar (Werner ve Grose, 2003).

Smad'ların aktivitesini etkileyen birçok faktör vardır. İnhibitör Smadler (6 ve 7), R-Smad'ların hem TGF- β R hem de Smad 4 ile etkileşimini önleyerek inhibitor etki gösterirler. Ayrıca, IFN- γ ve TNF- α 'nın Smad sinyali üzerinde engelleyici etkileri olduğu ileri sürülmüştür. Ek olarak, hücre içi bir β -spektrin proteininin (Elf protein) Smad aktivitesi için bir kofaktör olduğu ileri sürülmüştür. Smad proteinleri, TGF- β 'nın yara iyileşmesindeki etkilerini araştırmada ayrı bir basamak haline gelmiştir. Genetiği değiştirilmiş farelerde, çeşitli Smad'ların ekspresyonunu önleyen mutasyonlarla birçok çalışmalar yapılmıştır. Sonuç olarak, TGF- β 'nın rolü sinyalizasyon mekanizması ile birlikte *in vitro* ve *in vivo* yara onarımında gösterilmiştir (Faler ve ark., 2006).

4.4.3. Yara iyileşmesinde TGF- β

Sporn ve ark. büyüme faktörlerinin ve proteinlerin dışı ve içe difüzyonuna izin veren küçük bölmeler tasarlamışlardır. TGF- β içeren bu bölmeler, sıçanların dorsal derisine deri altından implante edildiğinde, bölmelerdeki toplam protein, kollajen ve DNA birikiminin hızlandığını göstermişlerdir. Bu çalışma sadece TGF ile yara iyileşmesi arasındaki bağlantıyı gösteren ilk çalışma olmasa da izole edilmiş TGF'nin *in vivo* etkisini gösteren ilk çalışmadır (Sporn ve ark., 1983; Faler ve ark., 2006). Sıçan derisinde deri altı bölmeler kullanılarak, Cromack ve ark. yara sıvısındaki TGF- β ekspresyonunun 7. günde zirve yaptığını ve 16. günde bile başlangıç seviyesinin üzerinde kaldığını bulmuştur (Cromack ve ark., 1987; Faler ve ark., 2006).

TGF- β 'nın yara onarımı sırasında kritik yara iyileştirici faktörlerin birikimini teşvik ettiği bilindikten sonra, bir sonraki adım yara iyileşme hızını ve gücünü değiştirip değiştirmediğini belirlemektir. TGF- β sıçan insizyonel yaralarına doğrudan uygulandığında, yara gerilme mukavemeti üzerinde doza bağlı, doğrudan uyarıcı bir

etki gösterilmiştir. (cildi yırtmak için gereken kuvvetle ölçülür). Aslında, hızlandırılmış yara iyileşme oranına ek olarak, maksimum yara gücünde kontrole kıyasla % 220 oranında bir artış gözlemlenmiştir. Ayrıca, mononükleer hücrelerin ve fibroblastların artan bir akışı ve TGF- β uygulama yerinde kollajen birikiminde belirgin bir artış kaydedilmiştir. Bu çalışma ve benzer diğer çalışmalar ile birlikte TGF- β normal yara iyileşmesini hızlandırmak için potansiyel bir farmakolojik ajan olarak değerlendirilmiştir (Mustoe ve ark., 1987; Brown ve ark., 1988; McGee ve ark., 1989; Faler ve ark., 2006).

TGF-beta'nın üç izoformu hem farklı hem de örtüşen fonksiyonlara sahiptir. *In vitro* olarak, fibroblastlar için mitojenik oldukları gösterilmiştir, ancak keratinositler dahil olmak üzere diğer hücrelerin çoğunun çoğalmasını inhibe edici özellikleri de bulunmaktadır. Ayrıca, TGF-beta'lar, hücre dışı matris proteinleri ve integrinlerin ekspresyonunun çok güçlü uyarıcılarıdır. Böylece yara sitokinlerinden beklenen özelliklere sahiptirler ve gerçekten de yara iyileştirme senaryosunda en çok çalışılan moleküller arasındadırlar (Puolakkainen ve ark., 1995; Frank ve ark., 1996; O'Kane ve Ferguson, 1997; Werner ve Grose, 2003; Le ve ark., 2012).

Tablo 3. Yara iyileşmesinde yer alan hücresel mediyatörler üzerine TGF- β 1'in etkisi (Beanes ve ark., 2003; Faler ve ark., 2006).

Hücre tipi	Etkisi
Fibroblast	Kemotaksis ECM komponentlerin sentezinde artış Proteaz ekspresyonunda azalma Proteaz inhibitor ekspresyonunda artış TGF- β üretimi Proliferasyon
Endotel hücreler	Proliferasyon ve motilitede azalma
Makrofaj	Kemotaksis (Yara bölgesine migrasyon) Proteaz ekspresyonunda azalma Maturasyonda artış
Keratinosit	<i>In vitro</i> -Maturasyonda artış -Proliferasyonda azalma -Migrasyonda artış <i>In vivo</i> -Tartışmalı sonuçlar

TGF-beta'nın yara model çalışmalarında; fareler, sıçanlar, domuzlar, kobaylar, tavşanlar ve insanlar gibi birçok tür kullanılmıştır. Hem normal hem de bozulmuş iyileşme modelleri çalışılmış ve yaralanma prosesleri aynı zamanda kesik, kısmi kalınlık yaralanması, tam kalınlık yaralanması, eksizyon, akut ve kronik yaralara göre de değişimleri belirtilmiştir. Yara iyileşmesi sırasında TGF- beta'yı modüle etmek için eksojen maddelerin eklenmesinin etkisi doz, taşıyıcı sistem ve taşıyıcı zamanlaması gibi bir dizi faktöre bağlıdır. Yapılan bir derleme çalışmasında, normal ve bozulmuş yara iyileşmesi hayvan modellerinde TGF-beta'nın etkinliğini, etkinliğini belirleyen çalışmalarda yöntemleri ve sonuçları özetlenmiştir (Roberts ve Sporn, 1996). *In vitro* çalışmalarda, TGF-beta'nın üç izoformu da etkinliklerinde oldukça benzerdir, ancak *in vivo* çalışmalarda, bu izoformların mekânsal-zamansal dağılımı ve etkileri oldukça spesifiktir. TGF- β 1 tüm dokularda ve hücrelerde en fazla olan izoformdur, daha sonra TGF- β 2 ve en az TGF - β 3 gelmektedir. TGF- β 2, çoğunlukla tükürük, amniyotik sıvı, anne sütü ve göz gibi vücut sıvılarında bulunurken, TGF- β 3; sıvı veya dokularda büyük miktarlarda mevcut değildir (O'Kane ve Ferguson, 1997; Werner ve Grose, 2003).

Eksojen TGF- β 1 uygulaması, yara onarımını hızlandırır ve yaraların gerilme mukavemetini artırmaktadır. Genel olarak, TGF- β 1 ve TGF- β 2'in, skar oluşturma etkileri ileri sürülürken; TGF- β 3 aksi yönde skar oluşumunu azalttığı belirtilmektedir (Beanes ve ark., 2003). TGF- β 'nın, immünohistokimya ve *in situ* hibridizasyon çalışmaları ile belirlenen farklı türlerdeki ekspresyonlarda bazı farklılıklar vardır ve muhtemelen türler içinde de bu farklılıkların olması mümkündür. Örneğin, farelerde DNA'da zincir farklılıkları olabilmektedir. Normal ciltte TGF- β 1, türler arasındaki en az heterojenliği gösteren formdur. TGF- β 1, tüm türlerin bazal lamina ve mezenkimal hücrelerinde bulunur, ancak domuz derisinde sağlam dermiste TGF- β 1 yoktur. Ayrıca insan derisinde suprabazal keratinositlerde de TGF- β 1 ekspresyonunda görülmektedir. Normal murin derisinde TGF- β 2 ekspresyonu dış epidermal tabakalarla sınırlı iken domuz derisinde tüm epidermal tabakalarda güçlü immünohistokimyasal sonuçlar yer almaktadır. İnsan derisinde, normal derinin dermisinde TGF- β 2 bulunmadığı, ancak yapılan çalışmalarda alınan sonuçların, suprabazal tabakada immünohistokimyasal lekelenmeyi gösterdiği bildirilmiştir. Sıçan derisinde TGF- β 2, saç folikülleri ve yağ bezleri ile ilişkilidir. TGF- β 3, üç izoformun

en değişkenidir: insan epidermal keratinositlerinde temel olarak eksprese edilir ve ayrıca hem keratinositlerde hem de seböz bezlerde domuz derisinde çok kuvvetli bir şekilde eksprese edilirken, murin ve sıçan sağlıklı derisinde TGF- β 3 çok düşük olarak eksprese edilmektedir (Werner ve Grose, 2003).

Yaralanmanın ardından, TGF- β seviyeleri önemli ölçüde değişmektedir. Yetişkin fare insizyonal yaralarda çalışıldığında yaralanmadan 1 gün sonra, TGF- β 1 ve β 2 düzeylerinin hızla arttığı, ancak TGF- β 3'ün sadece yaralanmadan birkaç gün sonra arttığı ve aynı zamanda TGF- β 1 düzeylerinin düştüğü gözlenmiştir. Heterozigot olan transgenik farelerde TGF- β 3 mutasyonundan dolayı % 50 daha az TGF- β 3 seviyeleri gözlenirken; TGF- β 1 seviyesi, insizyonel yaralanmayı takip eden gün homozigot kontrol farelere kıyasla daha belirgin bir şekilde artmıştır. TGF- β 2 seviyesi ise azalmıştır. Yapılan bir çalışmada, bir albümin promotörünün kontrolü altında TGF- β 'yı aşırı eksprese eden bir transgenik fare kullanımında, yaralanmadan 7 gün sonra TGF- β 3 seviyesinin artırıldığını ve TGF- β 1'in azaldığını belirtmişlerdir. Bu sonuçlar, yara iyileşmesi sırasında TGF- β 1 ve TGF- β 3 izoformlarında bir çapraz regülasyon olduğunu göstermektedir; TGF- β 3 yüksek olduğunda, TGF- β 1 düşüktür ve bunun tersi de geçerlidir. TGF- β 3'ün TGF- β 1'e oranı yüksek olduğunda yaraların verimli iyileştiği ileri sürülmüştür (O'Kane ve Ferguson, 1997; Werner ve Grose, 2003).

4.4.3.1. Yara bölgesinde TGF- β ekspresyonu

Yaralamadan hemen sonra, TGF- β 1 trombositlerden büyük miktarlarda salınır ve bu trombositlerden aktif TGF- β 1'in salımı; nötrofiller, makrofajlar ve fibroblastlar için bir kemoatraktan görevi görür ve bu hücreler aracılığı ile, TGF- β 1 ekspresyon seviyelerini daha da artırmaktadır (**Şekil 8**). Aktif formların yanı sıra latent TGF-betalar da yara matrisi içinde üretilir ve ortama salınırlar, böylece proteolitik enzimler tarafından sürekli salım sağlanmaktadır. Farklı hücresel kaynakların ve geçici depolamanın bu kombinasyonu, onarım işlemi boyunca sürekli bir TGF-beta teminini sağlamaktadır. Çeşitli yayınlar, farklı türlerin yara sıvısında TGF-beta'ların varlığını bildirmektedir. Ayrıca, her bir izoformun, yara dokusunda karakteristik bir dağılıma sahip olmasıyla, her üç izoformun ekspresyonu, onarım sırasında birçok farklı hücre tipinde saptanmıştır. Çoğu çalışmada, TGF- β 1 ve β 2'nin hızlı bir uyarımı gözlenirken, daha sonraki onarım aşamalarında TGF- β 3

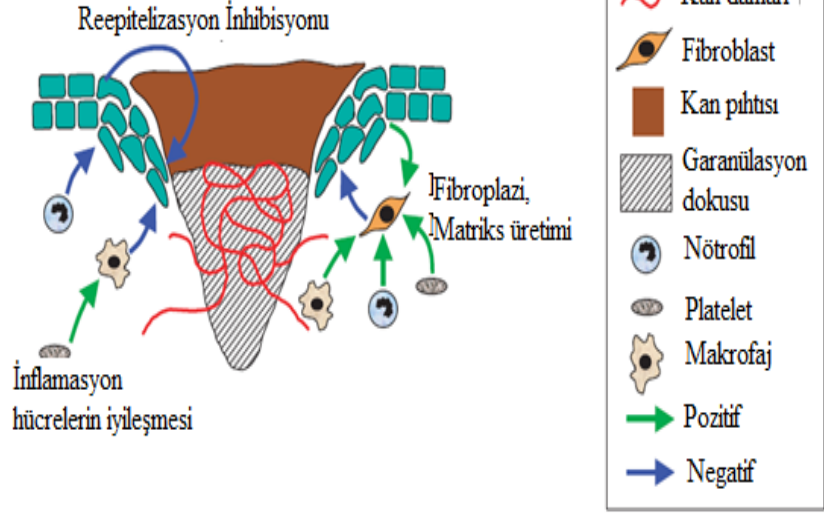
ekspresyonunda bir artış görülmüştür. Ligandlara ek olarak, Tip I ve Tip II TGF-beta reseptörleri, iyileşme yarasındaki çeşitli hücre tiplerinde de mevcuttur (Werner ve Grose, 2003).

TGF-beta'ların, yara onarımındaki deride ekspresyon oranına ve eksojen TGF-beta'nın etkilerine dayanarak, TGF-beta'ların re-epitelizasyon ve granülasyon doku oluşumunu uyardığı öne sürülmüştür. TGF-beta'nın re-epitelizasyona etkisi paradoksal görünmektedir; keratinosit proliferasyonu üzerindeki *in vitro* ve *in vivo* inhibitör etkisinin yanısıra, yaralanmadan sonra keratinositler tarafından ekspresyonu re-epitelizasyonun negatif bir düzenleyicisi olarak düşünülmektedir (Coffey ve ark., 1988; Sellheyer ve ark., 1993).

Aynı zamanda, fibronektin açısından zengin olan geçici yara matrisi keratinosit göçü için gerekli integrinlerin ekspresyonunu indükler ve eksojen TGF- β 'nın keratinosit migrasyonu ile yara re-epitelizasyonunu uyardığı gösterilmiştir. Bununla birlikte, tüysüz fare kulak yaralarının TGF- β 1 ve TGF- β 2 nötralize edici antikorlarla tedavisi, bu iyileşme modelinde endojen büyüme faktörlerinin re-epitelizasyon ve neovaskülarizasyon için gerekli olmadığını göstermiştir (Eskild-Jensen ve ark., 1997). Ayrıca, yanık yaralarının sentetik bir TGF- β antagonisti ile tedavi edilmesi, yara yeniden epitelizasyonunu hızlandırmıştır (Huang ve ark., 2002).

Transgenik ve knock-out fare modelleri ile elde edilen birkaç çalışmada, yara re-epitelizasyonunda endojen TGF- β 1'in engelleyici bir rolü ortaya koyulmuştur. Granülasyon dokusundaki TGF- β 'nın varlığı, etkili iyileşme prosesinde önem arz etmektedir, çünkü TGF- β 'nın anjiyogenez, fibroblast proliferasyonunu, miyofibroblast farklılaşmasını ve matris birikmesini uyardığı gösterilmiştir. Bu hipotez, hem iyileşme oranı hem de iyileşmiş yaranın gücü açısından, eksternal TGF- β 'nın yara onarımı için yararlı bir etki gösterdiği birkaç hayvan modelinde yapılan bir dizi çalışma ile desteklenmiştir. Bu bulguların tamamlayıcısı, TGF- β 'nın anormal ekspresyonunun, glukokortikoid ile tedavi edilen yaşlı farelerde ve diyabetik sıçanlarda görülen yara iyileşme bozukluğu ile ilişkili olduğunu gösteren bulgulardır (Frank ve ark., 1996; Werner ve Grose, 2003; Li ve ark., 2007; Le ve ark., 2012).

TGFβ'nın Etkileri



Şekil 8. Yara iyileşmesi sırasında TGF-β'nın çoklu fonksiyonları. Lokal kanama üzerine TGF-β trombositlerden büyük miktarlarda salınır. İyileşen yarada, lökositler, makrofajlar, fibroblastlar ve keratinositler tarafından üretilir ve enflamatuvar hücrelerin, fibroplazinin, matris birikiminin ve anjiyogenezinin filtrasyonunu uyarmak için bu hücreler üzerinde etki eder. Tersine, endojen TGF-β'nın yeniden epitelizasyona engel olduğuda gösterilmiştir (Werner ve Grose, 2003).

4.4.3.2. TGF-β1 ve TGF-β2 proteinlerin antikorlarla nötralize edilmesi

Birçok çalışma, kutanöz yaralarda TGF-β'ların önemli bir rolü olduğunu desteklemektedir. İlk olarak, TGF-β'ların ve reseptörlerinin azaltılmış ve/veya geçici ekspresyonlarında yetişkin yaralarıyla kıyasla fetal yaralarda skarlaşma gözlenmediğini gösterilmiştir. Ayrıca, insan yanık sonrası hipertrofik yaralardaki fibroblastlarda TGF-β'ların ve reseptörlerinin güçlü ve devamlı ekspresyonu saptanmış ve keloid dokularda ve keloid-türevli fibroblastlarda TGF-β1 ve -β2'nin aşırı ekspresyonu bulunmuştur. Son olarak, yara dokusunda TGF-β'nın aktivitesinin arttığı görülmektedir. Bu nedenle TGF-β biyoaktivitesini inhibe eden hücre dışı bir matris proteoglikan olan dekorin ekspresyonu, yanık sonrası hipertrofik yaralarda azalmıştır. Başka bir TGF-β bağlama proteini olan fibromodulin (**Şekil 7**), gebeliğin ileri dönemlerinde skarlı yaralara kıyasla skar oluşmayan fetal yaralarda yüksek seviyelerde eksprese edildiği gösterilmiştir. Öte yandan, embriyonik sıçan yaralarında dekorinin, daha sonra skar gelişen yaralara kıyasla yara izi bırakmayan

iyileşmelerde downregüle olduğu gösterilmiştir. Böylece, dekorinin skar yanıtındaki rolü belirlenmeye devam edilmektedir (O'Kane ve Ferguson, 1997; Martin, 1997; Werner ve Grose, 2003).

Diğer bir yandan, farklı konsantrasyonlarda TGF- β 1 ile yapılan fetal yaraların tedavisi, bu yaralarda belirgin şekilde skarlaşmaya neden olmuştur ve bu da, TGF- β 1'in kutanöz skarda doğrudan bir rol oynadığını göstermiştir. Bu bulgu, Shah ve arkadaşlarının çalışmalarıyla da desteklenmiştir (Shah ve ark., 1994; Shah ve ark., 1995; Werner ve Grose, 2003). Bu çalışmalarda, inzisyonel sıçan yaraları TGF- β 1'e veya TGF- β 1 ve - β 2'nin kombinasyonuna karşı nötralize edici antikorlarla ile tedavi edilmiştir. Bu tedavi ekstraselüler matriks birikiminde ve sonrasında skarlaşmada belirgin bir azalmaya neden olmuştur; bu sonuca göre, endojen TGF- β 1 ve - β 2'nin yetişkin hayvanlarda kutanöz skarlaşmaya neden olduğu düşünülmüştür (O'Kane ve Ferguson, 1997; Martin, 1997; Werner ve Grose, 2003).

Antisens TGF- β 1 oligodeoksinükleotitleri ile topikal olarak tedavi edilen fare yaralarında da azalmış bir skar etkisi gözlenmiştir (Choi ve ark, 1996). Son olarak, sentetik bir TGF- β antagonistinin topikal uygulaması, domuz yanıklarında ve eksizyonel yaralarda ve tavşan deri eksizyonlarında skarlaşmayı azaltmıştır (Huang ve ark., 2002).

Diğer taraftan, aynı tipteki yaraların rekombinant TGF- β 3 ile tedavisinde skarlaşmayı inhibe ettiği belirtilmiştir, bu da TGF- β 3'ün, diğer TGF- β izoformları ile antagonize etkileşme içerisinde olduğunu göstermiştir. Bununla birlikte, diğer çalışmalarda TGF- β 3'ün bağ dokusu birikimi üzerindeki etkisine ilişkin çelişkili sonuçlar belirtilmiştir. TGF- β 3'ün hayvan modellerinde yaşla-bozulan yaralara ekzojen uygulamasıyla yeni dermal matriste bir artış olduğunu göstermişlerdir (Cox, 1995). Ekzojen TGF- β 3'ün skar yanıtı üzerindeki etkisinden bağımsız olarak, endojen proteinin yara iyileşmesinde ve skar oluşumundaki rolü belirlenmeye devam edilmelidir. Yara onarımında TGF- β 'nın önemini yansıtan çalışmalar arasında, TGF- β sinyal yolunun çeşitli basamaklarında eksiklik veya fonksiyon kazanımlarına bağlı olarak genetik modifiye edilmiş farelerle yapılan çalışmalar da devam etmektedir (Werner ve Grose, 2003; Le ve ark., 2012).

4.5. İlaç Taşıyıcı Polimerler

Yeni ilaç moleküllerinin araştırılması ve geliştirilmesinin yanı sıra günümüzde polimerlerin tedavi ve teşhisde ilaç taşıyıcı sistemler olarak önemi artmaktadır. Etkin maddenin etkinliğini ve güvenilirliğini artırmak, etkin maddenin kontrollü salımını, dozlamasının ayarlanmasını, stabilitesini sağlamak ve etkin maddenin hidrofilik veya hidrofobik özelliğini iyileştirmek için birçok ilaç taşıyıcı sistemler geliştirilmektedir. Bu sistemler arasında non-viral polimerik yapıli sistemler önemli bir yer tutmakta ve birçok doğal ve sentetik polimerler kullanılmaktadır (Stewart ve ark., 2018). Ayrıca oral ilaç dağılımında; tat-maskeleme ajanı, stabilizatör ve koruyucu ajan olarak da kullanımı yaygındır (Yang ve ark., 2001; Parveen ve Sahoo, 2006).

İlaç taşıyıcı sistem olarak polimerler farklı birçok özelliklere sahiptirler. Sentetik ya da doğal yapıda bulunabilirler. Büyük zincirlere sahip, lineer veya makromoleküler yapıda olan polimerler çeşitli fonksiyonel gruplar içerirler, diğer düşük ve yüksek moleküler ağırlıklı malzemelerle karıştırılabilirler ve herhangi bir uygulama için uyarlanabilirler. Yüzey modifikasyonlarına açıktırlar. Bu özellikler, ilaç taşıyıcı sistemlerde polimerleri giderek daha önemli hale getirmektedir. Bu alandaki ilerlemeler, yeni ilaç taşıyıcı sistemlerin geliştirilmesine yol açmıştır (Yang ve ark., 2001; Parveen ve Sahoo, 2006; Nanjwade ve ark., 2009). Yüzey ve hacim özelliklerinin uygun bir şekilde değerlendirilmesi, çeşitli ilaç verme uygulamaları için polimerlerin tasarlanmasına yardımcı olabilmektedir (Demidova-Rice ve ark., 2012). Bu yeni teknolojik gelişmeler, kimyasal yollarla ilaç modifikasyonlarını ve polimerik matrislerde ilaç enkapsülasyonunu sağlamaktadır. İlaç taşınması ve hedefleme yaklaşımlarındaki teknik gelişmeler ile tedavinin etkinliği ve böylece insan sağlığı gelişmektedir. Polimer temelli enkapsülasyonlarda ve kontrollü ilaç salım sistemlerinde yeni teknolojik gelişmeler, ilaçların uygulanmasının optimize edilmesine yönelik olanaklar sunmaktadır. Bu gelişmeler tedaviyi daha verimli hale getirmeye ve hastalar için yan etkileri ve diğer olumsuzlukları en aza indirmeye katkıda bulunmaktadır (Hardwicke ve ark., 2008).

Farmasötik polimerler, kontrollü salım (uzatılmış ve hedeflendirilmiş), stabilite ve biyoyararlanım sağlamak için yaygın olarak kullanılmaktadır. Monolitik taşıyıcı sistemler, bir ilacın bir polimer matrisi içinde dağıldığı ve difüzyon ile

serbest bırakıldığı sistemlerdir. Bir matris ürününden ilaç salımı hızı, genel olarak sürekli salım karakteristiği gösteren polimer zincirlerinin başlangıç ilaç konsantrasyonuna ve parçalanmasına bağlıdır (Hardwicke ve ark., 2008; Tocco ve ark., 2012).

Biyomedikal alanda, polimerler implant olarak da kullanılır ve uzun süreli kullanım beklenmektedir. Genel olarak, farmasötik uygulamalarda arzu edilen polimer özellikleri, film oluşturma (kaplama), viskozite (reoloji düzenleyici), jelleşme (kontrollü salım), yapışma (bağlanma), pH-bağımlı çözünürlük (kontrollü salım), organik çözücüler içinde çözünürlük (tat maskeleyici) ve bariyer özellikleri (koruma ve paketlenme) sayılmaktadır (Yang ve ark., 2001; Dai ve ark., 2005).

Polimer temelli ilaç taşıyıcı sistemlerde güvenlik ve biyouyumluluk önemli bir yere sahiptir. Biyouyumlu polimerlerin karakterizasyonunda, formülasyon geliştirme ve ilaç taşıyıcı sistem olarak değerlendirilme iki önemli noktadır. Biyolojik olarak parçalanabilen polimerler, çözünmüş veya dağılmış ilacın devam eden salımı ile biyolojik sıvılarda parçalanma özelliklerine sahiptir. Polimerlerin yüzey ve hacim özellikleri uygun modifikasyonlar ile çeşitli ilaç taşıyıcı sistemlerin tasarlanmasını sağlayabilmektedir. Biyobozunur polimerler, vücutta toksik olmayan monomerlere ayrışabildikleri için ilaç taşınmasında yaygın kullanım alanı bulurlar. Polietilen oksit gibi kopolimerler veya dendrimerler gibi yeni moleküler yapılar, genlerin ve makromoleküllerin taşınmasında çokça araştırılmaktadır. Biyomedikal alanda, özellikle doku mühendisliği ve kontrollü ilaç sistemlerinde sentetik biyobozunur polimerlerin uygulanması yaygındır. Örneğin; polimerik bir implantın biyobozunur olması, cerrahi müdahale ile fonksiyonel ömrünün sonunda çıkarılmasına gerek kalmayan yani ikinci bir ameliyat ihtimalinin olmayacağı anlamına gelmektedir (Srivastava ve ark., 2016).

Doku mühendisliğinde, biyobozunur polimerler, dokulara göre tasarlanabilir, mekanik gerilmelere dayanabilen, hücre ekimi-büyümesi için uygun bir yüzey sağlayan ve yükün yeni dokuya aktarılmasına izin veren bir oranda bozunabilen bir polimer iskeleti sağlamaktadır. Kontrollü ilaç sisteminde, biyobozunur polimerler hem ilaç taşıyıcı sistem hem de tıbbi bir cihaz olarak avantajlar sunmaktadır (Yang ve ark., 2001; Dai ve ark., 2005). **Tablo 4**'te ilaç taşıyıcı sistem olarak kullanılan polimerler sınıflandırılmıştır.

Tablo 4. İlaç taşıyıcı sisteminde kullanılan polimerler (Saltzman ve Fung, 1997; Pillai ve Panchagnula, 2001).

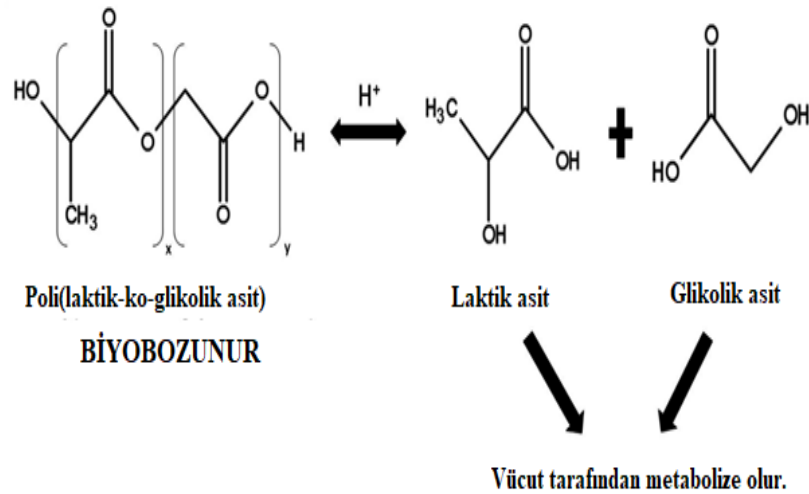
Sınıflandırma	Polimer
Doğal Polimerler	
Protein temelli polimerler	Kolajen, albümin, jelatin
Polisakkaritler	Agaroz, aljinat, karragenan, hyaluronik asit, dekstran, kitozan, siklodekstrinler.
Sentetik Polimerler	
<i>Biyobozunurlar</i>	
Poliesterler	Polilaktik asit, poliglikolik asit, polihidroksi bütirat, poli(ϵ -kaprolakton), poli(β -malik asit), polidioksanonlar.
Polianhidritler	Polisebasik asit, poliadipik asit, politerfitalik asit ve çeşitli kopolimerler.
Poliamidler	Poliimino karbonatlar, poliaminoasitler.
Fosforos temelli polimerler	Polifosfatlar, polifosfonatlar, polifosfazenler.
Diğerleri	Polisiyano akrilatlar, poliüretanlar, poli (orto esterler), polidihidropiranlar, poliasetaller.
<i>Biyozunur olmayanlar</i>	
Selüloz türevliler	Karboksimetil selüloz, etil selüloz, selüloz asetat, selüloz asetat propiyonat, hidroksipropil metil selüloz.
Silikonlar	Polidimetilsiloksan, koloidal silika.
Akrilik polimerler	Polimetakrilat, polimetilmetakrilat, polihidro etil-metakrilat.
Diğerleri	Polivinil pirolidon, etil-vinil asetat, poloksamerler, poloksaminler.

4.5.1. Poli(Laktik-Ko-Glikolik Asit) (PLGA)

Poli (laktik-koglikolik) asit (PLGA), gıda ve ilaç idaresi (FDA) ve Avrupa ilaç ajansı (EMA) tarafından onaylanmış, yaygın olarak kullanılan biyolojik olarak

parçalanabilir bir polimerdir. Biyomateryaller arasında; PLGA uygulamaları, hem ilaç taşıyıcı sistem olarak hem de doku mühendisliği için oldukça elverişlilik göstermektedir. PLGA; polilaktik asit (PLA), poliglikolik asit (PGA) monomerlerinin belli oranlarda polimerizasyonu ile oluşmaktadır. Bu oranların karışımı sonucu fizikokimyasal özellikler ve moleküler ağırlık değişimiyle farklı PLGA polimerleri elde edilmektedir (Parveen ve Sahoo, 2006; Çırpanlı, 2009).

PLGA'nın kristal yapısı kopolimer zincirindeki iki bileşenin molar oranına bağlıdır. PLGA'da, % 70'den az PGA içeren kopolimerler amorf yapı göstermektedir ve diklorometan, etil asetat gibi organik çözücülerde kolaylıkla çözünürler. PGA hidrofilik özellikte olduğundan hücre içi koşullarda kolaylıkla çözünmektedir. PLA ise yan zincirinde PGA'e göre fazladan bir metil grubu taşıdığından daha hidrofobik özelliktedir ve biyobozunması PGA'den çok daha uzun sürede gerçekleşmektedir. Bu nedenle PLGA'nın sudaki bozunma özelliği kopolimerin molekül ağırlığına ve laktik: glikolik oranına bağlıdır. Yüksek glikolik asit içeriği ve düşük molekül ağırlığı, biyobozunma oranını artırmaktadır (Kutlu, 2008). **Şekil 9**'da PLGA polimerinin yapısı ve hidrolizi gösterilmiştir.



Şekil 9. PLGA yapısı ve hidrolizi (Stewart ve ark., 2018).

PLGA; 50:50, 75:25, 80:20, 85:15 gibi monomer oranlarıyla belirtilmektedir. Bu oranlar laktik: glikolik oranını göstermektedir. Polimerin laktik asit miktarı arttıkça daha az hidrolize olduğu ve daha yavaş salım gösterdiği belirtilmektedir (Çırpanlı, 2009; Mohammadi-Samani ve Taghipour, 2015). PLGA; su varlığında

hidroliz yolu ile monomerik asitlerine parçalanıp, krebs döngüsü aracılığı ile CO₂ ve su halinde vücuttan atılırlar. PLGA ile hazırlanan nanopartiküllerin hücreye alınımı ise kısmi pinositoz ve klatrin bağımlı endositoz aracılığıyla olmaktadır (Kutlu, 2008).

PLGA'nın bozunması, cerrahi işlemler olmaksızın implantasyon yoluyla istenilen dozlarda sürekli ilaç salımı için kullanılabileceğini göstermiştir. Ek olarak polimer tipinin; ilaç matriksinin fiziksel özellikleri, molekül ağırlığı, laktik:glisolik oranı ve ilaç konsantrasyonu gibi ilgili parametreleri, ilaç tipine bağlı olarak arzu edilen bir dozaj ve salım aralığının elde edilmesi için ayarlanmasını mümkün kılmaktadır (Yang ve ark., 2001; Dai ve ark., 2005; Parveen ve Sahoo, 2006; Karal-Yılmaz ve ark., 2011). Bununla birlikte; dozun hızlı ve tutarsız salımı ile ilaç-polimer etkileşimlerinden kaynaklanan potansiyel toksisite için ayrıntılı bir değerlendirme gerekmektedir. PLGA; kontrollü ve uzun etkili salım sistemi olarak ilaç taşınmasında yaygın olarak tercih edilmektedir. Polimerin ilaç taşıyıcı sistemler olarak kullanımı mikropartiküller, nanopartiküller veya iskele yapıları gibi sistemler arasında yaygınlık göstermektedir. Bu sistemler erozyon/aşınma kontrollü olup etkin maddenin salımı gerçekleşmektedir (Mohammadi-Samani ve Taghipour, 2015).

PLGA, biyolojik olarak uyumlu olan bir polimerdir. Birçok etkin madde, protein, DNA, RNA ve peptitler gibi çeşitli farklı makromoleküler için ilaç taşıyıcı sistem olarak kapsamlı bir şekilde çalışılmaktadır (Yang ve ark., 2001; Dai ve ark., 2005; Karal-Yılmaz ve ark., 2011). PLGA'nın uzun klinik çalışmaları, elverişli bozunma özellikleri ve kontrollü-uzatılmış ilaç salım olanakları ile, biyolojik olarak parçalanabilen polimerler arasında en popüler olanıdır. Bu polimer birçok tıbbi uygulamalarda kullanılmasıyla birlikte, farklı yara iyileştirici ajanları taşıyarak mutualist bir etki gösterdiği de çalışmalarda vurgulanmaktadır. Antibiyotikler, anti-enflamatuar ilaçlar, proteinler-peptidler ve yara iyileşmesinin çeşitli fazlarını / sinyal döngülerini hedefleyen nükleik asitler gibi etkin maddeleri enkapsülleyerek PLGA'nın ilaç taşıyıcı sistem etkileri tartışılmıştır (Dai ve ark., 2005; Karal-Yılmaz ve ark., 2011).

4.5.1.1. PLGA'nın yara iyileşme üzerine etkisi

Yara tedavisinde PLGA'nın hem kendi etkinliği hemde taşıyıcı sistem olarak katkı sağlaması kombine etki göstermektedir. Laktat, yara iyileşme süreçlerinde önemli bir rol oynamaktadır. Yara iyileşme sırasındaki fizyolojik sonuçlardan biri

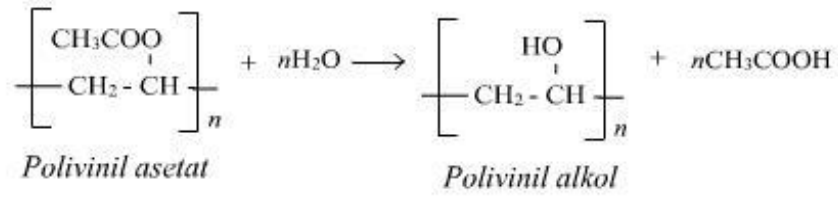
enflamasyon hücreleri tarafından artan oksijen tüketimi ile mikrodolaşımda oluşan hipoksidir. Hipoksi, glikolizasyonu içeren anaerobik solunumu destekler ve son ürünlerden biri olan laktatı üretir (Schreml ve ark., 2010). Yapılan bir çalışmada yaralardaki laktat seviyelerindeki artışın kolajen sentezi ve yara onarımı için önemli bir sinyal olduğunu belirtmiştir. İleri sürülen mekanizma, PHD mono-ADP ribozilasyonunda laktata bağlı fibroblastlarda kollajen prolihdroksilazın (PHD) aktivasyonudur. Kollajen prolihdroksilaz, prokollajen hidroksilasyonu ve kollajen olgunlaşma işlemlerini kontrol eden bir enzimdir. Fibroblastlardaki artmış prokollajen laktat dehidrogenaz 1 (LDH1) ve nükleer poli-ADP-riboz polimerazlar arasındaki substrat rekabetinden etkilendiği bulunmuştur (Constant ve ark., 2000). *In vitro* veriler, laktatın endotelial hücrelerin proliferasyonunu, migrasyonunu ve kılcal oluşumunu uyarabileceğini göstermiştir (Beckert ve ark., 2006). Çalışmalar ayrıca laktat indüklü endotelial progenitör hücrelerin ve vaskülojenin *in vivo* iyileşmesini ve anjiyogenezi de göstermiştir (Beckert ve ark., 2006; Porporato ve ark., 2012).

Porporato ve arkadaşları ekzojen laktat uygulamasının anjiyogenez ve yara iyileşme süreçlerini hızlandırabildiğini, PLGA'nın onarıcı anjiyogenez ve yara iyileşmesini hızlandırmak için laktat tedarik etmek için en uygun polimer olduğunu ortaya koymuştur (Porporato ve ark., 2012). PLGA ve poli (laktik asit) (PLA) 'nın fiziksel, kimyasal ve biyolojik özelliklerinin kapsamlı bir şekilde anlaşılması PLGA'nın seçilmesine yardımcı olmaktadır. PLA ve PLGA *in vivo* laktat salım çalışmaları için test edildiğinde PLGA, tedavi edilmeyen farelere kıyasla laktatın plazma seviyesinde 4 kat artış gösterdiği belirtilmiştir ve PLA ise yara tedavisinde PLGA kadar laktat sağlamadığı ileri sürülmüştür. Ayrıca yapılan bir çalışmada, yaralanma sonrası 10 günlük süreçte yaralı bölgede kontrol grubuna göre yaklaşık % 60 oranında azalma gözlenmiştir. Bu sebeple PLGA terapötik olarak laktat kaynağı olabileceği gösterilmiştir (Jain, 2000; Chereddy ve ark., 2016).

4.5.2. Polivinil alkol (PVA)

4.5.2.1 Polivinil alkol yapısı

Poli (vinil alkol) (PVA), ticari olarak polivinil asetatın üretilmektedir. Hidroksil gruplarına sahip lineer hidrofilik bir polimerdir. İlaç taşıyıcı sistem olarak hidrojelatinin üretiminde yaygın olarak kullanılmaktadır (Guirguis ve Moselhey, 2012; Ullah ve ark., 2019). **Şekil 10**'da PVA polimer yapısı ve eldesi verilmiştir.



Şekil 10. PVA yapısı ve eldesi (Ben Halima, 2016)

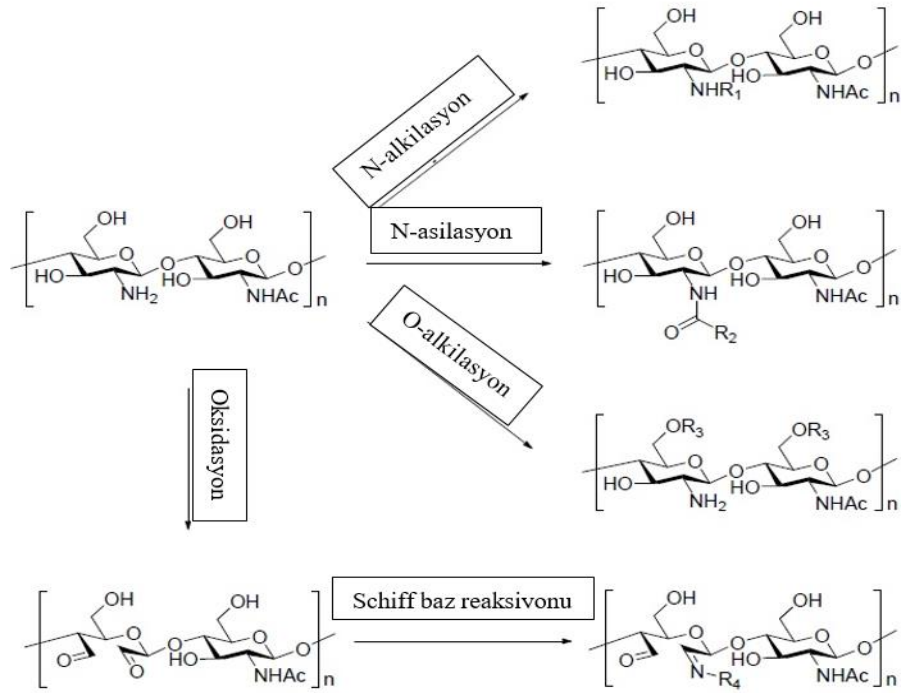
4.5.2.2. Polivinil alkolün genel özellikleri

PVA; termal ve kimyasal stabilite, film oluşturma kabiliyeti, uzun süreli pH ve sıcaklık stabilitesi ve canlı dokularla yüksek biyouyumluluk özelliklerine sahiptir (Deshpande ve ark., 2012). Ayrıca, PVA toksik olmayıp, minimal hücre adezyonu ve protein adsorpsiyon özellikleri göstermektedir (Hassan ve Peppas, 2000). Bununla birlikte, saf PVA hidrojellerinin doğada oldukça kırılgan olduğu bilinmektedir. PVA hidrojelleri ayrıca mekanik bütünlüklerini arttırmak için çapraz bağlama maddeleri veya elektron demetleri veya p-radyasyonu gibi radyasyon kullanılarak kimyasal olarak çapraz bağlanmıştır. Bu sınırlamanın üstesinden gelmek için en yaygın strateji PVA'yı başka bir polimerle kombinasyon halinde bir iç içe geçen polimerik ağ hidrojeline dahil etmektir. PVA, hidrojel oluşturmak için birçok polimerlerle karıştırılabilme özellikliğine sahiptir (Das ve Subuddhi, 2019). Khan ve arkadaşları difenhidramin HCl'nin kontrollü verilmesi için PVA bazlı hidrojelleri çalışmıştır. Polimer omurgasında asılı hidroksil (-OH) nedeniyle artan PVA konsantrasyonunun şişme ve ilaç salımını arttırdığı bildirilmiştir. Ayrıca, hazırlanan hidrojellerin pH 1.2, 5.5 ve 7.5 arasında iyi şişme özellikleri gösterdiği ifade edilmiştir (Khan ve Ranjha, 2014). Bano ve arkadaşları PVA/Kitozan membranların yanık yaralarının iyileşmesinde etkili olduğunu bildirmiştir. Ayrıca şişme ve antibakteriyal özellikleri değerlendirilmiştir (Bano ve ark., 2019).

4.5.3. Kitozan

4.5.3.1. Kitozan yapısı ve eldesi

Biyolojik ve katyonik bir polisakkarit olan kitozan, tıbbi uygulamalarla gelecek vaat eden doğal bir polimerdir. Kitozan; eklem bacaklıların, kabuklu böceklerin ve mantar hücre duvarlarının dış iskeletlerinde yaygın olarak bulunan kitinden üretilen doğal bir biyopolimerdir (Senel ve McClure, 2004; Motiei ve ark., 2017). Yapısal olarak, kitozan doğal amin gruplarına sahip pozitif yüklü bir polisakkarittir. Yapıda β - (1 $\rightarrow$ 4) bağlı N-asetil-D-glukozamin ve D-glukozamin bulunmaktadır (Li ve ark., 2018). **Şekil 11**'de kitozan modifikasyon tipleri belirtilmiştir.



Şekil 11. Kitozan modifikasyon tiplerinin temel reaksiyonları (Li ve ark., 2018).

4.5.3.2. Kitozanın fizikokimya özellikleri

Kitozan; toksik olmayan, biyoyumlu, biyobozunur, antimikrobiyal, hemostatik aktivite gösteren ve mukoadezyon gibi etkili özelliklere sahip bir polimerdir. Vücut tarafından emildikten sonra lizozim ve çeşitli enzimler aracılığı ile oligosakkarit ve monosakkaritlere degrade olurlar. Eşsiz fizikokimyasal ve biyolojik özelliklerine rağmen, kitozan düşük çözünürlüğe ve zayıf mekanik özelliklere

sahiptir. Bununla birlikte, bu sorunları çözebilmek için birçok yaklaşım geliştirilmiştir. Serbest amino ve hidroksil grupları, fonksiyonel proteinlerle yüksek afinite göstermiş ve geliştirilmiş çözünürlüğe sahip çok çeşitli kitozan türevleri üretmek için kullanılmıştır. Bu nedenle kitozan, ilaç / gen / aşı taşıyıcı sistem, doku mühendisliği, yara iyileşmesi ve kozmetik ürünlerin üretimi gibi çeşitli biyomedikal ve farmasötik işlemlerde yaygın olarak kullanılmaktadır (Prabaharan, 2008; Kean ve Thanou, 2010).

4.5.3.3. Kitozanın farmasötik kullanım alanları

Kitozanın özelliklerine ve modifikasyonlarına dayanarak hedeflenen ilaç taşınmasına yönelik potansiyel uygulamalar aşağıdaki gibi özetlenmektedir:

- 1) Biyouyumluluk ve diğer biyoaktif bileşiklerle reaksiyon bölgelerine sahiptir.
- 2) Stabil olmayan ilaç moleküllerinin güçlü mide asitleri ve immün sistem tepkilerinden korunmayı sağlamaktadır.
- 3) Spesifik ilaçların emilimini arttırmak için mukozal dokulara yapışabilmektedir.
- 4) Elektrostatik etki ile DNA gibi anyonik biyomakromoleküllerle kompleks oluşturmada kolaylık sağlamaktadır.
- 5) Birçok polisakkarit gibi kitozanda kolon bölgesinde degrade olduğu için kolon hedefli uygulamalarda yaygın kullanımı yer almaktadır (Wang ve ark., 2015; Lin ve ark., 2015; Mao ve ark., 2010).

4.5.3.4. Kitozanın yara iyileşme üzerine etkisi

Kitozan hidrofilik ve katyonik yüke sahip bir polimerdir. Birçok ilaç etkin maddesi, büyüme faktörleri, kök hücreler ve protein-peptitler için uygun bir ilaç taşıyıcı sistem olarak kullanılabilir. Özellikle yara tedavisinde kitozan temelli hidrojel, nanapatiküller, filmler ve yara örtüleri gibi farklı formülasyonlar, farklı dönemlerde yara iyileşmesini indükleyebilir ve yara iyileşmesini etkileyen olumsuz faktörleri inhibe edebilirler. Yara kasılmasını, iyileşmesini hızlandırma ve hemostatik özellikleri polimerin tercih sebepleri arasındadır. Temel olarak kitozan, yara bölgesinde nemli bir ortam ve ikincil enfeksiyonlara karşı koruma sağlamaktadır. Yara eksüdasını ortamdan uzaklaştırır. Yeniden epitelizeasyona katkıda bulunur. Anjiyogenez ve kolajen maturasyonunu artırmaktadır (Liu ve ark., 2018). Kitozan, yara iyileşmenin erken fazında pro-inflamatuar sitokinleri ve

büyüme faktörlerini üretebilen ve salgılayabilen inflammatuar hücrelerin göçünü teşvik ettiği bulunmuştur (Sezer ve Cevher, 2011).

Modifikasyonlara ek olarak, kitozan her bir bileşenin avantajlarını uygulamak için diğer polimerler ile karıştırılabilir, böylece yara iyileşmede terapötik etkinlikte artış görülmektedir. Sukumar ve arkadaşları ipek, kitosan, aljinat, dekstrin ve rekombinant insan epidermal büyüme faktörü içeren yeni bir hidrojel ile sıçanlarda derin diyabetik yaraların iyileşme sürecini hızlandırdığı ve doku mühendisliği açısından birçok avantaja sahip olduğunu bildirmişlerdir (Sukumar ve ark., 2015). Başka bir çalışmada, PVA/Kitozan hidrojel ile derin ikinci derece yanık olan sıçanlarda kullanılmış ve yaranın parafin gazlı ve pamuklu gazlı bezle tedavi edilenlere kıyasla daha erken iyileştiği bildirilmiştir (Nacer Khodja ve ark., 2013). Arı zehiri içeren PVA/Kitozan hidrojeller ile yapılan diğer bir çalışmada standart bir antienflamatuar ilaç olan diklofenak jel ile karşılaştırılabilecek anti-enflamatuar etki göstermiştir ve kitozan ve arı zehirinin kombinasyonunun, diyabetik sıçanlarda yara iyileşmesini önemli ölçüde hızlandırdığı ileri sürülmüştür (Amin ve Abdel-Raheem, 2014). Sezer ve arkadaşlarının tavşanlarda yapmış oldukları bir çalışmada fukoidan-kitozan ile hazırlanan filmlerin dermal yanık yaralarında 14 gün sonunda diğer tedavi ve kontrol gruplarına kıyasla en iyi dermal papiller rejenerasyon, re-epitelizasyon gözlemlendiği ve yaraların hızlı kapandığı bildirilmiştir (Sezer ve ark., 2007). Başka bir çalışmada ise kitozan- fukoidan ile hazırlanan mikrokürelerin hem *in vitro* hemde *in vivo* uygulama sonuçlarında göre yanık yaralarında tedavisi süresini anlamlı ölçüde kısalttığı bildirilmiştir (Sezer ve ark., 2008).

4.5.4. Dendrimerler

4.5.4.1. Tanımı ve genel özellikleri

Geleneksel olarak polimer teknolojileri ağırlıklı olarak lineer polimerler üzerine odaklanmıştır. Yüksek oranda dallanmış polimerler, dallanmış makromoleküllerin özelliği olarak diğer geleneksel polimerlerden oldukça farklılık göstermektedirler. Dendritik ve yüksek dallı makromoleküllerin benzersiz yapısal özellikleri geleneksel lineer polimerlere nazaran daha çeşitli varyasyonlarda bağ kurarak daha fazla ve yeni fiziksel özellikler oluşturmalarını sağlamaktadır. Dendrimerler, ilaç iletim sistemlerinde kullanılan polimerlerin yapısal formları ile karşılaştırıldığında birçok avantaj sunmaktadır. Dar polidispersiteleri ve nanometre

boyutlarında olmaları, biyolojik bariyerleri geçmelerinde kolaylık sağlamaktadır. (örn: ekstrevasyon altından vasküler endotel dokulara ulaşacak kadar küçüklerdir) (Nanjwade ve ark., 2009).

Dendrimerler, polimerik malzemelerin yeni bir sınıfı olarak nano-boyutlu, iyi tanımlanmış homojen ve ağaç benzeri atomlardan veya dallanmış yapılardan oluşan monodispers sistemlerdir. Bu malzemelerin yapısı, fiziksel ve kimyasal özellikleri üzerinde büyük bir etkiye sahiptir. Benzersiz davranışlarının bir sonucu olarak, dendrimerler çok çeşitli biyomedikal ve endüstriyel uygulamalarda tercih edilmektedir. Bunlar, proteinler gibi biyomoleküllere benzer boyutlara ve fizikokimyasal özelliklere sahip çok yönlü, iyi tanımlanmış, bölümlere ayrılmış polimerlerdir (Nanjwade ve ark., 2009; Jain ve ark., 2010).

Bu çoklu dallanmış moleküller 1978'de Fritz Vogtle tarafından, 1980'lerin başında Donald Tomalia ve arkadaşları tarafından ve aynı zamanda fakat bağımsız olarak George R. Newkome tarafından keşfedilmiştir. "Dendrimer" kelimesi iki kelimeden oluşan, Yunanca "dendron" anlamına gelen ağaç ve "meros" anlamındaki birim kelimelerinin birleşimidir. Bunlar aynı zamanda "kaskat molekülleri" olarak da adlandırılabilir. Dendrimerler, küçük bir molekül veya doğrusal bir polimer çekirdeği etrafında oluşturulan simetrik dallanma birimleri içeren makromoleküllerdir. Poliyonik dendrimerler kalıcı bir şekle sahip değildir ve artan jenerasyonlar ile boyut, şekil ve esneklik gibi özellikleri değişkenlik göstermektedir (Nanjwade ve ark., 2009).

Dendrimerler, suda çözünür, biyoyararlanımı ve biyouyumluluğu yüksek moleküller olduğu için ilaç taşıyıcı sistemlerde ve farklı ilaç uygulama yollarında çokça tercih edilmektedir. Dendrimerler, dallı monomer birimlerinden basamak basamak sentezlendiğinden, farklı dallanma birimleri ve yüzey fonksiyonel grupları seçerek molekül büyüklüğü, şekli, boyutu, yoğunluğu, polaritesi, esnekliği ve çözünürlüğü üzerinde kontrol sağlamak mümkündür. Dendrimerler, iç kavite boşluklara ve açık konformasyona sahip olduğu için hidrofobik ilaç moleküllerini enkapsüllemesini sağlamaktadır (özellikle düşük jenerasyon formları). Ek olarak, geleneksel makromoleküllere kıyasla çok daha yüksek bir yüzey fonksiyonel grup yoğunluğuna da sahiptirler (Nanjwade ve ark., 2009; Noriega-Luna ve ark., 2014).

4.5.4.2. Dendrimerlerin yapısı

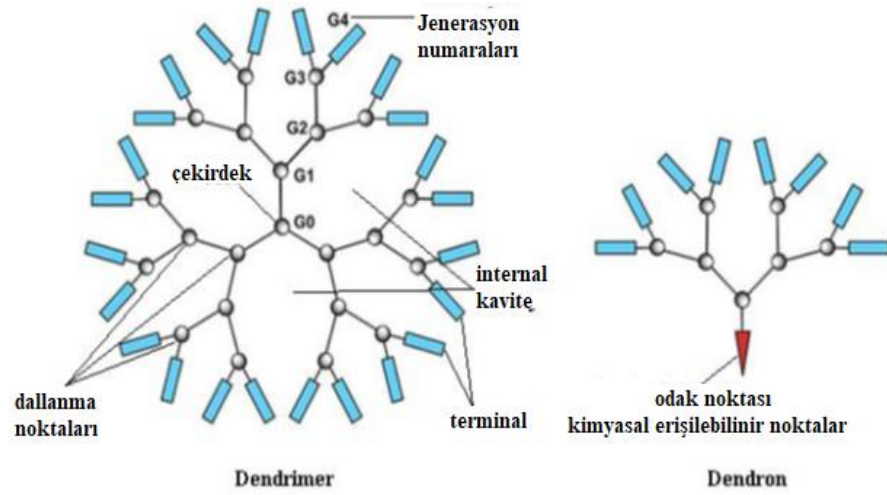
Dendrimerler, başlangıç atomları karbon ve azot ile diğer elementlerin küresel bir dallanma yapısı oluşturarak tekrarlayan bir dizi kimyasal reaksiyonla eklenen yapılardır. İşlem tekrarlanırken, ardışık katmanlar eklenir ve küre araştırmacı tarafından istenen boyuta genişletilebilir. Son hali, büyüklüğü küresel olan makromoleküler yapıdır. Bu yapılar kandaki albümin ve hemoglobine benzemektedir (Nanjwade ve ark., 2009; Tian ve Ma, 2013).

Tipik bir dendrimer yapı, üç bileşenden oluşur:

- ✓ Bir başlatıcı çekirdek, dendrimerin büyüklüğünü ve şeklini belirler;
- ✓ İç katmanlara veya iç çekirdeğe radyal olarak tutturulan tekrarlayan birimlerden oluşan kuşaklar, dendrimer tarafından kapatılabilecek boşluğunun miktarını belirler;
- ✓ Yüzeye eklenen her yapı, dendrimer veya diğer kimyasal modifikasyonların büyümesine izin vermektedir (Noriega-Luna ve ark., 2014).

4.5.4.3. Dendrimerlerin adlandırılması

Dendrimer üretimi, dendrimerin merkezinden periferik doğru giderken odaklanır ve dallanma noktaları arasında homostural tabakalara neden olur. Çekirdekten dendrimer yüzeye doğru giderken odak noktalarının sayısı üretim sayısıdır, yani merkezden çevreye giderken dört odak noktasına sahip olan bir dendrimer, 4. nesil dendrimer olarak gösterilmektedir. Burada, bu terim sadece bir G4-dendrimer olarak kısaltılmıştır, örneğin 4. nesil bir polipropilen imin bir “G4-PPI-” dendrimer olarak kısaltılmıştır. Dendrimerin çekirdek kısmı “sıfırıncı” nesil veya “G0” olarak terminolojide gösterilmektedir. Bu nedenle çekirdek yapı, odak noktaları olarak kabul edilmediğinden, çekirdek yapı hiçbir odak noktası sunmamaktadır. Dendrimer sentezi sırasındaki ara moleküller bazen yarım jenerasyonlar olarak da adlandırılmaktadır (Jain ve ark., 2010; Noriega-Luna ve ark., 2014). **Şekil 12'** de dendrimer yapısı ve jenerasyon özelliği gösterilmiştir.



Şekil 12. Dördüncü jenerasyon dendrimerlerin temsili - Merkezi bir inisyatör çekirdeğinden başlayarak tekrarlayan bir dizi mermi dizisinden oluşur. Sonraki her bir kabuk, daha büyük bir moleküler çapa, iki katı reaktif yüzey alanına sahip yeni bir "nesil" polimeri temsil eder ve önceki jenerasyonun molekül ağırlığının yaklaşık iki katıdır (Noriega-Luna ve ark., 2014).

4.5.4.4. Dendrimerlerin ilaç taşıyıcı sistem olarak gerekli özellikleri

Dendrimerleri ilaç taşıyıcı sistem olarak *in vivo* ve *in vitro* uygulamalarda belli özellikleri taşıması gerekmektedir. İlacın yan etkilerinin en aza indirgenmesi, taşıyıcının özelliklerini değiştirerek sağlanabilmektedir. İdeal dendrimerler aşağıdaki özellikleri taşımalıdır: (Liu ve ark., 2012; Noriega-Luna ve ark., 2014)

- İmmünojenik ve toksik olmamalı;
- Biyoparçalanabilir olmalı;
- Bağırsak, kan-doku ve hücre membranı gibi bariyerleri aşabilmeli;
- Klinik etkiyi sağlamak için gerekli süre içinde dolaşımda kalabilmeli;
- Spesifik yapılara hedeflenebilmeli;
- Bağlı olduğu moleküller ile uyumlu olmalı ve etkin maddenin stabilitesini sağlamalıdır (Liu ve ark., 2012; Noriega-Luna ve ark., 2014).

4.5.4.5. Dendrimerlerin fizikokimyasal özellikleri

Dendrimerlerin özellikleri mümkün olduğunca, farmasötik uygulamalar için geliştirilmektedir. Yapısal olarak; proteinler, DNA vb. gibi önemli biyolojik yapılara benzer boyutlara sahiptir. Bir ilacın farmakokinetik ve farmakodinamik özelliklerini

geliştirerek, böylece biyoyararlanımda da bir artış sağlamaktadır. İlaçların, sinyal gruplarının, hedefleme gruplarının veya biyouyumluluk gruplarının biyo-konjugasyonu için uygun çok sayıda terminal yüzey grubuna sahiptir. Dendrimer yüzeyleri, transselüler, epitelyal veya vasküler biyogeçirgenliği arttırmak veya dirençli hale getirmek için fonksiyonel gruplar ile tasarlanabilmektedir. İç kavitelere boşluk, küçük moleküllü ilaçları, metalleri veya görüntüleme ajanlarının enkapsülasyonu için olanak sağlamaktadır. Bu boşlukta enkapsülasyonun toksisitesini azaltmasına ve uzatılmış salımına katkı sağlamaktadır (Boas ve ark., 2006).

Yüksek jenerasyonlu dendrimerler, nötr, apolar ve katyonik yüzey gruplarına sahip olanlar; düşük nesil dendrimerler, anyonik veya nötr kutuplu terminal yüzey grupları taşıyanlar ile karşılaştırıldığında daha biyouyumlu olduğu belirtilmiştir. Küçük fonksiyonel gruplar veya polietilen glikol (PEG) ile modifiye edilen birçok dendrimerin immünojenitesi daha düşük veya hiç yoktur. Biyodağılımı optimize etmek için modifiye edilebilen yüzey grupları; reseptör aracılı hedefleme, tedavi dozajı veya ilacın iç alandan kontrollü salımına katkı sağlamaktadır. Nano boyutları sayesinde vücuttan atılması daha kolaydır. Doğrusal polimerlerde yapılamayan; dendrimerlerin boyutu ve moleküler kütlesi, sentez sırasında spesifik olarak kontrol edilebilir. Dendrimerler, doğrusal polimerlere kıyasla daha düşük viskoziteye sahiptir. Bu yapıların moleküler kütlesi arttığında, viskoziteleri dördüncü jenerasyonda maksimumdan geçer ve sonra da azalmaya başlar. Bu davranış, doğrusal polimerlerinkinden farklıdır. Dendrimerler birçok zincir ucunun varlığı nedeniyle yüksek çözünürlük, karışabilirlik ve reaktiviteye sahiptir. Bu taşıyıcılar, çok sayıda çözücü içinde çözünürlüğe sahiptir. Hidrofilik gruplarda sonlanan dendrimerler polar çözücülerde çözünürken, hidrofobik uç gruplara sahip olan dendrimerler polar olmayan çözücüler içinde de çözünebilmektedirler. Geleneksel lineer polimerlerden farklı olarak, adım adım sentezlenen dendrimerler, çok düşük bir polidispersiteye sahip iyi organize edilmiş yapılara sahiptir. Çok yönlü fonksiyonel gruplara sahip olduğu için örneğin antiviral terapötik maddeler gibi biyolojik reseptör bölgeleri ile çoklu etkileşimler sağlanmasında rol almaktadır (Jain ve ark., 2010; Imae, 2012; Liu ve ark., 2012).

4.5.4.6. Dendrimer tipleri

PAMAM Dendrimer - Poliamidoamin (PAMAM) dendrimerler, küresel veya eliptik formdadır. Başlangıç materyali olarak amonyak veya etilendiamin kullanılarak sentezlenirler. Bunların yüksek çözünürlüğü ve reaktivitesi, yüzeydeki fonksiyonel uç grupların ve iç kavitelerinin varlığından kaynaklanmaktadır. PAMAM dendrimerler, genellikle metanol çözeltisi içerisinde ticari olarak temin edilmektedir. Starbust ticari isimli dendrimerler, bir trisaminoetilenimin çekirdeğine dayanan bir PAMAM alt tip dendrimeridir. Ticari ismin kaynağı, bu tipteki yüksek kuşak dendrimerlerin yapısına bakıldığında gözlenen yıldız benzeri kısımlardan etkilenmiştir (Jain ve ark., 2010; Tian ve Ma, 2013; Noriega-Luna ve ark., 2014).

PAMAMOS Dendrimer - Poliamidoamin Organosilikon (PAMAMOS), ilk ticari dendrimer içeren silikonlardır. Hidrofilik ve nükleofilik poliamidoamin (PAMAM) iç, hidrofobik organosilikon (OS) dış kısımlarından oluşan tersinir moleküler olmayan misellerdir. Bu dendrimerler, nanoskopik PAMAM ve OS alanları ile petek benzeri ağların hazırlanması için son derece yararlı öncül moleküllerdir (Jain ve ark., 2010; Tian ve Ma, 2013).

PPI Dendrimer – Polipropilenimin (PPI) başlangıçta Vogtle tarafından geliştirilen bilinen en eski dendrimerlerden biridir. Çekirdek yapısı, uç grup olarak birincil aminler ve iç kısımda tersiyer propilen aminleri olan diamino bütan (DAB) yapısına dayanmaktadır. Bu dendrimerler "DAB-dendrimerler" olarak da anılmaktadır. PPI dendrimerler ticari olarak G5'e kadar temin edilebilmektedir ve malzeme bilimi ve biyoloji alanında yaygın kullanımı bulunmaktadır. Bunlar Astramol™ ticari olarak mevcuttur (Jain ve ark., 2010; Tian ve Ma, 2013; Noriega-Luna ve ark., 2014).

Tecto Dendrimer - Diğer dendrimerler tarafından çevrelenmiş terapötik ajan içermeyen bir çekirdekten oluşmaktadır, eş zamanlı olarak teşhis ve tedavi edebilen yapılara sahiptir. Farklı bileşiklerle; hastalıklı hücre tanıma, hastalık durumunun teşhisi, ilaç dağılımı ve tedavi sonuçlarının raporlanması gibi çeşitli fonksiyonlar gerçekleştirebilmektedir (Jain ve ark., 2010; Shinde ve ark., 2010; Baig ve Nayak, 2015).

Sıvı Kristalli Dendrimerler - Mezofaz davranışını gösterebilen mezojenik gruplar içeren yüksek derecede dallanmış oligomer veya dendritik yapılı bir

polimerdir. Bunlar mezojenik (sıvı kristali) monomerlerdir. Örnek olarak mezojen fonksiyonelleştirilmiş karbosilan dendrimerleri verilebilir (Jain ve ark., 2010; Shinde ve ark., 2010; Noriega-Luna ve ark., 2014).

Çok Dilli Dendrimerler - Bu dendrimerler, yüzeylerindeki belirli bir fonksiyonel grubun çoklu kopyalarından oluşmaktadır (Jain ve ark., 2010; Shinde ve ark., 2010; Noriega-Luna ve ark., 2014).

Kiral Dendrimerler - Bu dendrimerlerdeki kiralite, kiral çekirdeğe yapısal olarak farklı fakat kimyasal olarak benzer dalların bağlanmasına dayanmaktadır. Enantiomerik çözünürlükler için kiral yapılar ve asimetrik sentez için kiral katalizörler olarak potansiyel kullanımları bilinmektedir (Jain ve ark., 2010; Shinde ve ark., 2010; Baig ve Nayak, 2015).

Hibrid Dendrimerler - Hem dendritik hem de liner polimerleri içeren kopolimer yapılarıdır. Hibrid dendrimerler, "sıfır jenerasyon" un periferik aminlerinin tamamen tek fonksiyonlu hale getirilmesiyle elde edilmektedir (Jain ve ark., 2010; Abbasi ve ark., 2014)

Polietilenimin dendrimer- Modifiye edilmiş diğer dendritik yapılardan daha kolay temin edilebilen yapısal olarak çeşitli katmanlı, sütunlu ve kübik kendiliğinden düzenlenmiş kafesler şeklindeki yapılardır (Jain ve ark., 2010; Shinde ve ark., 2010; Noriega-Luna ve ark., 2014).

Amfifilik Dendrimerler - Zincir ucunun iki ayrılmış bölgesinden, bir yarısı elektron veren ve diğer yarısı elektron çeken yapılardan oluşmaktadır (Jain ve ark., 2010; Shinde ve ark., 2010; Noriega-Luna ve ark., 2014).

Miseller Dendrimerler - Suda çözünür hiper dallı polifenilen misellerin tek molekülü miselleridir (Jain ve ark., 2010; Shinde ve ark., 2010; Noriega-Luna ve ark., 2014).

Peptid Dendrimerler - Bu dendrimerler dallanma veya iç ünite olarak amino asitlerden oluşur. Polilizin iskeletine dayanan bir dendrondur. Bu tip dendrimerler 1988 yılında J. P. Tam tarafından tanıtılmıştır, ağırlıklı olarak aşı ve hastalık teşhisi araştırmaları gibi biyolojik uygulamalarda kullanılmıştır (Jain ve ark., 2010; Shinde ve ark., 2010; Noriega-Luna ve ark., 2014).

Frechet-Tipi Dendrimerler - Hawker ve Frechet tarafından geliştirilen ve polibenzil eter hiper dallı iskeletine dayanan daha yeni bir dendrimer tipidir. Bu

dendrimerler genellikle yüzey grupları olarak karboksilik asit gruplarına sahiptirler, daha fazla yüzey kurgusu için iyi bir sabitleme noktası olarak işlev görürler ve bu hidrofobik dendrimer tipinin çözünürlüğünü arttırmak için polar yüzey grupları kullanılmaktadır (Frechet, 2002; Jain ve ark., 2010).

Glikodendrimerler- Karbonhidrat gruplarının dendrimer yapısına bağlanmasıyla oluşturulmaktadır. Bu dendrimerler iki gruba ayrılmaktadır. Birincisi karbonhidrat kaplı dendrimerler; ikincisi karbonhidrat merkezli dendrimerlerdir. Bu yapılar; protein-karbonhidrat etkileşimleri gibi birçok interselüler biyolojik çalışmalarda kullanılmaktadır (Jain ve ark., 2010; Shinde ve ark., 2010; Baig ve Nayak, 2015).

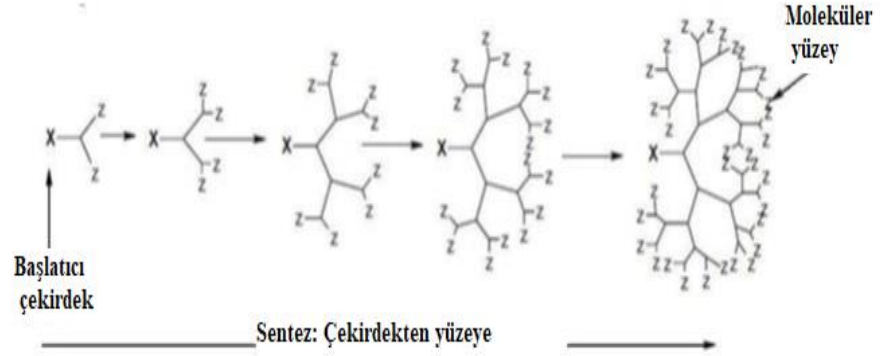
4.5.4.7. Dendrimer sentez metodları

1) Iraksak Dendrimer Sentez Metodu

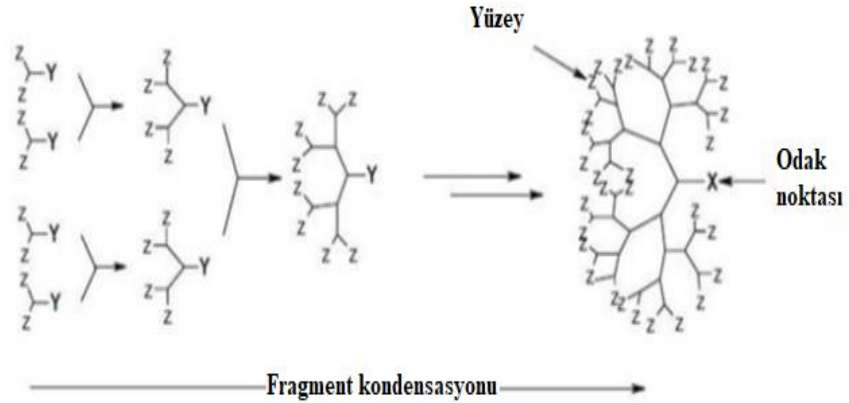
Bu yöntem ilk olarak Tomalia tarafından tanıtılmıştır. Yöntemde dendrimerlerin büyümesi çekirdek bir bölgeden kaynaklanmaktadır. Çekirdek, en az iki koruyucu dallanma bölgesi içeren iki veya daha fazla sayıda reaktif ile tepkimeye sokulur, ardından koruyucu grupların çıkarılması, birinci nesil dendrimerleri oluşturmaktadır. Bu işlem istenilen büyüklükteki dendrimer elde edilene kadar tekrarlanır. Bu yaklaşımla, ilk sentezlenmiş dendrimerler, ayrıca starbust dendrimerler olarak bilinen poliamidoaminlerdir (Jain ve ark., 2010; Noriega-Luna ve ark., 2014).

2) Yakınsak Dendrimer Sentez Metodu

Yakınsak dendrimer sentezi, final yüzey grubunun ne olacağıyla başlamaktadır. Dendrimer, yüzey ünitelerini giderek daha fazla birbirine bağlayarak içe doğru ilerlemektedir. Büyüyen yapılar yeterince büyük olduğunda, birkaç tanesi tam bir dendrimer vermek için uygun bir çekirdeğe eklenir. Yakınsak büyüme yönteminin, arzu edilen ürünü saflaştırmanın nispeten kolay olması gibi birkaç avantajı vardır, nihai yapıdaki kusurların meydana gelmesi minimize edilir, dendronların ve çekirdek molekülün reaksiyonlarında steirik problemler meydana geldiği için yüksek jenerasyon dendrimer sentezi için uygun değildir (Jain ve ark., 2010; Liu ve ark., 2012; Noriega-Luna ve ark., 2014). Şekil 13 ve Şekil 14' te hem iraksak hem de yakınsak dendrimer sentez metodu gösterilmiştir.



Şekil 13: İraksak Dendrimer Sentez Metodu: Çekirdek, en az iki koruyucu dallanma bölgesi içeren iki veya daha fazla sayıda reaktif molü ile reaksiyona sokulur, ardından koruyucu grupların uzaklaştırılması sağlanır (Jain ve ark., 2010).



Şekil 14: Yakınsak Dendrimer Sentez Metodu: Yüzey üniteleri kademeli olarak sentezlenip dallanma noktaları ile birbirine bağlayarak oluşturulur (Jain ve ark., 2010).

3) Çift Üstel ve Karışık Dendrimer Sentez Metodu

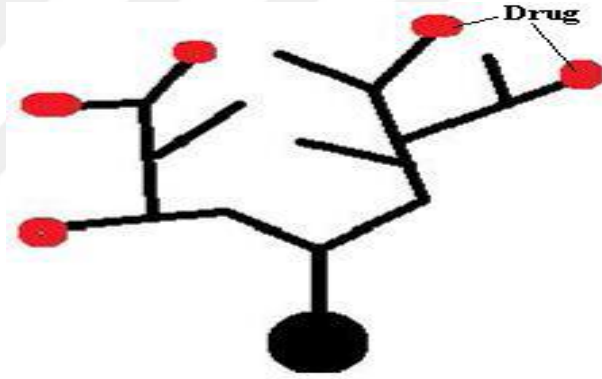
Bu yaklaşımda, iki ürün (hem yakınsak hem de ıraksak büyüme için monomerler), büyüme sürecini tekrarlamak için kullanılmaktadır. Ortogonal olarak korunan bir trimer vermek üzere birlikte reaksiyona sokulur. Çifte üstel büyümenin gücü, nispeten az sayıda adımda büyük dendrimerler oluşturma olanağı sağlamaktadır (Jain ve ark., 2010; Noriega-Luna ve ark., 2014).

4) Hiperçekirdekli ve Dalılı Monomerler ile Dendrimer Sentez Metodu

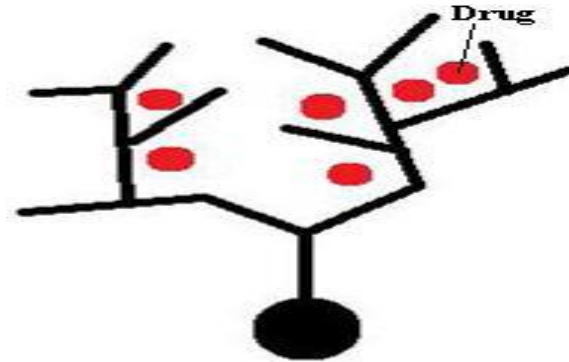
Bu yöntem, bir dalda, daha az adımda veya daha yüksek verimlerde dendrimerler oluşturmak üzere birbirine bağlanabilen oligomerik türlerin önformunu içermektedir. Çekirdek, en az iki koruyucu dallanma bölgesi içeren iki veya daha fazla sayıda reaktif molü ile tepkimeye sokulur, ardından koruyucu grupların uzaklaştırılması sağlanır. Sonraki serbestleştirilmiş reaktif alanlar, ilk nesil dendrimerleri oluşturmaktadır (Jain ve ark., 2010; Noriega-Luna ve ark., 2014).

4.5.4.8. Dendrimerler yoluyla ilaç dağıtım mekanizması

İyi tanımlanmış 3D yapısı ve birçok fonksiyonel yüzey grubu, ilaç moleküllerinin hem dendrimerlerin iç kısmına enkapsülasyonu hem de yüzey gruplarına elektrostatik veya kovalent bağlanma olanağını sağlamaktadır (Nanjwade ve ark., 2009). İlaç taşınmasında kullanılan bu Şekil 15 ve Şekil 16'da belirtilmiştir.



Şekil 15. Dendrimer yüzeyine bağlı ilaç molekülü (Nanjwade ve ark., 2009)



Şekil 16. Dendrimerin iç kavitelerine enkapsüle edilen ilaç molekülü (Nanjwade ve ark., 2009).

4.5.4.9.Dendrimerlerin farmasötik uygulama alanları

Yüzeyden, içten ve çekirdekten farklı uygulamalara uyarlanabileceğinden, artık her biri benzersiz özelliklere sahip 50'den fazla dendrimer ailesi vardır. Dendrimerlerin birçok potansiyel uygulaması, benzersiz moleküler yapılarına, çok işlevli yüzey ve iç kavitelerinin varlığına dayanmaktadır. Bu spesifik özellikler, dendrimerleri biyomedikal ve endüstriyel uygulamalar dahil olmak üzere çeşitli teknolojik kullanımlara uygun hale getirmiştir (Nanjwade ve ark., 2009).

Dendrimerler, çeşitli sitotoksik ilaç maddeleri için hedeflenen moleküller olarak kullanılmakla birlikte ayrıca çeşitli hastalıkları tedavi etmek için aktif kısım olarak da kullanılmaktadır, böylece son yıllarda dendrimerler farmasötik alanda popülerlik kazanmıştır (Nanjwade ve ark., 2009; Jain ve ark., 2010; Noriega-Luna ve ark., 2014).

1) Biyomedikal Alanda Dendrimerler

Dendritik polimerler yapısal olarak protein, enzim ve virüslere benzemektedir ve kolayca fonksiyonlaşabilmektedirler. Dendrimerler, diğer molekülleri ya yüzeye bağlayabilir ya da iç boşluklarına enkapsüle edebilirler. Dendrimer, biyolojik ajan olarak değerlendirilmesi için belirli özelliklere sahip olmalıdır. Başlıca bu özellikler toksik ve immünojenik olmaması, biyolojik geçirgen olması ve spesifik yapıyı hedefleyebilmesidir. Spesifik senteze bağlı olarak PAMAM dendrimerler, klasik olan benzerlerinden ayrılarak Starbust makromolekül geliştirilmiştir. PAMAM dendrimerler ayrıca tümör hücrelerini hedeflemek için kullanılmaktadır. Hedefleme amaçlı görüntüleme ajanı belirli bir bölgeye seçici olarak bağlanması için dendrimer yüzeyine konjuge edilebilir. Sisplatin ile yapılan bir çalışmada, karboksilat sonlu bir PAMAM dendrimerin yüzey gruplarıyla kompleks oluşturulmuştur; bu kompleks serbest ilaç ile karşılaştırıldığında, sisplatin'in çözünürlüğünde on kat bir artış sağlanmıştır (Cheng ve ark., 2008; Nanjwade ve ark., 2009; Noriega-Luna ve ark., 2014; Gupta ve Perumal, 2014; Baig ve Nayak, 2015).

2) Manyetik Rezonans Görüntüleme Kontrast Ajanları Olarak Dendrimer

Dendrimer bazlı metal şelatlar, manyetik rezonans görüntüleme kontrast ajanı olarak görev yapmaktadır. Dendrimerler, özelliklerinden dolayı görüntü kontrast maddesi olarak çok uygun yapıdadırlar ve üzerinde yapılan birçok test bunların geleneksel olanlardan daha güçlü bir kontrast maddesi olduğunu göstermiştir.

Vücudun manyetik rezonans anjiyografisinde (MRA) vasküler yapının görüntülenmesini geliştirebilmektedir (Nanjwade ve ark., 2009; Noriega-Luna ve ark., 2014). Ayrıca, altıncı nesil poligadolinium dendrimer, monovalent gadolinium ajanın 24 dakika yarı ömrü ile karşılaştırıldığında, 200 dakikalık bir yarı ömre sahip uzatılmış bir artış göstermiştir. Bu uzun süreli geliştirme süresi, 3D MR anjiyografisi için son derece kullanışlıdır. Son çalışmada, dendrimer bazlı bir MRI ajanın moleküler boyutunun atılım yolunu değiştirdiği bulunmuştur. 60 kDa'dan daha az moleküler ağırlığa sahip kontrast ajanları, böbreklerden uygun şekilde atılmaktadır. Daha büyük boyutlu ve hidrofilik kontrast ajanları kan havuzu kontrast ajanı olarak kullanım için daha uygun bulunmuştur. Lenfatik görüntüleme için daha büyük hidrofilik ajanlar kullanılmıştır (Cheng ve ark., 2008; Nanjwade ve ark., 2009; Noriega-Luna ve ark., 2014; Gupta ve Perumal, 2014; Baig ve Nayak, 2015).

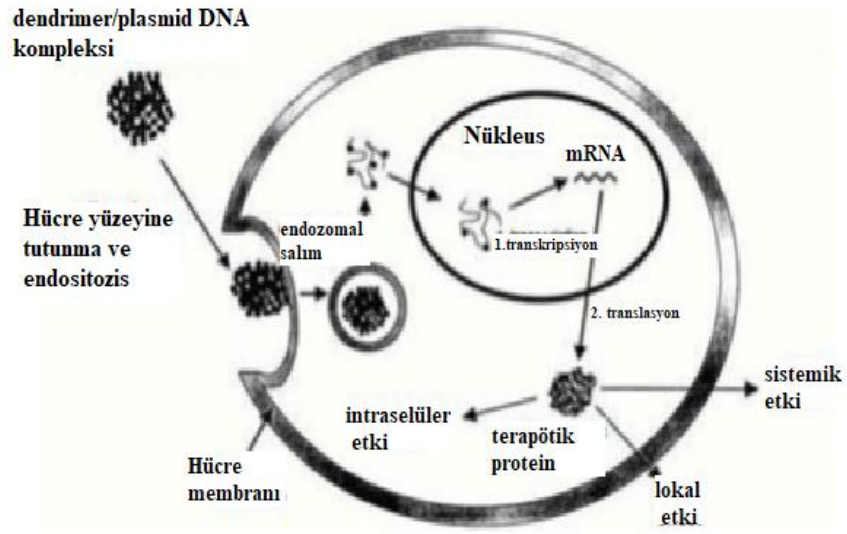
3) Antitümör Tedavisinde Kullanılan Dendrimerler

Dendrimerler, manyetik rezonans görüntüleme ve kontrast madde olarak tümör görüntüleme için diagnostik reaktif olarak kullanılmıştır. Boyutu ve hidrofilikliği değiştirilerek ve tümör hedefleyici antikolarla birleştirilerek, bu bileşikler bir dizi spesifik görüntüleme amacı için kullanılabilir. Kullanılan ilaç, radyasyona maruz bırakılmayan koşullar altında toksik olmamalı, böylece ışınlanmadığı zaman ön ilaç görevi görmelidir. 5-aminolevulinik asit gibi ışığa duyarlı maddeler içeren dendrimerler, dendrimerlerin yüzeyine bağlanmış ve tümörjenik keratinositlerin fotodinamik tedavisi (PDT) için bir ajan olarak çalışılmıştır. Ayrıca, glikodendrimer önemli bir terapötik moleküller sınıfı oluşturmaktadır. Dendrimerler, karsinomayı engellemek için karsinomadan türetilmiş T-antigen bağlama reseptörleri ile etkileşime girecek bir ilacın üretilmesi amacıyla araştırılmıştır. Bu tip glikodendrimer, daha yüksek afiniteye sahip olan daha yüksek jenerasyona sahip T-antijenine karşı monoklonal antikolar ile nesile bağımlı bir şekilde reaksiyona girmiştir. Dendrimerlerin kanserde terapötik kullanımları ve teşhis amaçlı kullanımı giderek artmaktadır (Cheng ve ark., 2008; Noriega-Luna ve ark., 2014; Gupta ve Perumal, 2014; Baig ve Nayak, 2015).

4) Gen Transfeksiyonunda Dendrimerler

Gen transfeksiyonu, DNA'nın inert bir taşıyıcıyla veya doğrudan hücre çekirdeğine hedefli verilmesidir. Bu süreç, genlerin regülasyon süreçleri veya istenen proteinlerin ekspresyonunu ve mutasyonları incelemek için moleküler biyolojide çok değerli bir araç haline gelmiştir. Transfeksiyon için ideal vektör, yüksek verime sahip, immünojenik ve toksik olmayan, biyoparçalanabilir ve uzun kan dolaşım süresine sahip olmalıdır. PAMAM dendrimerler, genetik materyal taşıyıcıları olarak test edilen ilk dendrimerlerdir. Amino sonlu PAMAM veya PPI dendrimerler, viral olmayan gen transfer ajanları olarak bildirilmiş ve DNA'nın endositoz ile transfeksiyonu ve sonuçta hücre çekirdeğine taşındığı belirtilmiştir. Aktif dendrimerler içeren SuperFect™ adlı bir transfeksiyon reaktifi ticari olarak bulunmaktadır. Bu aktive edilmiş dendrimerler, virüslerden daha büyük miktarda genetik materyal taşıma kapasitesine sahiptir (Jain ve ark., 2010; Noriega-Luna ve ark., 2014).

SuperFect – DNA kompleksleri yüksek stabilite ile karakterize edilir ve DNA'nın çekirdeğe lipozomlardan daha verimli taşınmasını sağladığı bildirilmiştir. Dendrimerlerin yüksek transfeksiyon etkinliği, iyi tanımlanmış yapılarından ve endozomal kaçışdaki pH değişimini tamponlamasına izin veren aminlerin (3.9 ve 6.9) düşük pKa'sından kaynaklanmaktadır. Siklodekstrin ile modifiye edilen PAMAM dendrimerler, lusiferaz gen ekspresyonunda, modifiye olmayan PAMAM'dan yaklaşık 100 kat daha yüksek bir ekspresyon gösterdiği de çalışmalarda belirtilmiştir (Cheng ve ark., 2008; Jain ve ark., 2010; Noriega-Luna ve ark., 2014; Gupta ve Perumal, 2014). **Şekil 17'**de dendrimer-plazmid DNA kompleksinin transfeksiyonu ve hücre içi yolu gösterilmiştir.



Şekil 17. Plazmid DNA ile kompleks haline getirilen dendrimer, terapötik protein üreten ve hücre içi, lokal ve sistemik etki sağlayan hücre çekirdeğini hedef alır (Jain ve ark., 2010).

5) Biyomimetik Olarak Dendrimerler

İyi tanımlanmış makromoleküler boyutlara ve bölmeli yapıya sahip olan dendrimerler, çok çeşitli biyomoleküller için ideal taklitlerdir. Ticari olarak temin edilebilen dendrimerler mikro bir çevre oluşturma olanağı sağlamaktadır, bu da yapay katalitik bölgeler veya enzim taklitçilerinin yapımı için farklı özelliklere sahip boşluklar oluşturmaktadır. Dendrimer molekülleri, iskeletlerinin sertliğine veya konformasyonel hareketliliğine bağlı olarak karakterize edilirler ve doğal olarak oluşan proteinlere kıyasla daha elverişli özellikler sağlayabilirler. Doğal proteinlere göre daha yoğun bir şekilde paketlenmiş yapı, örneğin bazı peptid temelli dendrimer sistemi proteazlara karşı belirgin bir artış göstermiştir. Dendrimerler ayrıca spesifik biyolojik tanıma için doğada kullanılan çeşitli protein bazlı reseptörleri taklit edebilirler. Glikomimetikler, yapısı sadeleştirilmiş ve modifiye edilmiş analog karbonhidratlardır. Romatizma, dermatit ve sedef hastalığı gibi kronik iltihaplı rahatsızlıkların tedavisi için kullanılabilen aktif bir moleküllerdir (Jain ve ark., 2010; Gupta ve Perumal, 2014).

6) Transdermal İlaç Taşınmasında Dendrimerler

Transdermal taşıyıcı sistemler, mevcut olan ilaç rezervuarı boyunca kısa yarı ömre sahip olan ilacın aktivitesini ve salım özelliklerini uzatarak ilacın kontrollü, sürekli uygulanmasını amaçlamaktadır. Akut ve kronik romatoid ve osteoartrit tedavisinde çok etkili olan ketoprofen, diflunisal gibi non-steroidal antiinflatuar ilaçlar ile PAMAM dendrimer kompleksi, penetrasyon artırıcı olarak deri yoluyla ilaç nüfuzunu artırmıştır. Ketoprofen ve diflunisal ilaçları G5 PAMAM dendrimer ile konjuge edilerek farklı çalışmalar için de araştırmalar yapılmıştır (Cheng ve ark., 2008; Gupta ve Perumal, 2014; Baig ve Nayak, 2015).

7) Oral İlaç Taşınmasında Dendrimerler

Oral ilaç taşınmasında en popüler ilaç uygulama yollarından biridir ve üretim kolaylığı, düşük maliyet, uygulama kolaylığı ve dozajın tasarlanmasında esneklik nedeniyle farmasötik alanda daha fazla ilgi görmüştür. Oral ilaç taşınması, uygulama tipi, tedavi edilen hastalık ve hasta, tedavinin süresi ve ilacın özellikleri gibi çeşitli faktörlere bağlıdır. Oral kullanım için kontrollü salım sistemi çoğunlukla çözünme, difüzyon veya ilacın salım oranının kontrolünde her iki mekanizmanın kombinasyonuna dayanan katı maddelerdir. Oral ilaç uygulamasının önemli bir avantajı, ilacın yavaşça dozajdan salınması ve kontrollü ilaç salımı ile daha az dalgalanan plazma ilaç seviyesinin korunmasıdır; fakat düşük çözünürlük gibi bazı sorunları vardır (Cheng ve ark., 2008; Gupta ve Perumal, 2014; Baig ve Nayak, 2015).

8) Oküler İlaç Taşınmasında Dendrimerler

Aktif ilaçların göze lokal olarak uygulanması, oküler bozuklukların tedavisi için en çok verilen uygulama yoludur. Dendrimerler, oküler ilaç taşınması için çeşitli avantajlar sunmaktadır. İdeal bir oküler ilaç taşıyıcı sistem tahriş edici olmayan, biyouyumlu, steril, izotonik ve biyolojik olarak parçalanabilmelidir. Oküler ilaç uygulamasına yönelik son problemler arasında, göz içinde pilokarpinin kalma süresini arttırma çalışmaları yer almaktadır. PAMAM dendrimerler, karboksilik veya hidroksil yüzey grupları ile modifiye edilerek dendrimerlerin pilokarpin biyoyararlanımını arttırdığı belirtilmiştir (Cheng ve ark., 2008; Gupta ve Perumal, 2014; Baig ve Nayak, 2015).

9) Pulmoner İlaç Taşınmasında Dendrimerler

Pulmoner ilaç taşınmasında dendrimer çalışmaları arasında, enoksaparinin pulmoner emilimini arttırmak için PAMAM dendrimerler kullanarak plazma anti-faktör Xa aktivitesini ölçerek ve gözlemleyerek bir kemirgen modelinde derin ven trombozunu önleme etkinliğine bakılmıştır. G2 ve G3 jenerasyonun pozitif yüklü PAMAM dendrimerlerle arttığı bildirilmiştir. Enoksaparinin bu relatif biyoyararlanımı % 40 artmış iken, negatif yüklü karboksilik gruplar içeren G2.5 PAMAM yarı-jenerasyon dendrimerler etkili olmamıştır. Dolayısıyla, pozitif yüklü dendrimerler, Enoksaparin pulmoner iletimi için daha uygun taşıyıcılar olduğu belirtilmiştir (Bia ve ark., 2007).

Dendritik polimerler, 21. yüzyılda nanoteknolojinin parlayan ve gelişen sistemleridir. Dendrimerlerin kontrollü şekli, boyutu ve farklı işlevleri, DNA, metal nanokristaller ve nanotüpler gibi diğer nano ölçekli yapılar ile uyumlulukları; hibrid yapılar oluşturmaya elverişli olmaları çokça çalışılma sebepleri arasındadır. Bu multifonksiyonel özellikleri dendrimerlere gün geçtikçe ilgiyi artırmaktadır (Noriega-Luna ve ark., 2014; Gupta ve Perumal, 2014).

4.6. Kullanılan Farmasötik Şekiller

4.6.1. Nanopartiküller

4.6.1.1. Tanımı ve genel özellikleri

Genel olarak nanopartiküller, 10-1000 nm arasında değişkenlik gösteren, etken maddeyi enkapsüle ve/veya adsorbe edebilen kolloidal sistemler olarak tanımlanmaktadır. Yapılan son çalışmalar ise 400 nm-1000 nm arasındaki boyutlarda nanopartiküller mikron altı nanopartiküller olarak kabul edilmektedir (Yokoyama, 2018). Nanosistemler ile ilaç etkinliğini artırmak, toksisiteyi azaltmak, stabiliteyi sağlamak ve sonucunda hasta uyuncunu artırmak hedeflenmektedir. Nanopartiküllerinden önemli özelliklerinden biri partikül boyutu ve yüzey yükleridir (Saltzman ve Fung, 1997; Khan ve ark, 2019).

Nanopartiküller, morfolojilerine, boyutlarına ve kimyasal özelliklerine bağlı olarak çeşitli kategorilere ayrılmaktadır. Bunlar;

- Karbon temelli nanopartiküller (Fullerenler, karbon nanotüpler)
- Metal nanopartiküller (Au, Ag, Cu)
- Seramik nanopartiküller
- Semi-konduktor nanopartiküller
- Polimerik nanopartiküller
- Lipid temelli nanobartiküller (Saltzman ve Fung, 1997; Khan ve ark, 2019).

Nanopartiküller, bileşimlerine bağlı olarak nanokapsüller (etken madde hazne içinde rezervuar tipi) veya nanoküreler (etken madde matris içinde homojen dağılmış) olarak adlandırılabilir (Guterres ve ark., 2007; Pawar ve Babu, 2010). Nanopartiküllerin boyut, zeta potansiyeli ve ilaç salım profilleri gibi özellikleri, farklı polimer uzunlukları, yüzey aktif cisimleri ve hazırlama teknikleri kullanılarak kontrol edilebilmektedir. Doğal veya sentetik polimerlerden oluşabilir ve ilaçlar, farmasötik uygulama için nanopartiküller içerisine hapsedilebilir, dağıtılabılır, çözülebilir veya adsorbe edilebilir (Abdel-Mottaleb ve Lamprech, 2016).

4.6.1.2. Nanopartiküllerin hazırlanış yöntemleri

Nanopartiküllerin hazırlanmasında uygun yöntemin seçilmesi, kullanılan ilaç aktif maddesinin ve polimerin fizikokimyasal özelliklerine bağlıdır. Bu özellikler dikkate alınarak seçilmelidir.

4.6.1.2.1. Emülsiyon-solvent buharlaştırma yöntemi

Nanopartiküllerin hazırlanmasında oldukça tercih edilen bir yöntemdir ve iki aşama içermektedir. İlk adım, bir nanopartikül süspansiyonu elde edilen polimer çözeltisinde sulu bir fazın emülsifikasyonundan oluşur. Bu adımda emülsiyon oluşumu, yüksek hızlı homojenizasyon veya ultrasonikasyon kullanılarak hazırlanır. İkinci aşama, polimer çözeltisini oluşturan uçucu organik çözücülerin (diklorometan, kloroform) ortamdan uzaklaşmasını içermektedir. Bu yöntem nanopartiküllerin tek emülsiyon (su içinde yağ) ve çift emülsiyon (su içinde yağ-su) şeklinde hazırlanarak kullanılır ve farmasötik alanda geniş bir uygulamaya sahiptir. Suda çözünmeyen ilaç aktif maddeleri için tek emülsiyon tercih edilirken, peptit ve protein gibi hidrofilik aktif maddeler için çift emülsiyon tercih edilmektedir (Maroof ve ark., 2015; Tyagi ve Pandey, 2016).

4.6.1.2.2. Tuzla çöktürme yöntemi

Bu yöntem kullanılarak, su ile karışabilen çözücü sulu çözeltiden ayrılmaktadır. Başlangıçta polimer ve ilaç aktif maddesi bir çözücü içinde çözündürülür, daha sonra polivinilpirolidon veya hidroksietil selüloz ile magnezyum klorür, kalsiyum klorür gibi elektrolitleri içeren sulu bir jel içinde emülsiyon haline getirilir, daha sonra bu yağ içinde su emülsiyonu, su ile seyreltilir. Böylece çözücü difüzyonu ile nanopartikül oluşumu gerçekleşmektedir. Bu yöntem elektrolit konsantrasyonu, organik fazdaki polimer konsantrasyonu, stabilizatör tipi, karıştırma hızı, faz oranı gibi çeşitli parametrelerden etkilenmektedir. Bu teknik, yüksek verimlilik sağlayan etil selüloz, polilaktik asit ve polimetakrilik asit nanopartiküllerinin hazırlanmasında oldukça tercih edilmektedir. Bu yöntem, ısıya duyarlı ilaç aktif bileşenleri için avantajlıdır, çünkü bu teknikte sıcaklıkta bir artışa gerek yoktur. Yöntemin dezavantajları ise, bu yöntemin lipofilik ilaç aktif maddeleri ve kapsamlı nanopartikül yıkama aşamaları için uygun olmamasıdır (Allemann ve ark., 1993; Kumari, 2018).

4.6.1.2.3. Emülsiyon-difüzyon yöntemi

Nanopartiküllerin hazırlanmasında kullanılan diğer bir yöntem, emülsiyon-difüzyon yöntemidir. Enkapsülleyici polimer; benzil alkol, propilen karbonat gibi kısmen suyla karıştırılabilen bir çözücü içinde çözündürülür ve her iki suya doymuş sıvının başlangıç termodinamik dengesi korunmalıdır. Daha sonra polimer-suya doymuş çözücü fazı, dengeleyiciyi içeren sulu bir çözelti içinde emülsifiye edilir, dış faza çözücü difüzyonu ve yağ/polimer oranına göre nanopartikül oluşumu gerçekleşmektedir. Son olarak; kaynama noktasına göre kullanılan çözücü, buharlaştırma veya filtrasyon yoluyla uzaklaştırılır. Homojenleştirme gerektirmez, yüksek enkapsülasyon verimliliği, yüksek tekrarlanabilirlik ve dar boyut dağılımı bu tekniğin temel avantajlarıdır (Panyam ve ark., 2004; Tyagi ve Pandey, 2016).

4.6.1.2.4. Nanopresipitasyon

Bu yöntem çözücü yer değiştirme yöntemi olarak da bilinmektedir. Çözücü yer değiştirmesi, öncesinde oluşturulmuş bir polimerin bir organik çözeltiden çökeltmesini ve organik çözücünün, yüzey aktif madde varlığında veya yokluğunda sulu ortamda difüzyonunu içermektedir. Aseton veya etanol gibi yarı polar, suyla karışabilen bir çözücüde; polimer, ilaç ve lipofilik yüzey aktif madde çözülür. Bu karışım daha sonra manyetik karıştırıcıdaki sulu çözeltiye dökülür ve hızlı çözücü difüzyonu ile nanopartiküller oluşturulur. Çözücü daha sonra indirgenmiş basınç altında ortamdan uzaklaştırılır. Partikül boyutu, organik fazın sulu faza ilave edilme hızından etkilenir. Artan karıştırma hızının, hem partikül boyutunu hem de ilaç enkapsülasyonunu azalttığı bildirilmiştir. Nanopresipitasyon yöntemi, düşük çözünürlüğe sahip ilaçlar için oldukça uygundur. Yöntemdeki parametreler ayarlanarak, nanopartikül büyüklüğü ve ilaç salımı kontrol edilebilir (Mironov ve ark., 2008; Tyagi ve Pandey, 2016).

4.6.1.2.5. Polimerizasyon yöntemi

Bu yöntemde, monomerlerin polimerizasyonu sulu bir çözelti ortamında gerçekleştirilir ve polimerizasyondan sonra, ilaç aktif maddesi, nanopartiküller yüzeyinde adsorpsiyonla veya polimerizasyon ortamında çözülerek hazırlanmaktadır. Polimerizasyonda kullanılan stabilizatörler ve yüzey aktif maddeleri, ultrasantrifüj kullanılarak nanopartikül süspansiyonundan uzaklaştırılır ve partiküller, izotonik bir ortamda yeniden süspande edilirler. Bu yöntemin polibütil siyanoakrilat veya

polialkil siyanoakrilat nanopartiküllerin hazırlanmasında tercih edildiği belirtilmektedir. Nanopartiküllerin hazırlanması ve büyüklüğü kullanılan sürfaktan ve stabilizatörlerin konsantrasyonundan etkilenmektedir (Puglisi ve ark., 1995; Kumari, 2018).

4.6.1.2.6. Diyaliz yöntemi

Diyaliz yönteminde polimer, organik bir çözücü içerisinde çözündürülür ve uygun bir moleküler ağırlıklı diyaliz tüpüne yerleştirilir. Çözücünün zar içinde yer değiştirmesini takiben, çözünürlüğün kaybına bağlı olarak polimerin kademeli olarak toplanmasıyla nanopartikül süspansiyonları oluşturulur. Küçük ve dar dağılmış nanoparçacıkların sentezi için etkili ve basit bir yöntem olarak kabul edilmektedir (Tyagi ve Pandey, 2016; Kumari, 2018).

4.6.1.2.7. Koaservasyon veya iyonik jelasyon yöntemi

Kitozan, sodyum aljinat ve jelatin gibi biyolojik olarak bozunabilir hidrofilik polimerler kullanılarak nanopartiküllerin hazırlanmasında birçok çalışma yapılmıştır. Hidrofilik kitozan nanopartiküller, Calvo ve ark. tarafından geliştirilen iyonik jelasyon yöntemi ile hazırlanmıştır. Yöntem iki sulu faz içerir. Biri polimer kitosan içeren faz ve diğeri bir polianyonik sodyum tripolifosfat içeren fazdır. Bu yöntemde, nano boyutlu koaservatlar, pozitif yüklü kitozan amino gruplarının negatif yüklü tripolifosfat ile etkileşimi ile oluşturulur. İki sulu faz arasındaki elektrostatik etkileşim, oda sıcaklığında iyonik jelasyon ile gerçekleşmektedir (Tyagi ve Pandey, 2016; Kumari, 2018).

4.6.1.2.8. Süperkritik akışkan teknolojisi (SCF)

Biyolojik olarak bozunabilir mikro ve nanopartiküllerin hazırlanmasında kullanılan güvenli bir yöntemdir. Süperkritik sıvılar genellikle basınç değişikliğine rağmen faz değiştirmeyen sıvılar olarak tanımlanır. Süperkritik CO₂; ılımlı koşulları, toksik olmayan, yoğun gaz teknolojisi ve bu sıvının etkili bir partikül üretim tekniği sağlaması nedeniyle süperkritik sıvı olarak yaygın kullanımı vardır, geleneksel yöntemlerin dezavantajlarının çoğunu ortadan kaldırmaktadır. Süperkritik çözeltinin (RESS) ve süperkritik anti-solvent yönteminin (SAS) hızlı genişlemesi en çok kullanılan yöntemlerdir. RESS yönteminde, aktif madde ve polimer süperkritik çözücü içinde yüksek basınçta çözülürken; SAS yönteminde ilaç molekülleri, organik çözücü içinde çözüldükten sonra süperkritik sıvı (genellikle süperkritik CO₂)

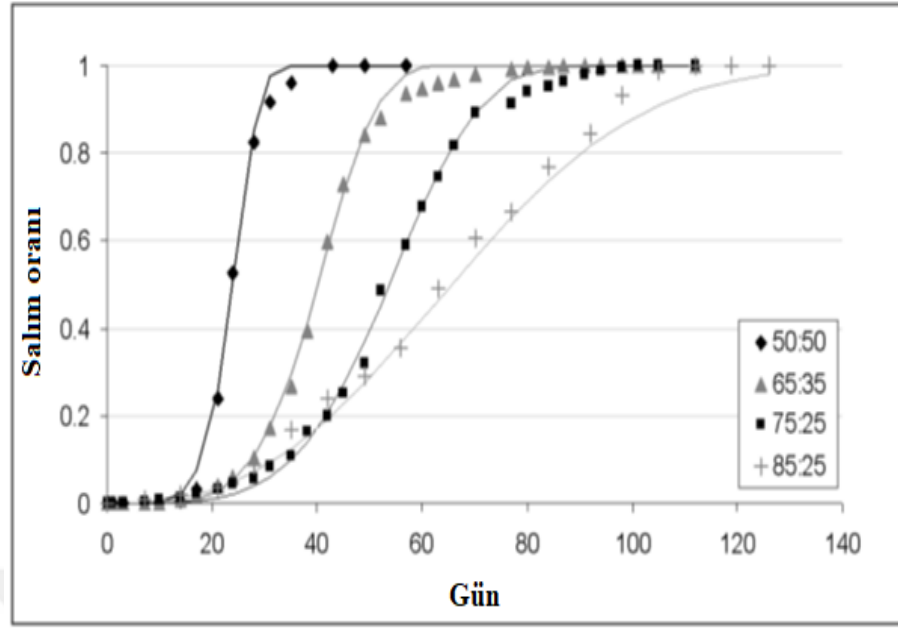
ile temas halinde bırakılmaktadır. Organik faz, süper kritik çözücü içinde hızla çözülür ve süzülebilen nanopartiküller ortama bırakılır (Ingale ve Chaudhari, 2013; Tyagi ve Pandey, 2016).

4.6.1.3. PLGA nanopartiküllerin hazırlanması

Peptid-protein gibi hidrofilik etkin maddelerde genellikle ikili emülsiyon (w/o/w) çözücü buharlaştırma yöntemi kullanılmaktadır. Yöntem; (w/o/w=su/yağ/su) formunda hazırlanıp homojenizasyon ya da ultrasonikasyon destekli kullanılmaktadır (Mohammadi-Samani ve Taghipour, 2015; Jaklenec ve ark., 2008).

4.6.1.4. PLGA nanopartiküllerin farmakokinetik ve biyodağılım profili

İlaç taşıyıcı sistem olan PLGA'nın; etkin madde miktarı, biyodağılım ve istenen terapötik etki için ilgili konsantrasyonun iyi belirlenmesi gerekmektedir. Bu nedenle, taşıyıcı sistemin tasarım esasları ve aktif farmasötik bileşenlerin degradasyonu ve klirens mekanizmaları önemlidir. PLGA'nın biyodağılımı ve farmakokinetiği, lineer olmayan ve doza bağlı bir profil izlemektedir (Nanjwade ve ark., 2009). Önceki çalışmalar hem mononükleer fagosit sisteminin (MPS) hemde kan klirensinin PLGA taşıyıcı sistemlerin dozu ve kompozisyonuna bağlı olabileceğini düşündürmektedir (Mohammadi-Samani ve Taghipour, 2015). Ek olarak tüm vücut otoradyografisi ve nicel dağılım deneyleri, nanopartiküller gibi bazı PLGA formülasyonlarının karaciğerde, kemik iliğinde, lenf düğümlerinde, dalakta ve peritonal makrofajlarda hızla biriktiğini göstermektedir. PLGA ilaç taşıyıcı sistemlerin ilk aşamada salım oranı (yaklaşık %30) yüksektir ve daha sonra yavaşlamaktadır. Bu veriler, PLGA çalışmalarında yüzey modifikasyonunun rolünü araştırmış ve yüzey modifiye edici ajanların dahil edilmesinin kan dolaşımının yarı ömrünü önemli ölçüde artırabileceğini düşündürmektedir (Çırpanlı, 2009). **Şekil 18'**de PLGA içerdiği farklı polimer oranlarına göre salım grafiği verilmiştir.



Şekil 18. 50:50, 65:35, 75:25 ve 85:15 poli laktik-ko-glikolik asit için *in vivo* salım profilleri modellenmiştir. Gösterim 65:35 PLGA, kopolimerin% 65'inin laktik asit ve % 35'inin glikolik asit olduğu anlamına gelmektedir. İlk sıfır salım periyodu ile bifazik salım profili ve ardından hızlı bir ilaç salımı gözlemlenmiştir. Profillerde ayrıca laktik oranındaki azalma ile salım hızında artış gösterilmektedir (Mohammadi-Samani ve Taghipour, 2015).

4.6.1.5. PLGA nanopartiküllerde ilaç salım davranışı

PLGA kopolimeri, omurga ester bağlantılarının oligomerlere ve son olarak monomerlere ayrılması yoluyla hidroliz veya biyolojik bozunma yoluyla parçalanırlar. Bu, farklı polimer oranlarına sahip çeşitli ilaç tipleri ve proteinler için hem *in vivo* hem de *in vitro* olarak gösterilmiştir (Parveen ve Sahoo, 2006; Mohammadi-Samani ve Taghipour, 2015). Bu polimerler için bozunma işlemi esas olarak, matrisin su penetrasyonunun polimer bozunma hızından daha yüksek olduğu matrisin parçalanması şeklindedir. Ayrıca, biyobozunmanın bir sonucu olarak karboksilik uç gruplarının artışı süreci otomatik hale getirmektedir. PLGA kopolimerinin bozulması, toplu difüzyon, yüzey difüzyonu, yığın erozyonu ve yüzey erozyonu toplamıdır (Mohammadi-Samani ve Taghipour, 2015; Naves ve ark., 2017).

PLGA kopolimerlerinin biyodegradasyon oranı, polimer zincirindeki laktik ve glikolik asitlerin molar oranına, polimerin molekül ağırlığına, kristallilik derecesine ve polimerin camsı geçiş sıcaklığına (Tg'sine) bağlıdır. PLGA

biyodegradasyonu sonucu ilaç salımı için bifazik bir eğri olarak aşağıdaki maddelerce belirtilmiştir (Khan ve ark., 2019; Mohammadi-Samani ve Taghipour, 2015; Fredenberg ve ark., 2011):

1. İlaç salımının ilk patlaması ilaç tipi, ilaç konsantrasyonu ve polimer hidrofobikliğiyle ilgilidir. Yüzeydeki ilaç, ortamla temas halinde, çözünürlüğün bir fonksiyonu olarak ve ayrıca suyun polimer matriksine girmesiyle serbest bırakılmaktadır. PLGA'nın polimer molekül ağırlığı önemli ölçüde azalır ancak bu fazda kayda değer bir miktar kaybı ve çözünebilir monomer ürünü oluşmamaktadır.

2. İkinci aşamada, ilaç daha kalın tabakadan erozyona uğrayan tabakaya doğru aşamalı olarak salınır. Matriks içindeki su, polimeri çözünür oligomerik ve monomerik ürünlere hidrolize etmektedir. Bu, tam polimer çözünmesine kadar ilacın difüzyon ve erozyon yoluyla salınması için bir geçiş oluşturmaktadır. İlacın hidrofilik veya hidrofobik özelliği de sulu fazın matrise çekilmesinde önemli bir rol oynamaktadır.

Herhangi bir PLGA biyodegradasyonunda enzimlerin rolü belirsizdir. Literatürün çoğu PLGA biyodegradasyonunun herhangi bir enzim aktivitesi içermediğini ve sadece hidroliz yoluyla olduğunu göstermektedir. Bununla birlikte, bazı araştırmacılar, *in vitro* ve *in vivo* degradasyon oranlarındaki farklılığa bağlı olarak PLGA bozulmasında enzimatik bir rol önermişlerdir. PLGA polimeri laktik ve glikolik asitlere dönüşürler. Laktik asit trikarboksilik asit döngüsüne girer ve metabolize olur ve daha sonra vücuttan karbondioksit ve su olarak elimine edilir. Glikolik asit ise, ya böbrekte değişmeden atılır ya da trikarboksilik asit döngüsüne girer ve sonunda karbondioksit ve su olarak elimine edilir (Mohammadi-Samani ve Taghipour, 2015).

4.6.2. Hidrojeller

4.6.2.1. Tanımı

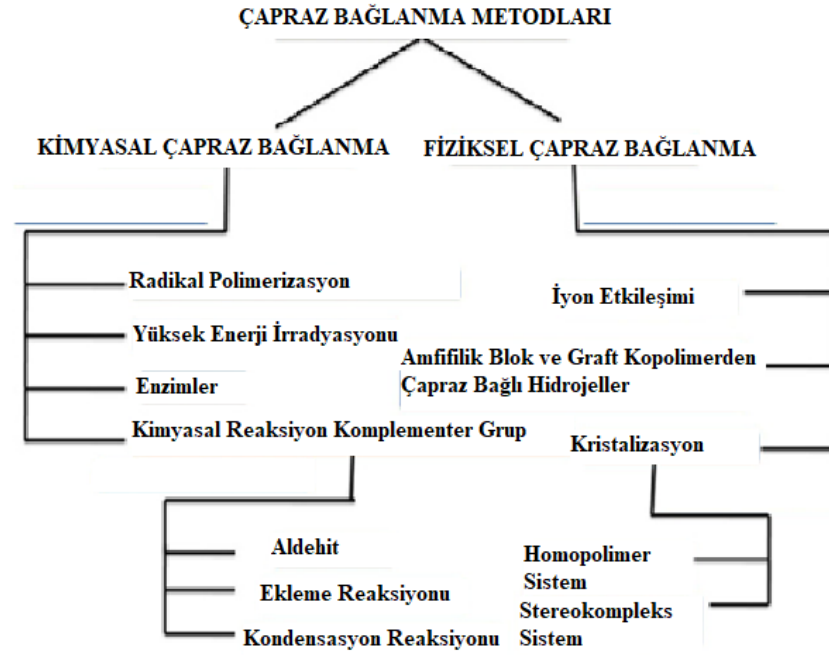
Hidroojeller; kendisi suda çözünmeyen, bir veya daha fazla monomerin reaksiyonu ile üretilen, su ile şişebilen ve çapraz bağlanmış, üç boyutlu polimer zincir ağlarıdır. Çapraz bağlanma, suda çözünürlüğü azaltarak gerekli mekanik mukavemet ve fiziksel bütünlüğü sağlamaktadır (Ahmed, 2015; Paleos, 2012).

4.6.2.2. Hidrojellerin genel özellikleri

İlaç taşıyıcı sistemlerin geliştirilmesinde etken maddenin fizikokimyasal ve farmakokinetik özellikleri oldukça önem taşımaktadır. Buna ek olarak; ilaç taşıyıcı sistemlerden beklenen gerekli etken maddenin, istenilen zamanda vücut bölgesinde, düşük yan etki profili sergilemesidir (Gupta, 2002).

Hidrojeller bu konuda umut verici bir seçenek olarak ortaya çıkmıştır. Hidrojellerin varlığı, Wichterle ve Lim'in ilk olarak kontakt lenslerdeki (2-hidroksietil metakrilat) hidrofilik ağların (PHEMA) kullanımını önerdiği 1960 yılına kadar uzanmaktadır (Wichterle ve Dongwan, 1960). O zamandan beri, hidrojellerin kullanımı çeşitli biyomedikal ve farmasötik uygulamalarda yer almıştır (Martin, 1997). Diğer sentetik biyomateriyallere kıyasla, hidrojeller; kısmen daha yüksek su içeriği yumuşak ve kauçuk kıvamı nedeniyle canlı dokuları fiziksel özelliklerine yakından benzemektedir. Hidrojeller, düşük arayüzey gerilimleri nedeniyle proteinleri vücut sıvılarından adsorbe etme eğilimi gösterirler. Hidrojeller farklı boyutlardaki ilaç moleküllerinin yüklenmesine ve salımına olanak sağlamaktadır. Ayrıca; ağızdan, burundan, yanaktan, makattan, vajinal, oküler ve parenteral uygulama yollarına yönelik ilaç verme sistemleri olarak kullanılabilir (Gupta ve ark., 2002).

Hidrojellerde çapraz bağlanma metodları temel olarak fiziksel ve kimyasal olmak üzere ikiye ayrılmaktadır. **Şekil 19**'da çapraz bağlanma metodları gösterilmiştir.



Şekil 19. Hidrojellerde çapraz bağlama metodları (Ahmed, 2015).

4.6.2.3. Hidrojellerde kullanılan polimerler

Hidrojellerde kullanılan polimerler kaynaklarına göre ikiye ayrılır. Bunlar; doğal polimerler ve sentetik polimerlerdir. **Tablo 5**'de Hidrojellerin hazırlanmasında kullanılan polimerler sınıflandırılmıştır.

Tablo 5. Hidrojelde kullanılan polimerler (Singh ve ark., 2017).

Doğal polimerler	Sentetik polimerler
Kolajen (tip I,II)	Hydroxy ethylmethacryate (HEMA)
Jelatin	Vinyl acetate (VAc)
Fibrin	Acrylic acid (AA)
Hyalunarik asit	N-(2-Hydroxy propyl) methacrylate (HPMA)
Aljinat	N-Vinyl-2-pyrrolidone (NVP)
Kitozan	N-Isopropylacrylamide (NIPAMM)
Agaroz	Polivinil alkol (PVA) Polietilen glikol türevleri (PEG)

4.6.2.4. Hidrojellerin sınıflandırılması

4.6.2.4.1. Polimerik kompozisyona göre hidrojellerin sınıflandırılması

a. Homopolimerik hidrojeller

Homopolimer hidrojeller tek bir monomer türünden üretilmiştir. Homopolimerler, monomer ve polimerizasyon tekniğine bağlı olarak çapraz bağlı iskelet yapısına sahiptir (Ahmed, 2015).

b. Kopolimerik hidrojeller

Kopolimerik hidrojeller iki veya daha fazla farklı monomer türlerinden oluşan ve en az biri hidrofilik bileşen olan yapılardır. Bu polimerlerin biraraya gelmesi rastgele, bloklama veya zincir konfigürasyon değişikliği ile gerçekleşebilmektedir (Ahmed, 2015; Singh ve ark., 2017).

c. Çoklu polimerlerin içiçe girmesiyle oluşan polimerik hidrojeller

İki bağımsız çapraz bağlı sentetik ve/veya doğal polimer bileşeninden oluşan ağ sistemine sahip olan çok sayıdaki polimerin birbiri içerisine girmesiyle oluşan yapılardır. Yarı interpenetran hidrojel, bir bileşen çapraz bağlı bir polimer iken diğer bileşen çapraz bağlanmamış bir polimerden oluşmaktadır. Bu yöntemde, polimer ağ yapılarının kalıcı olarak birbirine kenetlenmesiyle termodinamik uyumsuzluk ortadan kalkabilmektedir. Bu jel tipinde, çapraz bağlanmış bileşenlerin kilitli yapısının, hacim ve yüzey morfolojisinin stabilitesini sağladığı düşünülmektedir (Ahmed, 2015; Singh ve ark., 2017).

4.6.2.4.2. Hidrojellerin konfigürasyon temelli sınıflandırılması

Hidrojellerin fiziksel yapıları ve kimyasal kompozisyonlarına dayalı bir sınıflandırmadır.

- Amorf yapılar
- Yarı-kristalize yapılar
- Kristalize yapılar (Ahmed, 2015; Singh ve ark., 2017).

4.6.2.4.3. Yüklerine göre hidrojellerin sınıflandırması

Hidrojellerin çapraz bağlı zincirlerindeki kimyasal grupların yüküne bağlı olarak sınıflandırılmaktadır. Başlıca bu gruplar nötral hidrojeller, anyonik hidrojeller, katyonik hidrojeller ve amfoterik hidrojellerdir (Gupta ve ark., 2002; Ahmed, 2015; Singh ve ark., 2017).

4.6.2.5. Hidrojellerin farmasötik kullanım özellikleri

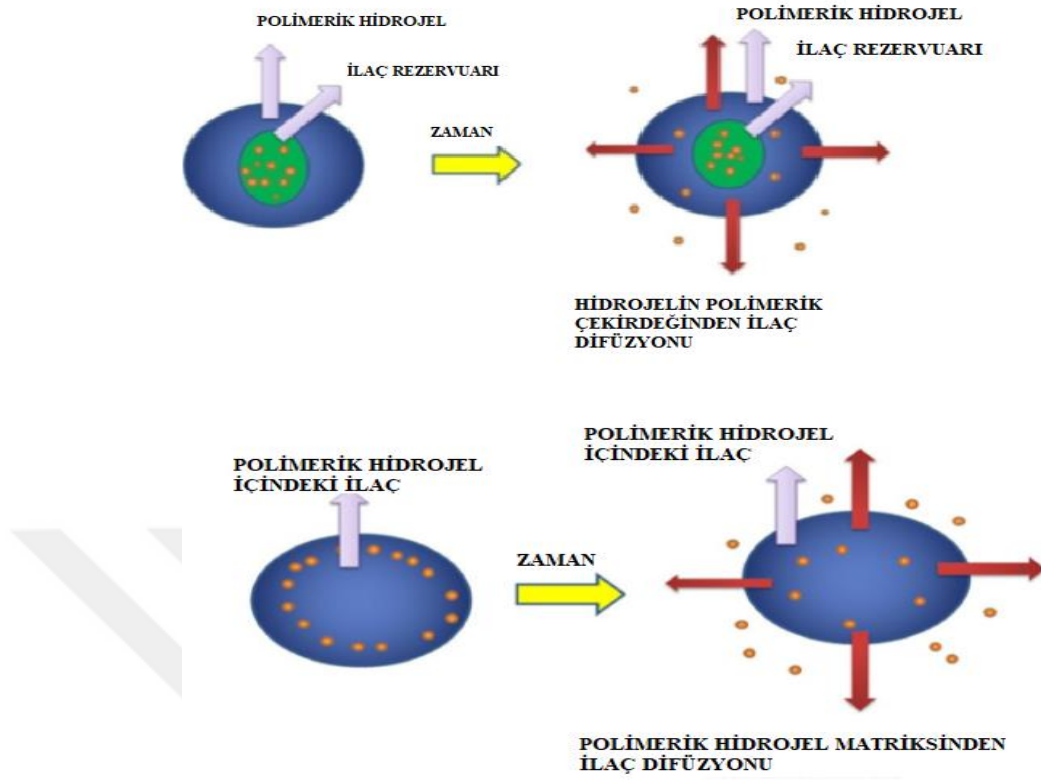
Yüksek oranda su içerebildikleri için doğal dokuya çok benzer bir esnekliğe sahiptirler. İlaçların veya besin maddeleri için kontrollü salım sağlamaktadır. Biyolojik olarak uyumlu, biyolojik olarak parçalanabilir ve enjekte edilebilirler. Hidrojeller pH, sıcaklık veya metabolit konsantrasyonundaki değişiklikler gibi uyarılara cevap verebilmektedir. Bu tür değişimleri algılama sonucu olarak içindeki molekülleri serbest bırakma yeteneğine sahiptir. Hidrojeller birçok modifikasyona açık yapılar olduğu için ilaç taşıyıcı sistemler olarak uygun özelliklere sahiptirler (Hoffman, 2002; Ahmed, 2015).

Diğer bir yandan, yüksek maliyetli olmaları, düşük mekanik özelliğe sahip olmaları olumsuz özellikleri arasında yer almaktadır. Adherent yapıda olmadıkları için sekonder bir kaplama gerekebilmektedir. Enjektabil hidrojel formları için tromboz oluşum riski bulunmaktadır. Sterilizasyon ve ilaç yükleme zorluğuna sahiptir (Hoffman, 2002; Ahmed, 2015).

4.6.2.6. Hidrojellerin ilaç salım mekanizmaları

4.6.2.6.1. Difüzyon kontrollü salım sistemleri

Difüzyon kontrollü salım sistemi, en yaygın salım modellerinden biridir. Bu sistemde bir rezervuar ve bir matriks kısım mevcuttur. Rezervuar sisteminde, ilaç polimerik bir zar ile çevrelenmiş bir çekirdek içinde kalır. Bu sistemden polimerik membran yoluyla ilaç salımı, Fick'in birinci difüzyon kanuna göre gerçekleşmektedir. İlaç salımında hız sınırlayıcı basamak polimerik membrandır (Mishra ve ark., 2017). **Şekil 20**'de ilaç salım mekanizmaları şematik olarak gösterilmiştir.



Şekil 20. Hidrojellerden ilaç salım mekanizması (Mishra ve ark., 2017).

Matriks sistemi, hidrojenin genel yapısında ilacın homojen dağılımını içermektedir. Rezervuar tipi ile ilgili olarak; matriks sistemi, rezervuar sistemindeki çekirdekten ziyade polimerik hidrojel içindeki makromoleküler gözenekler yoluyla ilacı serbest bırakırlar (Mishra ve ark., 2017).

4.6.2.6.2. Şişme kontrollü salım mekanizması

Şişme kontrollü mekanizmalarda ilacın difüzyonu hidrojinin genişlemesinden daha hızlıdır. Burada ilacın hidrojelden salınması, cihazın gerilmiş hacmine önemli ölçüde bağlıdır (Mishra ve ark., 2017).

4.6.2.6.3. Kimyasal kontrollü salım mekanizması

Bu salım mekanizmasında kimyasal reaksiyonlar rol almaktadır. İlacın sistemden salınması; polimerik zincir bölünmesi ile hidrolitik reaksiyonlar, enzimatik bozunma tepkimesi veya polimerik ağ ve salım ilacı arasında gerçekleşen tersinir veya geri dönüşümsüz reaksiyonlar ile ilgilidir (Mishra ve ark., 2017).

4.6.2.6. Hidrojellerin farmasötik uygulamaları

Tablo 6. Hidrojellerin farmasötik uygulamaları (Mishra ve ark., 2017).

Hidrojel yapımında kullanılan polimerler	Sistem içinde taşınan etken madde	Farmasötik uygulama alanı	Referans
Kitozan ve aljinat karışımı	Bevacizumab	Oküler ilaç taşınması	Cross ve Dexter, 1991.
Poliakrilik asit ve jelatin	Vankomisin hidroklorür Gentamisin sülfat	Antibiyotikler için lokal ilaç taşınması	Lee ve ark., 2011.
P(MAA-g-EG) ve P(MAA-co-NVP)	Anti TNF- α	Transmukozal taşınma	Balasubramanian ve ark., 2010.
PEG graftlı kitozan	Siklosporin A	Subkutanöz taşınma	Nöth ve ark., 2010.
Fitalil kitozan üzerine kopolimer PEG	Siprofloksasin	Pulmoner ilaç taşınma	Cabrera Pino ve ark., 2011.
Kuarternize kitozan ve PEG	İnsülin	Nasal ilaç taşınma	Moura ve ark., 2011.

5. GEREÇ VE YÖNTEM

5.1. Araç ve Gereçler

5.1.1. Kullanılan kimyasal maddeler ve sarf malzemeleri

Amfoterisin B	Biological Industries (USA)
Amonyum persülfat	Amresco (ABD)
Bovine serum albumine (BSA)	BioShop (Kanada)
BrdU	Merck (Almanya)
BrdU	Biovision (USA)
Dendrimer G5	Sigma (ABD)
Dimetil sülfoksit	Sigma (ABD)
Disodyum hidrojen fosfat	Merck (Almanya)
DMEM	PAN Biotech (Almanya)
Diklorometan	Merck (Almanya)
Elisa kit	Enzo Life Sciences (USA)
Etanol (absolü)	Riedel de Haen (Almanya)
Featal bovin serum	Sigma (ABD)
Rekombinant insan transforme edici büyüme faktörü beta-1 (rhTGF- β 1) Peprotech (ABD)	
Glasiyal asetik asit	E. Merck (Almanya)
Glisin	Sigma (ABD)
HEPES	Sigma (ABD)
Hidroklorik asit	Merck (Almanya)
İnterlökin-2 (IL-2)	Gibco (ABD)
İnterlökin-4 (IL-4)	Sino Biological (Çin)
Kitozan (medium moleküler ağırlık)	Sigma (ABD)
L-Glutamin	Gibco (ABD)
MTT	Sigma (ABD)
Polivinil alkol	Polysciences Inc (ABD)
Polivinil alkol	Sigma (ABD)
Polilaktik-koglikolik asit (LA/GA ratio 50:50) RG503H Boehringer Ingelheim (Almanya)	
Penisilin-Streptomisin	Gibco (ABD)

Potasyum dihidrojen fosfat	Sigma (ABD)
Protein yükleme boyası (2x)	Novex (ABD)
Poliakrilamid jel elektroforez protein belirteci	Invitrogen (ABD)
Poliakrilamid	Fluka (Almanya)
RPMI 1640	Gibco (ABD)
Sodyum dodosil sülfat	Fisher Scientific (İngiltere)
Sodyum klorür	Merck (Almanya)
Sodyum hidroksit	Merck (Almanya)
Sitrik asit	Sigma (ABD)
Tripsin- EDTA	Gibco (ABD)
TEMED	Sigma (ABD)
Trizma-base	Sigma (ABD)
Tris-HCl	Sigma (ABD)
2-β-Merkaptoetanol	Fluka (Almanya)

5.1.2. Kullanılan cihazlar

Çalkalayıcı Su banyosu	Nüve ST 30 (Türkiye)
Derin Dondurucu (-20 °C)	Arçelik (Türkiye)
Derin Dondurucu (-80 °C)	Nuar (ABD)
Dikey Jel Elektroforez Cihazı	Bio-Rad (ABD)
Distile Su Cihazı	GFL (Almanya)
El Homojenizatörü	Ika (Almanya)
Elektroforez Güç Kaynağı	EC-Techne (İngiltere)
ELİSA Okuyucu	Bio-Rad (ABD)
Etüv	Heraeus (Almanya)
Etüv	Memmert (Almanya)
Fluoresan Mikroskop	Olympus BX50 (Japonya)
Dijital fotoğraf makinesi	Olympus (Japonya)
Hassas Terazî	Shimadzu (Japonya)
Horizontal Karıştırıcı	Velp Scientifica (İtalya)
Isıtıcı Tabla	Ika-Werk (Almanya)
İnvert Mikroskop	Olympus BH40 (Japonya)
Jel Analiz Sistemi	Kodak 1D Dijital Science (ABD)
JVC Spot Junior Kamera Sistemi	JVC (Japonya)
Karbondioksitli Etüv	Sanyo (Japonya)
Laminar Akışlı Doku Kültürü Kabini	Holten-Safe 2000 (Danimarka)
Liyofilizatör Leybold,	Lyovac GT2 (Almanya)
Manyetik Karıştırıcı	Ika-Werk (Almanya)
Mikropipet seti	Gilson (Fransa)
Mikrosantrifüj	Hettich (Almanya)
Bioküler Mikroskop	Olympus (Japonya)
Mili-Q Su Sistemi	Milipore (ABD)
Otoklav	Kermanlar (Türkiye)
Partikül Ölçüm Cihazı	Malvern Nanosizer (İngiltere)
pH metre	Mettler Toledo (ABD)
Rota Evaporatör	Heildorf (ABD)
Santrifüj	Hettich (Almanya)

Soğutmalı Santrifüj

Sonik Banyo

Spektrofotometre

Taramalı Elektron Mikroskobu

Terazi

U.V. Transillüminatör

Vertikal Karıştırıcı

Diferansiyel Taramalı Kalorimetre

Fourier Dönüşümlü Kızılötesi

Spektroskopisi

Eppendorf 5810R (Germany)

Sanyo (Japonya)

Shimadzu BioSpec-1601 (Japonya)

Carl ZEISS/EVO 40 (Almanya)

Sartorius (Almanya)

Vilber Lourmat (Fransa)

Velp Scientifica (İtalya)

Setaram DSC 131(Fransa)

Thermo Nicolet İS10 (ABD)



5.1.3. Kullanılan hücre hatları

NIH-3T3 fare embriyonal fibroblast hücre hattı (ATCC CRL-1658)

HaCaT insan primer epidermal keratinosit hücre hattı (ATCC PCS-200-011)

HT-2 fare İnterlökin-2 bağımlı T lenfosit hücre hattı (ATCC CRL-1841)

Tez kapsamında hazırlanan tüm formülasyonlar, in vitro etkinliği ve toksisitesi açısından yukarıda belirtilen hücre hatlarında değerlendirilmiştir.

5.1.4. Besiyeri ve çözeltiler

Tez kapsamında kullanılan besiyeri ve tampon çözeltilerin isimleri, hazırlanması ve sterilizasyonu aşağıda belirtilmiştir.

5.1.4.1. Besiyerleri

Dulbecco's Modified Eagle's Medium DMEM

500 ml DMEM (PAN) besiyerine 2,5 ml L-Glutamin, 5 ml penisilin-streptomisin, amfoterisin 2,5 ml ve %10 fetal bovine serum eklenerek tamamlanmış besiyeri hazırlandı ve in vitro çalışmalarda bu besiyeri kullanıldı.

Roswell Park Memorial Institute RPMI 1640

500 ml RPMI besiyerine 2,5 mM L-Glutamin, 5 ml penisilin-streptomisin, amfoterisin 2,5 ml, 100-200 IU/ ml İnterlökin-2 (IL-2), 0,05 mM, 2-Merkaptoetanol ve %10 fetal bovine serum eklenerek tamamlanmış besiyeri hazırlandı ve in vitro çalışmalarda bu besiyeri kullanıldı.

5.1.4.2. Çözeltiler

PBS Tamponu (Fosfat-Sodyum Klorür, BP, pH 7.4)

2,38 g Na_2HPO_4 , 0,190 g KH_2PO_4 ve 8 g NaCl tartılarak 800 mL bidistile suda çözündürüldü daha sonra hacim 1000 mL'ye tamamlandı. Hazırlanan çözeltinin pH değeri ölçüldü, asidik ise Na_2HPO_4 ; bazik ise KH_2PO_4 eklenerek pH 7,4'e ayarlandı. PBS tamponu, 121 °C, 1.2 atmosfer basınç altında 20 dakika otoklavda tutularak sterilizasyon sonrası +4 °C' da muhafaza edildi.

Tripsin-EDTA Çözeltisi

% 0.05 (a/h) Tripsin

% 0.05 (a/h) EDTA

Tripsin-EDTA çözeltisi, 0.22µm por çapına sahip filtre kullanılarak sterilizasyon sonrası -20 °C' de muhafaza edildi.

Sitrik asit Çözeltisi

10 mM sitrik asit çözeltisi hazırlanır ve 1 N HCl ile pH 3'e ayarlanır. Hazırlanan çözelti 0.22 µm por çapına sahip filtreden geçirildi ve +4 °C' de muhafaza edildi.

1N HCl Çözeltisi

%37'lik stok HCl çözeltisinden 4,1 ml alınıp steril bidistile su ile 50 ml'ye tamamlandı.

10 N NaOH Çözeltisi

20,41 g NaOH tartılıp, steril bidistile su ile çözülerek 50 ml'ye tamamlandı.

1,2 N NaOH; 0,5M HEPES Çözeltisi

30 ml steril bidistile suya yavaşça 6 ml 10 N NaOH çözeltisi eklenip karıştırıldı. Daha sonra 5,95 g HEPES ilave edildi. İyice karıştırıldıktan sonra steril bidistile su ile hacim 50 ml'ye tamamlandı.

Akrilamid ve N,N'-Metilen Bisakrilamid (%30)

%29 (w/v) akrilamid

%1(w/v) bisakrilamid

Akrilamid-N,N'-Metilen Bisakrilamid çözeltisi pH değeri 7'ye ayarlanır. Oda sıcaklığında gün ışığından korunarak saklanır.

Sodyum Dodesil Sülfat (SDS) (%10)

10 g SDS

Çözelti oda sıcaklığında saklanır.

Tris Tamponu

1,5 M Tris-HCL pH 8,8

Konsantre HCL ile pH 8,8 'e ayarlanır, oda sıcaklığında saklanır.

Tris-HCL Tamponu

1 M Tris-HCL pH 6,8

Konsantre HCL ile pH 6,8 'e ayarlanır, oda sıcaklığında saklanır.

Amonyum Persülfat (%10)

10 g Amonyum Persülfat

Taze olarak hazırlanmalıdır.

Resolving Jel Çözeltisi (Ayırma Jeli)

%30 akrilamid

1,5 M Tris-HCL (pH 8,8)

%10 SDS

%10 APS

TEMED

H₂O

Stacking Jel Çözeltisi (Yükleme Jeli)

%30 akrilamid

1 M Tris-HCL (pH 6,8)

%10 SDS

%10 APS

TEMED

H₂O

Tris-Glisin Elektroforez Tamponu (pH 8,3)

25 mM Tris

250 mM glisin (pH 8,3)

%0,1 SDS

+4°C’ de saklanır. Kullanılacağı zaman oda sıcaklığına getirilip 5 kez sulandırılır.

5.2. Yöntem

5.2.1. Rekombinant insan TGF- β 1 proteinin rekonstitüsü

Rekombinant insan TGF- β 1 proteini (rhTGF- β 1) (Katalog no. 100-21; Peprotech, USA), tez kapsamında hazırlanan formülasyonlar için satın alınmıştır. Liyofilize TGF- β 1 üretici firmanın protokolüne göre hazırlandı ve uzun süreli saklama için -80 °C'de saklanmıştır. Özetle, liyofilize TGF- β 1 vialı açılmadan önce santrifüjlendi. % 0.1 a/h sıgır serum albümini (BSA; Katalog no. 0332; Amresco, Inc. Solon, OH) içeren 1000 uL steril 10 mM sitrik asit pH 3,0 olacak şekilde aktive edilmiştir. Bu 100 μ g / ml çözelti, her biri 5 μ g içeren 50 μ l'lik yirmi ependorfa bölünmüştür ve -80 °C'ye depolanmıştır. TGF- β 1 kullanılmadan önce, ependorf buz içinde çözündürülerek gerekli hacim, fosfat tamponu (PBS; pH 7,4) kullanılarak hazırlanmıştır.

5.2.2. Rekonstitüe edilen TGF- β 1 proteinin kontrolleri

5.2.2.1. Sodyum dodesil sülfat (SDS)-poliakrilamid jel elektroforezi

Transforme edici büyüme faktörü (TGF- β 1) 25 kDa moleküler ağırlığına sahiptir, alikotlanması sırasında bovine serum albumin (BSA 66 kDa) stabilizan olarak eklenmiş ve stoklanmıştır. rhTGF- β 1 proteini formülasyonlara eklenmeden önce rekonstitüe protein molekül ağırlığı ve stabilite açısından standart protein marker ile %12'lik Akrilamid-N,N-metilen bisakrilamid SDS-PAGE yöntemi ile değerlendirilmiştir. rhTGF- β 1 proteini 2 μ g olmak üzere içerisindeki BSA varlığını da göstermek için 1, 2 ve 5 μ g BSA 2x yükleme boyası ile jel kuyularına yüklenmiştir. 120 volt 50 mA 90 dakika boyunca jelde yürütülmüştür. Daha sonra bir gece jel boyasında bekletilmiştir. Ertesi gün asetik asit-su karışımından oluşan çözelti ile 2 saatte bir taze çözelti koyularak jel boyadan arındırılincaya kadar çalkalamaya bırakılmıştır. Boyadan arındırıldıktan sonra jel görüntülemesi gerçekleştirilmiştir.

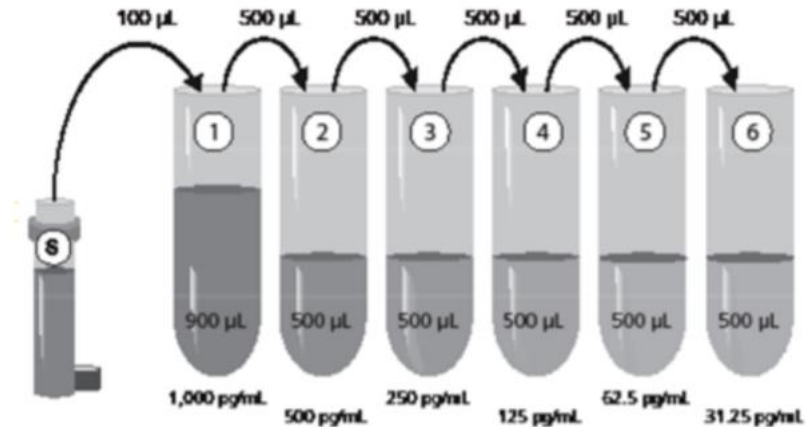
5.2.2.2. TGF- β 1 biyoaktivite kontrolü

TGF- β 1 biyoaktivitesi, IL-4 bağımlı HT-2 hücre hattı inhibisyon deneyi kullanılarak değerlendirilmiştir. HT-2 hücreleri (CRL-1841, ATCC, Manassas, VA) RPMI 1640 besiyeri ile 2×10^5 hücre/ml olacak şekilde süspande edilmiştir. 96 kuyucuklu plakada, her kuyuya 50 μ l besiyeri ilave edildikten sonra % 0,1 BSA içeren 25 μ l TGF- β 1 standardı; 50-0,0005 ng/ml aralığında seyreltilerek eklenmiştir. Son olarak, her bir kuyuya IL-4 (15 ng/ml) içerek şekilde 50 ml HT-2 hücre

süspansiyonu ilave edildi ve plaka % 5 CO₂ 37 °C'de 72 saat inkübe edilmiştir. 72 saat sonra inkübatörden çıkarılan plakaya kuyu başına 20 µl CellTiter-Blue reajanı eklenmiştir. Daha sonra 4 saat boyunca % 5 CO₂ 37 °C'de bekletildi ve sonrasında 560/590 nm dalda boylarında spektrofotometrik olarak okunmuştur (Jaklenec ve ark., 2008). TGF-β1 eklenmemiş IL-4 ekli kuyular pozitif kontrol, sadece hücre ve besiyeri içeren kuyular ise kontrol grubu olarak değerlendirilmiştir. Hücre canlılığı belirtildiği gibi CellTiter-Blue canlılık testindeki protokole göre yapılmıştır (Promega, Madison, WI).

5.2.3. rhTGF-β1 ait standart eğrinin hazırlanması

TGF-β1'in ELISA (Enzyme Linked Immunosorbent Assay) yöntemine ait standart eğrisinin hazırlanması için, kitin içinde yer alan TGF-β1 standardı kullanılmıştır. Protokole göre dilüsyon yöntemi ile hazırlanan standartlarda dilüsyon tamponu olarak kit içinde yer alan Assay Buffer 13 kullanılmıştır. Başlangıçta kit içinde bulunan standardın konsantrasyonu 10000 pg/ml'dir. Toplam hacim 0,25 ml'dir. 2500 pg/250 µl içeren tüpten 100 µl alınıp 1000 µl'ye Assay Buffer 13 ile tamamlanmıştır. Böylece 1000 pg/µl konsantrasyonunda birinci standart oluşturulmuştur. Diğer standartlar Assay buffer 13 kullanılarak seri dilüsyonla hazırlanmıştır. Seyreltilmemiş TGF-β1 stok çözelti en yüksek konsantrasyonlu standart iken (1000 pg/ml), 6 nolu standart en düşük konsantrasyonlu (31,25 pg/ml) standardı oluşturmaktadır (Şekil 21). Hazırlanan standart çözeltiler ELISA yöntemi ile miktar tayini 450 nm dalga boyunda ELISA okuyucu ile okunarak TGF-β1'e ait standart eğri oluşturulmuştur.



Şekil 21. Dilüsyon yöntemi ile TGF-β1'e ait standart eğrinin hazırlanması.

5.2.4. TGF- β 1 içeren *in vitro* salım ve enkapsülasyon örneklerinin aktivasyonu

Formülasyonlardan elde edilen *in vitro* salım örneklerindeki TGF- β 1 protein miktarları ELISA yöntemi ile hesaplanmıştır. ELISA yapılmadan önce ilgili protokole göre toplanan süpernatantların protein aktivasyonuna gereksinim duyulmuştur. *In vitro* salım örneklerinden alınan 100 μ l süpernatanta 20 μ l 1N HCl eklenmiş ve pipetaj yardımı ile iyice karıştırıldıktan sonra 10 dakika oda sıcaklığında inkübe edilmiştir. Daha sonra nötralizasyon amacı ile 20 μ l 1,2 N NaOH / 0,5 M HEPES karışımı eklenip pipetaj ile karıştırılmıştır. ELISA protokolünde belirtildiği gibi örnek dilüsyonu 1:1,4 haline getirilmiştir fakat deney prosedürü için 1:2 dilüsyonuna ihtiyaç duyulmaktadır. Bunun için 140 μ l olan örnek hacmine 140 μ l Assay buffer 13 eklenerek final dilüsyon oranı 1:2,8 yapılmıştır. Kit prosedüründe belirtilen bu dilüsyon oranıyla ELISA sırasında matriksden araya girebilecek safsızlıkların elimine edildiği belirtilmiştir (TGF- β 1 ELISA kit Enzo, Katalog no: ADI-900-155).

5.2.5. rhTGF- β 1 içeren farmasötik dozaj formlarının hazırlanması ve karakterizasyonu

5.2.5.1. PLGA nanopartiküllerin hazırlanması

PLGA (PLGA; 50:50 laktik:glikolid; viskosite 0,32-0,44 dL/g; moleküler ağırlığı: 24,000-38,000 Da) nanopartikülleri ikili emülsiyon çözücü buharlaştırma metodu (su/yağ/su) ile hazırlanmıştır. %1-5 PLGA, 2 ml diklorometan (DCM) içerisinde çözündürülmüştür. Bu karışım içerisine 100 μ l olacak şekilde PBS ile tamamlanan % 0,1 BSA içeren 1 μ g/10 μ l TGF- β 1 ilave edilerek ve bir dakika boyunca homojenize edilmiştir (s/y). Bu karışım %1'lik 50 ml PVA çözeltisi içerisine dökülüp tekrar 1 dakika homojenize edilerek ikili emülsiyon oluşturulmuştur (s/ y/ s). Dispers sistemden, fazla miktardaki DCM'yi uzaklaştırmak için 4 saat boyunca manyetik karıştırıcıda karıştırılmıştır. Nanopartiküller (NP), 12,000 rpm'de 20 dakika süreyle +4° C'de santrifüjlenmiştir. Süpernatantlar enkapsülasyon etkinliğini hesaplamak için ayrıldı ve -20° C'ye kaldırılmıştır. Daha sonra NP'ler üç kez steril bidistile su ile yıkandı ve 48 saat liyofilize edilmiştir. (Lyovac GT 2E, Steris, Almanya). Protein içermeyen nanopartiküller aynı proses ile hazırlanmış olup, içerisine protein yerine 100 μ l PBS eklenmiştir. Hazırlanan

nanopartikül formülasyonları **Tablo 7** de verilmiştir (Jaklenec ve ark., 2008; Makadia ve Siegel, 2011).

Tablo 7. PLGA nanopartiküllerin formülasyonları (n=3).

Formülasyon kodu	PLGA %	PVA %	TGF-β1 konsantrasyonu
A	%1	%1	-
B	%1	%1	0,1µg/µl
C	%2	%1	-
D	%2	%1	0,1µg/µl
E	%3	%1	-
F	%3	%1	0,1µg/µl
G	%4	%1	-
H	%4	%1	0,1µg/µl
I	%5	%1	-
J	%5	%1	0,1µg/µl

5.2.5.2. Hazırlanan PLGA nanopartiküllerin karakterizasyonu

5.2.5.2.1. PLGA nanopartiküllerin boyut, zeta potansiyal ve polidispers indeksi

Nanopartiküllerin zeta potansiyeli, boyutu ve polidispersite indeks (PDI) ölçümleri, Zetasizer nano zs (Malvern Instruments, İngiltere) kullanılarak deiyonize su içerisinde 25 ° C'de yapılmıştır. Tüm ölçümler üç kez tekrarlanmıştır (Lim ve ark., 2013; Huang ve Zhang, 2018).

5.2.5.2.2. TGF-β1 içeren PLGA nanopartiküllerin verimi

TGF-β1 içeren PLGA nanopartiküllerin yüzde verimi aşağıda belirtilen denklem kullanılarak hesaplanmıştır. Nanopartiküller n=3 olarak ortalama verim ve standart sapma belirlenmiştir (De Moraes Profirio ve Benedito Teixeira Pessine, 2018).

$$\text{Nanopartikül verimi \%} = 100 \times \frac{\text{Elde edilen nanopartikül miktarı}}{\text{Eklenen tüm polimer ve protein miktarı}}$$

5.2.5.2.3. PLGA nanopartiküllerin enkapsülasyon etkinliği

Enkapsülasyon etkinliği, nanopartiküllerin santrifüjlenme sırasında elde edilen süpernatanttaki enkapsüle olmayan protein miktarının TGF-β1 ELISA (Enzyme-linked Immunoassay) yöntemi ile (Enzo Life Sciences) üç paralelli şekilde

hesaplanmıştır. Nanopartiküllerin çöktürme işlemi sırasında elde edilen süpernatantlar bir ependorf tüpe alınıp -20° C’de saklanmıştır. Daha sonra ELISA yöntemi ile enkapsülasyon etkinliği hesaplanmıştır (Jaklenec ve ark., 2008; De Moraes Profirio ve Benedito Teixeira Pessine, 2018).

$$\text{Enkapsülasyon etkinliği} = 100 \times \frac{\text{Nanopartikül içindeki TGF-}\beta 1 \text{ miktarı}}{\text{Eklenen TGF-}\beta 1 \text{ miktarı}}$$

5.2.5.2.4. PLGA nanopartiküllerin taramalı elektron mikroskop analizi

Nanopartiküllerin yüzey morfolojisi taramalı elektron mikroskop analizi ile gözlemlenmiştir (SEM) (Carl ZEISS/ EVO 40 / Almanya). Bir miktar nanopartikül metalik bir yüzeye yerleştirildi, daha sonra altın paladyum bir tabaka ile vakum altında kaplanmıştır. 10 kV’de ölçümler yapılmıştır (Hu ve ark., 2019).

5.2.5.2.5. PLGA nanopartiküllerin fourier dönüşümlü kızılötesi spektroskopisi (FT-IR)

Kullanılan polimerlerin ve etkin maddenin yapısında yer alan grupların belirlenmesi için kızılötesi spektrumu çekilmiştir. Hazırlanan formülasyonlar öncelikle liyofilize edilmiştir. Daha sonra PLGA polimerinin, protein içeren ve içermeyen PLGA nanopartiküllerinin ve TGF-β1 proteinin FT-IR (Thermo Nicolet İS10, ABD) spektrumu yapılmıştır. IR spektrumundaki çeşitli pikler, yapılarında bulunan farklı grupların varlığı açısından yorumlanmıştır (Sun ve ark., 2015).

5.2.5.2.6. PLGA nanopartiküllerin diferansiyel taramalı kolorimetrik (DSC) analizi

Nanopartiküllerin içindeki rhTGF-β1’in fiziksel durumunu karakterize etmek ve geçimliliklerini göstermek için diferansiyel taramalı kalorimetri (Setaram 131; Setaram Enstrümantasyonu) analizi yapılmıştır. Yaklaşık 6 mg numune tartılarak alüminyum bir kaba alındı ve 5 °C /dk ’lık bir ısıtma hızında 25 ile 100 °C tarama sıcaklığında analiz edilmiştir (Sun ve ark., 2015).

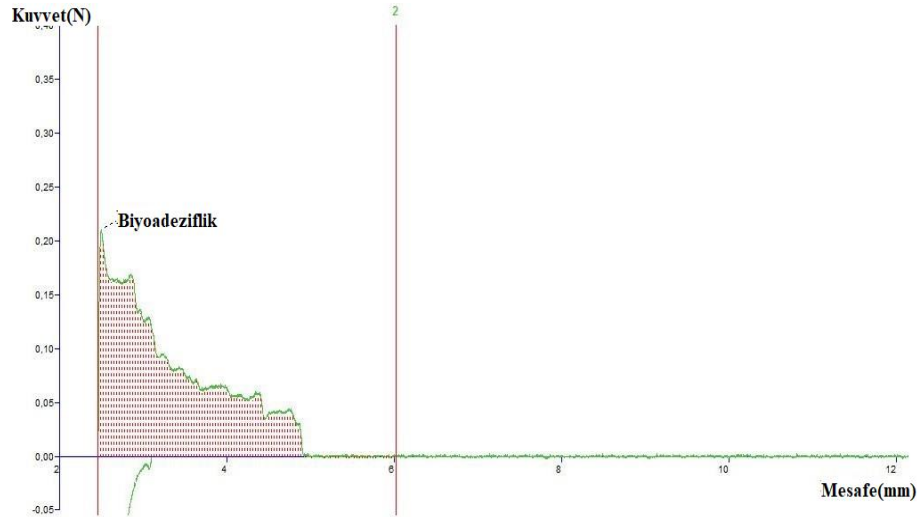
5.2.5.2.7. PLGA nanopartiküllerin *in vitro* salım çalışmaları

TGF-β1 salımı için 10 ng rhTGF-β1 içeren PLGA nanopartiküller tartıldı ve 1 ml PBS (pH: 7.4) tamponunda 37 °C’lik su banyosunda 30 gün boyunca numuneler toplanmıştır. Örneklem zamanlarında, numuneler 15 dakika boyunca 14000 rpm’de santrifüjlenmiş, süpernatantlar alınıp -20 °C’de depolanmıştır ve taze PBS eklenerek bir sonraki örnek alım zamanına kadar inkübasyona devam edilmiştir. Nanopartiküllerden salınan rhTGF-β1 miktarları ELISA kit (Enzo Life Sciences,

ABD) kullanılarak belirlenmiştir. Tüm numuneler üç paralelli yapılmıştır ve standart sapmalar hesaplanmıştır (Vaidya, 2012).

5.2.5.2.8. Nanopartiküllerinin *in vitro* biyoadezyon çalışmaları

Nanopartiküllerin biyoadezyonu, Kockisch ve Sezer'in çalışmalarında belirttiği yöntem modifiye edilerek belirlenmiştir (Kockisch ve ark., 2003; Sezer ve ark., 2008). Ölçümler, p10 perspeks probu (R: 10 mm, temas alanı: 0.785 cm², 5 kg'lık yük ayarı) ile TA-XT Plus Doku Analiz Cihazı (Stable Micro Systems, İngiltere) kullanılarak belirlenmiştir. Taze tavuk sırt derisi yağ ve zarından temizlenerek doku modeli olarak kullanılmıştır. Kesilen tavuk derileri testten önce 37 °C'de inkübe edilmiştir. Her ölçüm taze tavuk derileri ile yapılmıştır. 5 mg nanopartikül tartıldı ve çift taraflı yapışkan bant ile probun alt yüzeyine tutturulmuştur. Proben nanopartikül kaplı alt yüzeyi, 1 mm / s sabit hız ve 1.0 N sabit kuvvetle doku yüzeyine uygulanmıştır. İki dakikalık temas süresinden sonra, prob aynı sabit hızda dikey yönde çekilmiştir. Veriler, Texture Exponent 4.0.4.0 yazılımı kullanılarak hesaplanmıştır. Eğrinin (AUC) altındaki alan biyoadezyon işini vermektedir, birimi mJ (N x mm) dür ve 1 cm²'ye düşen biyoadezyon işini hesaplamak için aşağıdaki formül kullanılmıştır. Her ölçüm üç kez tekrarlanmıştır.



Şekil 22. Nanopartiküllerde biyoadezyon tayinine ait grafik.

$$\text{Adezyon işi (mJ. cm}^2\text{)} = \text{AUC} / (\pi r^2)$$

πr^2 : Jelin temas ettiği mukozal yüzey

AUC: Biyoadezyon grafiği altında kalan alan



Resim 1. Texture cihazı ile PLGA nanopartiküllerin biyoadezyon ölçümü.

5.2.6. PVA/Kitozan hidrojenlerin hazırlanması ve karakterizasyonu

5.2.6.1. PVA/Kitozan hidrojenlerin hazırlanması

Farklı PVA konsantrasyonları (a/h) ve sabit % 2.5'luk (a/h) kitozan konsantrasyonu ile (PVA:Kitozan) 1:4 (h/h) hacim oranında karıştırılarak toplam hacim 50 ml olacak şekilde, Polivinil alkol/Kitozan (PVA/Kitozan) hidrojenleri dondurma-çözündürme yöntemi ile hazırlanmıştır. Bu yöntemde jelleşme -20 °C'de kristalize olan PVA'nın hidroksil grupları ile kitozanın amin gruplarının çapraz bağ oluşturmasıyla gerçekleşmektedir. PVA gerekli miktarlarda tartılıp 10 ml steril bidistile su içerisinde 80-90° C sıcaklıkta çözündürülmüştür. Kitozan çözeltisinin konsantrasyonu % 2.5 (a/h) olacak şekilde glasiyel asetik asit ile hazırlanmıştır. PVA çözeltisi kitozan çözeltisine ilave edilerek magnetik karıştırıcıda 3 saat karıştırılarak homojen bir jelasyon sağlanmıştır. Hazırlanan formülasyonlar 12 saat boyunca - 20 ° C'de daha sonra 6 saat boyunca oda sıcaklığında (25 °C) tutularak bir dondur-çöz döngüsü gerçekleştirilmiştir. Bu proses, iki siklus olarak yapılmıştır (Yang ve ark., 2018).

5.2.6.2. PLGA nanopartikül içeren PVA/Kitozan hidrojenlerin hazırlanması

PLGA nanopartikül içeren PVA/kitozan hidrojel formülasyonları benzer metod ile hazırlanmıştır. Hazırlanan hidrojenlere dondurma-çözündürme siklusundan

önce 100 mg nanopartikül eklenmiştir. PLGA nanopartikül içeren 50 ml hacmindeki jel 20 saniye homojenize edilip, 12 saat boyunca - 20 ° C'de daha sonra 6 saat boyunca oda sıcaklığında (25 °C) tutularak iki siklus şeklinde hidrojel oluşumu sağlanmıştır. Hazırlanan hidrojeller +4° C'de saklanmıştır (Liu ve ark., 2007). Hidrojel formülasyonları **Tablo 8**'de verilmiştir.

Tablo 8. PVA/Kitozan hidrojel formülasyonları (n=3).

Formülasyon kodu	PVA% (a/h)	Kitozan % (a/h)	PLGA np içeren formülasyonlar
H1	% 2.5	% 2.5	-
H2	% 5.0	% 2.5	-
H3	% 10	% 2.5	-
H4	-	% 2.5	-
H5	% 10	% 2.5	+

5.2.6.3. PVA/Kitozan hidrojellerin karakterizasyonu

5.2.6.3.1. PVA/Kitozan hidrojellerin fourier dönüşümlü kızılötesi spektroskopisi (FT-IR)

Tüm formülasyonlar liyofilize edildikten sonra FTIR spektrumu yapılmıştır. PVA, kitozan ve hidrojel formülasyonlarının yapısında yer alan kimyasal grupların analizi gerçekleştirilmiştir. IR spektrumundaki çeşitli pikler, farklı grupların varlığı açısından grafik üzerinden yorumlanmıştır (Moura ve ark., 2014).

5.2.6.3.2. PVA/Kitozan hidrojellerin taramalı elektron mikroskop analizi

Hidrojellerin morfolojisi taramalı elektron mikroskopisi (SEM) (Carl ZEISS / EVO 40/Almanya) ile gözlemlenmiştir. Bir miktar liyofilize hidrojel örneği metalik bir yüzeye yerleştirilmiştir ve daha sonra altın paladyum bir tabaka ile vakum altında kaplanarak 5-10 kV'de ölçümler yapılmıştır (Figuerola-Pizano ve ark., 2018).

5.2.6.3.3 PVA/Kitozan hidrojellerin su tutma kapasitesi

Hidrojellerin şişme profili jel iyonizasyonuna ve iyonik güce bağlıdır. Şişme çalışmaları PBS pH: 7.4 tamponu ile 0, 5, 10, 15, 30, 45, 60 ve 90'ıncı dakikalarda gravimetrik olarak yapılmıştır. Yaklaşık bir gram hidrojel tartılır ve belirtilen zaman

aralıklarında 1 ml PBS hidrojelini üzerine mikropipet yardımıyla ilave edilmiştir. Belirli sürelerin sonunda, fazla su kurutma kağıdıyla çıkarılıp ve tekrar tartılmıştır. Hidrojelini su tutma kapasitesi, ağırlık farkı ile hesaplanmıştır. Bu deney hem nanopartikül içermeyen hem de PLGA nanopartikül içeren hidrojel formülasyonları için yapılmıştır. Deneyler 3 kez tekrarlanmıştır. Su tutma kapasitesi aşağıdaki formül ile hesaplanmıştır (Sezer ve ark., 2008).

$$(\%) \text{ Su tutma kapasitesi} = ((W_t - W_0) / W_0) \times 100$$

W_t = t anındaki hidrojel formülasyonunun ağırlığı

W_0 = Başlangıçtaki hidrojel formülasyonunun ağırlığı

5.2.6.3.4. PVA/Kitozan hidrojellerin *in vitro* salım çalışmaları

PVA/Kitozan hidrojellerde yapılan su tutma kapasitesi çalışması, hidrojellerin mekanik ve biyoadezyon özelliklerinin değerlendirilmesi sonucu H3 kodlu (%10 (a/h) PVA:%2,5 kitozan (a/h)) hidrojel formülasyonu belirlenmiş ve PVA/Kitozan hidrojel (1:4; h/h) 1ml hazırlanmıştır. 5.2.6.2.'de belirtilen yöntemle göre H3 kodlu hidrojelini içerisine 10 mg F (%3 PLGA) kodlu PLGA nanopartiküller eklenmiştir. İki siklus dondurma-çözündürme yöntemi ile H5 kodlu (PLGA nanopartikül içeren PVA/Kitozan) hidrojeli oluşturulmuştur ve *in vitro* salım çalışması yapılmıştır. 10 ng TGF- β 1 içeren PLGA nanopartiküllü PVA/kitozan hidrojel tartıldı ve üzerine 1 ml PBS pH 7.4 tamponu eklenerek 37 °C'lik su banyosunda sırasıyla 1, 2, 3, 7, 10 ve 15. günlerde örnekler toplanmıştır. Örneklem zamanlarında, numuneler 10 dakika boyunca 14000 rpm'de santrifüjlenmiş, süpernatantlar alınıp -20 °C'de saklanmıştır ve taze PBS eklenerek bir sonraki örnek alım zamanına kadar inkübasyona devam edilmiştir. Hidrojellerden salınan rhTGF- β 1 miktarları ELISA kit (Enzo Life Sciences, ABD) kullanılarak hesaplanmıştır. Deneyler üç kez tekrarlanmıştır ve standart sapmalar hesaplanmıştır (Wu ve ark., 2004; DeFail ve ark., 2006).

5.2.6.3.5. PVA/Kitozan hidrojellerin *in vitro* biyoadezyon çalışmaları

Hidrojellerin deriye yapışma gücünün değerlendirilmesi amacıyla yapılan bir analizdir. Biyoadezyon çalışmaları TA-XT Texture analiz cihazı ile p0.5 perspektif probu (12.5 mm çap) kullanılarak yapılmıştır ve çalışmalarda taze tavuk sırt derisi yağ ve debrislerinden arındırılarak doku modeli olarak kullanılmıştır. Kesilen tavuk

derisi p0.5 perspeks probunun alt yüzeyine tutturulmuştur. Hidrojeller eşit miktarlarda tartılarak 6 kuyucuklu plakalara yerleştirilmiştir. Hava kabarcıklarını uzaklaştırmak için formülasyonların oda sıcaklığında beklemesi sağlanmıştır. Veriler, Texture Exponent 4.0.4.0 yazılımı kullanılarak hesaplanmıştır. Eğrinin (AUC) altındaki alan biyoadezyon işini vermektedir, birimi mJ (N x mm) dür ve 1 cm²'ye düşen biyoadezyon işini hesaplamak için aşağıdaki formül kullanılmıştır. Her ölçüm üç kez tekrarlanmıştır. Test parametreleri aşağıdaki gibidir (Cevher ve ark., 2008):

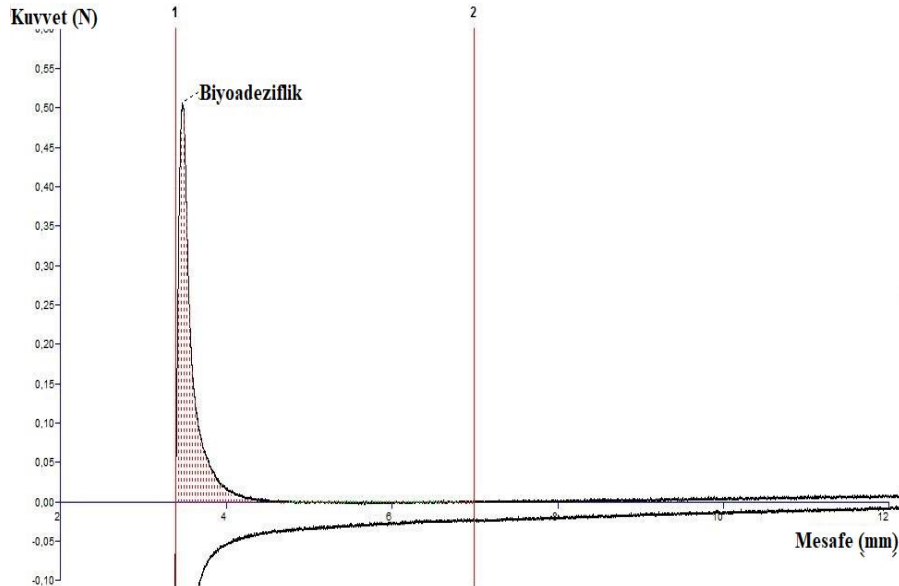
Test öncesi ve sırasında probun hızı	0,1 mm/sn
Test sonrası probun hızı	0,2 mm/sn
Uygulanan kuvvet	0,500 N
Probuñ jele batma mesafesi	15 mm
Hidrojel ile derinin temas süresi	120 sn
Teste başlamak için gereken kuvvet	0,01 N

Formülasyonların biyoadezif özelliğinin hesaplanmasında aşağıdaki formül kullanılmıştır:

$$\text{Adezyon işi (mJ. cm}^2\text{)} = \text{AUC} / (\pi r^2)$$

πr^2 : Jelin temas ettiğİ mukozal yüzey

AUC: Biyoadezyon grafiğİ altında kalan alan



Şekil 23. Hidrojellerde biyoadezyon tayinine ait grafik.

5.2.6.3.6. PVA/Kitozan hidrojenlerin mekanik özellikleri

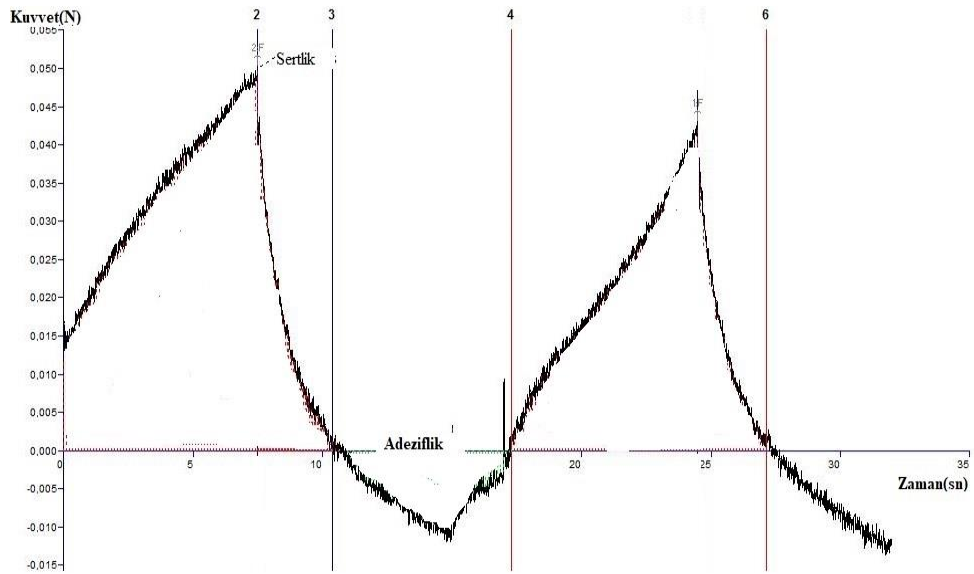
Formülasyonların mekanik özellikleri, p10 perspeks probu (10 mm çap ve 5 kg yük hücresi) ile TA-XT Plus Texture analizi (Stable Micro Systems, UK) kullanılarak belirlenmiştir. TPA test parametreleri aşağıdaki gibi ayarlanmıştır:

Test öncesi/sonrası probun hızı	2 mm/sn
Test esnasındaki probun hızı	2 mm/sn
Probun jelle batma mesafesi	15 mm
Probun ikinci batmadan önce bekleme süresi	2 sn
Teste başlamak için gereken kuvvet	0, 010 N.

Hidrojel formülasyonları, sabit yüksekliği 8 cm ve hacmi 50 ml olan plastik beherlere alınmıştır. Ultrasonik su banyosunda, hava kabarcıkları 30 dakika boyunca 25 °C'de uzaklaştırılmıştır. Veriler Texture Exponent 4.0.4.0 yazılımı kullanılarak hesaplanmıştır. Kuvvet-zaman grafiğine bağlı olarak, hidrojenlerin sertlik, adeziflik ve kohesiflik gibi birçok mekanik özelliği hesaplanmıştır (Cevher ve ark., 2008).

a. Hidrojenlerde sertlik tayini

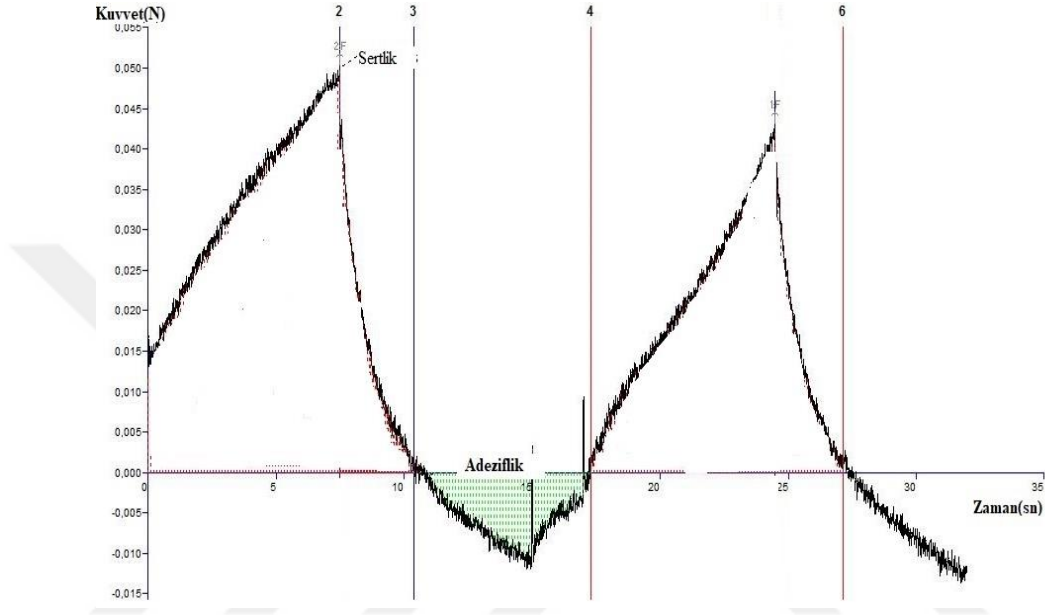
Sertlik, hidrojelde deformasyon oluşturmak için gereksinim duyulan kuvvet veya en yüksek tepe kuvveti olarak tanımlanmıştır. Formülasyonların ölçümleri ile elde edilen grafikler ile hesaplamalar yapılmıştır. Deneyler üç kez tekrarlanmıştır (Bektaş ve ark., 2014).



Şekil 24. Hidrojenlerde sertlik tayinine ait grafik.

b. Hidrojellerde adeziflik tayini

Adeziflik, negatif kuvvet alanıdır ve jelin yüzeyi ile probun yüzeyi arasındaki çekme kuvvetini yenmek için gerekli işi tanımlamaktadır. Hidrojel formülasyonlarının ölçümleri ile elde edilen grafikler ile sonuçlar elde edilerek hesaplamalar yapılmıştır. Deneyler üç kez tekrarlanmıştır (Bektaş ve ark., 2014).



Şekil 25. Hidrojellerde adeziflik tayinine ait grafik.

c. Hidrojellerde koheziflik tayini

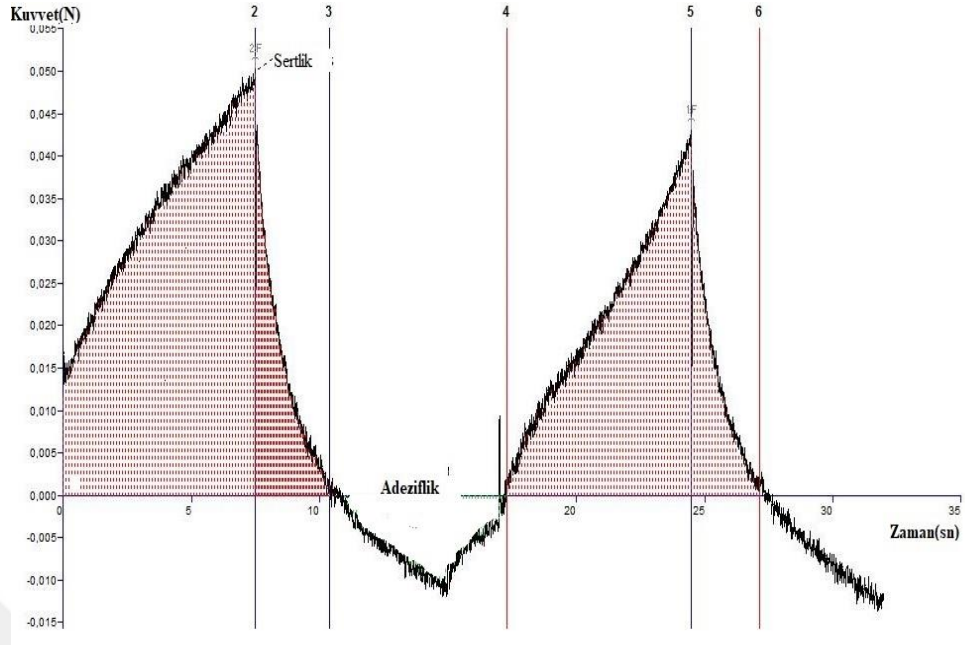
Koheziflik, ikinci sıkıştırma sırasında oluşan kuvvet zaman eğrisinin altındaki alanın, iyileşme süresi ile ayrılmış ilk sıkıştırma sırasında oluşan alana oranı olarak tanımlanmıştır. Formülasyonlar 3 paralelli olarak hazırlanmıştır ve elde edilen verilerin gerekli hesaplamaları yapılmıştır (Bektaş ve ark., 2014).

$$\text{Koheziflik} = \frac{AUC (4-6)}{AUC (1-3)}$$

AUC: Eğri altındaki grafik alanı

AUC (4-6): N x mm (mJ)

AUC (1-3): N x mm (mJ)

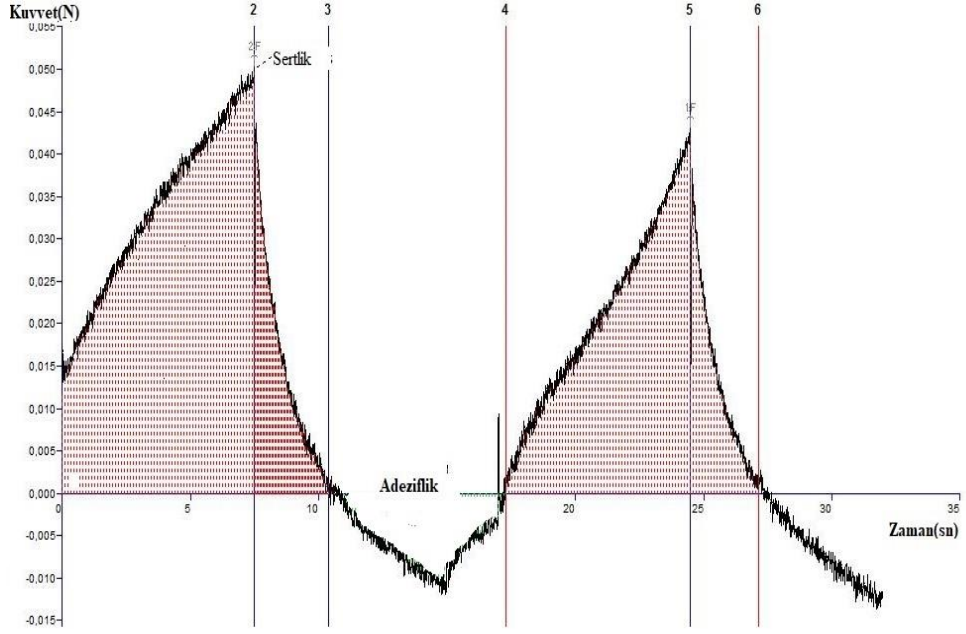


Şekil 26. Hidrojellerde koheziflik tayinine ait grafik.

d. Hidrojellerde elastikiyet tayini

Probun ikinci kez hidrojele batma sürecinde yapısal deformasyonun maksimum seviyede olması için geçen sürenin, probun hidrojele ilk kez batarak oluşturduğu yapısal deformasyon için geçen süreye oranı olarak hesaplanmıştır. Formülasyonlar 3 paralelli olarak hazırlanmıştır (Bektaş ve ark., 2014).

$$\text{Elastikiyet} = \frac{\text{Zaman (4-6)}}{\text{Zaman (1-3)}}$$



Şekil 27. Hidrojellerde elastikiyet tayinine ait grafik.

5.2.6.3.7. PVA/Kitozan hidrojellerin viskozite ölçümleri

Hidrojeller 50 ml'lik plastik beherlerde hazırlanmış olup, viskozite ölçümleri 48 saat sonra yapılmıştır. Hava kabarcıklarını ortadan kaldırmak için ultrasonik bir su banyosunda bekletilmiştir. Viskozite çalışmaları, 25 °C'de Brookfield DV-E viskozimetre (6 nolu prob, 30 rpm) kullanılarak yapılmıştır. Her örnek üç kez tekrarlandı ve üç ölçümün ortalaması hesaplanarak veriler sunulmuştur (Amri ve ark., 2019).

5.2.7. PAMAM/PVA hidrojellerin hazırlanması ve karakterizasyonu

5.2.7.1. PAMAM/PVA hidrojellerin hazırlanması

PAMAM Dendrimer G5'in (jenerasyon 5) moleküler ağırlığı: 28825 Da'dır (g/mol). Çapı 54 Å'dur. Terminal yüzey grubu olan (-NH₂) 128 tanedir. PAMAM/PVA hidrojel formülasyonları için, bir miktar PVA 90 °C'ye ısıtılarak %10'luk (a/h) PVA çözeltisi hazırlanmıştır. Diğer yandan, metanol içerisindeki G5-NH₂ PAMAM dendrimerden 63 µl alınıp steril bidistile su ile 500 µl'ye tamamlanmıştır. %10'luk (a/h) konsantrasyonunda hazırlanan PAMAM dendrimer solüsyonu hacimsel olarak farklı oranlarda sırasıyla (PAMAM/PVA; h/h) 1:2, 1:3 ve sadece PVA olmak üzere formülasyonlar oluşturulmuştur. 12 kuyucuklu plakalarda hazırlanan formülasyonlar 5 dakika boyunca magnetik karıştırıcıda karıştırıldıktan sonra 23 saat boyunca - 20 °C' de daha sonra 1 saat boyunca oda sıcaklığında (25 °C)

tutulmuştur ve bu siklus üç kez tekrarlanmıştır. Dondurma-çözündürme yöntemi ile hidrojel oluşumu sağlanmıştır. Hazırlanan hidrojellerin formülasyon bilgileri **Tablo 9**'da verilmiştir (Wu ve ark., 2004).

Tablo 9. PAMAM/PVA hidrojellerin formülasyonu(n=3).

Formülasyon kodu	PAMAM Konsantrasyonu	PVA Konsantrasyonu	PAMAM hacimsel oranı	PVA hacimsel oranı	TGF- β 1 miktarı
F1	%10	%10	1	2	1.5 μ g
F2	%10	%10	1	3	1.5 μ g
F3	-	%10	0	4	1.5 μ g
F4	%10	%10	1	2	-
F5	%10	%10	1	3	-
F6	-	%10	0	4	-

5.2.7.2. PAMAM/PVA hidrojellerin karakterizasyonu

5.2.7.2.1. PAMAM/PVA hidrojellerin FT-IR spektroskopisi

Tüm formülasyonlar liyofilize edildikten sonra FT-IR spektrumu yapılmıştır. IR spektrumundaki çeşitli pikler, farklı grupların varlığı açısından grafik üzerinden yorumlanmıştır (Wu ve ark., 2004).

5.2.7.2.2. PAMAM/PVA hidrojellerin su tutma kapasitesi

Hidrojellerin su tutma kapasitesi jelin iyonizasyonuna ve çapraz bağlanma oranına bağlıdır. Şişme çalışmaları PBS pH: 7.4 tamponu ile gravimetrik olarak yapılmıştır. Yaklaşık bir gram hidrojel tartılır ve belirtilen zaman aralıklarında 1 ml PBS hidrojin üzerine mikropipet yardımıyla ilave edilmiştir. Belirli sürelerin sonunda, fazla su kurutma kağıdıyla çıkarılıp ve tekrar tartılmıştır. Hidrojin su tutma kapasitesi, ağırlık farkı ile hesaplanmıştır. Bu deney tüm hidrojel formülasyonları için gerçekleştirilmiştir. Her formülasyon için 3 kez tekrarlanmıştır.

Su tutma kapasitesi aşağıdaki formül ile hesaplanmıştır.

$$(\%) \text{ Su tutma kapasitesi} = ((W_t - W_0) / W_0) \times 100$$

W_t = t anındaki hidrojel formülasyonunun ağırlığı

W_0 = Başlangıçtaki hidrojel formülasyonunun ağırlığı (Sezer ve ark., 2008)

5.2.7.2.3. PAMAM/PVA hidrojellerin *in vitro* salım çalışması

500 pg rhTGF- β 1 içerecek şekilde PAMAM/PVA hidrojelleri tartıldı ve üzerine 1 ml PBS pH: 7,4 tamponu eklenerek 37 °C'lik su banyosunda sırasıyla 1, 2, 3, 7, 10 ve 15. günlerde örnekler toplanmıştır. Örnekleme zamanlarında, numuneler 10 dakika boyunca 14000 rpm'de santrifüjlenmiş, süpernatantlar alınıp -20 °C'de saklanmıştır ve taze PBS eklenerek bir sonraki örnek alım zamanına kadar inkübasyona devam edilmiştir. Hidrojellerden salınan rhTGF- β 1 miktarları ELISA kit (Enzo Life Sciences, ABD) kullanılarak belirlenmiştir. Deneyler üç kez tekrarlanmıştır ve standart sapmalar hesaplanmıştır (Wu ve ark., 2004; DeFail ve ark., 2006).

5.2.8. Hücre kültürü çalışmaları

5.2.8.1. Hücre canlılığı deneyi (MTT testi)

Hazırlanan nanopartikül ve hidrojellerin sitotoksitesi, NIH 3T3 (ATCC-CRL-1658) ve HaCaT (ATCC-PCS 200-011) hücreleri kullanılarak, MTT (3-(4,5-Dimetiltiyazol-2-il) -2,5-difeniltetrazolium bromür) deney protokolü uygulanarak belirlenmiştir. Hücreler, 100 μ l besiyeri (% 10 FBS içeren DMEM) ile 96 kuyucuklu plakalara (TPP, Trasadingen, Almanya) içerisinde 1×10^4 hücre / kuyu olacak şekilde ekildi ve bir gece boyunca 37 °C'de, % 5 CO₂ inkübe edilmiştir. Nanopartiküller, 2,5 ng TGF- β 1 protein içerecek şekilde tartılmıştır ve DMEM ortamı ile süspande edilerek kuyulara ilave edilmiştir. TGF- β 1 (2.5 ng / 500 μ l) 500 μ l'ye besiyeri ile tamamlanarak pozitif kontrol olarak kullanılmıştır. H1, H2, H3 ve H4 kodlu formülasyonlar 5 mg olarak tartılıp 500 μ l besiyeri ile süspande edildikten sonra 25 μ l/kuyu olarak hücrelere verilmiştir. F4, F5 ve F6 nolu formülasyonlar 5'er mg tartılarak kuyulara eklenmiştir. H5, F1, F2, F3 nolu hidrojeller 2.5 ng TGF- β 1 içerecek şekilde tartılıp kuyulara eklenmiş ve daha sonra hücreler 24 saat boyunca inkübe edilmiştir. İnkübasyondan sonra, her bir kuyuya 10 μ l MTT çözeltisi

(5mg / ml) ilave edilmiştir ve hücrelerin 12 saat boyunca (37 °C, % 5 CO₂) inkübasyonu devam etmiştir. Canlı hücreler tarafından oluşturulan formazan kristallerini çözmek için SDS eklenip 24 saat inkübe edilmiştir. Daha sonra bir mikro-plaka ELISA okuyucu (Epoch Biotech USA 13121287) kullanılarak 550 ve 690 nm'de absorbansları spektrofotometrik olarak ölçülmüştür. Absorbans farkına göre hesaplamalar yapılmıştır. Hücre canlılığı, kontrol gruplarına kıyasla yüzdelere olarak ifade edilmiştir. Deneyler üç kez tekrarlanmıştır.

5.2.8.2. BrdU hücre proliferasyon deneyi

NIH 3T3 ve HaCaT hücrelerinin proliferasyonu, DNA sentezi sırasında dahil olan BrdU'nun ölçümüne dayanan bir kolorimetrik immüno deneyi ile belirlenmiştir. BrdU testi ürün protokolüne göre yapılmıştır. BrdU testinde, hücrelerin kuyulara ekilmesi, formülasyonların eklenmesi ve inkübasyon süresi MTT testinde olduğu gibi yapılmıştır. Proliferasyon yapan hücrelerin DNA'sında Timin nükleotidi yerine ne kadar çok BrdU bağlanırsa, DNA sentezinin bir sonucu olarak pozitif hücrelerin rengi o kadar mavidir. Reaksiyon, her kuyuya 100 µl Stop solüsyonunun eklenmesi ile durdurulmuştur. Pozitif kuyuların rengi maviden parlak sarıya dönüşmüştür. Daha sonra plakanın absorbansı, 450/550 nm dalga boylarında bir ELISA okuyucu (Epoch Biotech 13121287 ABD) kullanılarak spektrofotometrik olarak ölçülmüş ve hesaplamalar yapılmıştır. Deneyler üç kez tekrarlanmıştır.

5.2.8.3. *In vitro* yara iyileşme modeli (Scratch testi)

HaCaT hücreleri ve NIH-3T3 fibroblast hücreleri, DMEM besiyeri ortamında 5x10⁵ hücre / kuyu yoğunluğunda altı kuyulu plakalara (TPP, İsviçre) ekilmiştir. Hücreler, % 70-% 80 yoğunluğa ulaşana kadar inkübasyon devam ettirilmiştir. Daha sonra steril bir 200 µl'lik pipet ucu kullanılarak her kuyuya bir çizik atılmıştır. Bu çizik sonucunda yüzeyden kalkan hücreler iki kez PBS (pH 7.4) ile yıkanıp, besiyeri değiştirilmiştir. Seçilen formülasyonlar ve pozitif kontrol olan rhTGF-β1 besiyerine ilave edilmiştir. *In vitro* yara iyileştirme modeli için optimize formülasyonlar (F np, E np, H3, H5, F1, F4 hidrojel) seçilmiştir. Kuyu başına 2,5 ng TGF-β1 içerecek şekilde F nanopartikül ve eşit miktarda E kodlu nanopartikül tartılmıştır. H5 kodlu hidrojel 2,5 ng TGF-β1 / 15 mg jel olacak şekilde ve H3 kodlu jel 15 mg olarak tartılıp besiyeri ile süspande edilerek kuyulara verilmiştir. F1 kodlu hidrojel 2,5 ng TGF-β1 / 2.2 mg olacak şekilde ve F4 kodlu hidrojelde 2.2 mg olarak tartılmış ve

kuyulara eklenmiştir. Hücrelerdeki ilk çizilme sırasında ve 48. saatlerde, görüntüler Olympus IX2 SLP kamera sistemini içeren (Olympus CKX 41 Japonya) invert bir mikroskop kullanılarak çekilmiştir. Hücreler, tüm iyileşme prosedürü boyunca 37 ° C'de, % 5 CO₂'de tutulmuş ve deneyler üç kez tekrarlanmıştır (Hulkower ve Herber, 2011; Chereddy ve ark., 2015).

5.2.9. İstatistiksel Analiz

Tez kapsamındaki çalışmalarda elde edilen verilerin istatistiksel analizinde GraphPad Prism® (ver. 8.1) programı kullanılmıştır. Analiz yöntemi olarak ANOVA ve normalite testi olarak Shapiro-Wilk (W) kullanılmıştır. $p < 0,05$ sonuçları anlamlı kabul edilmiştir.

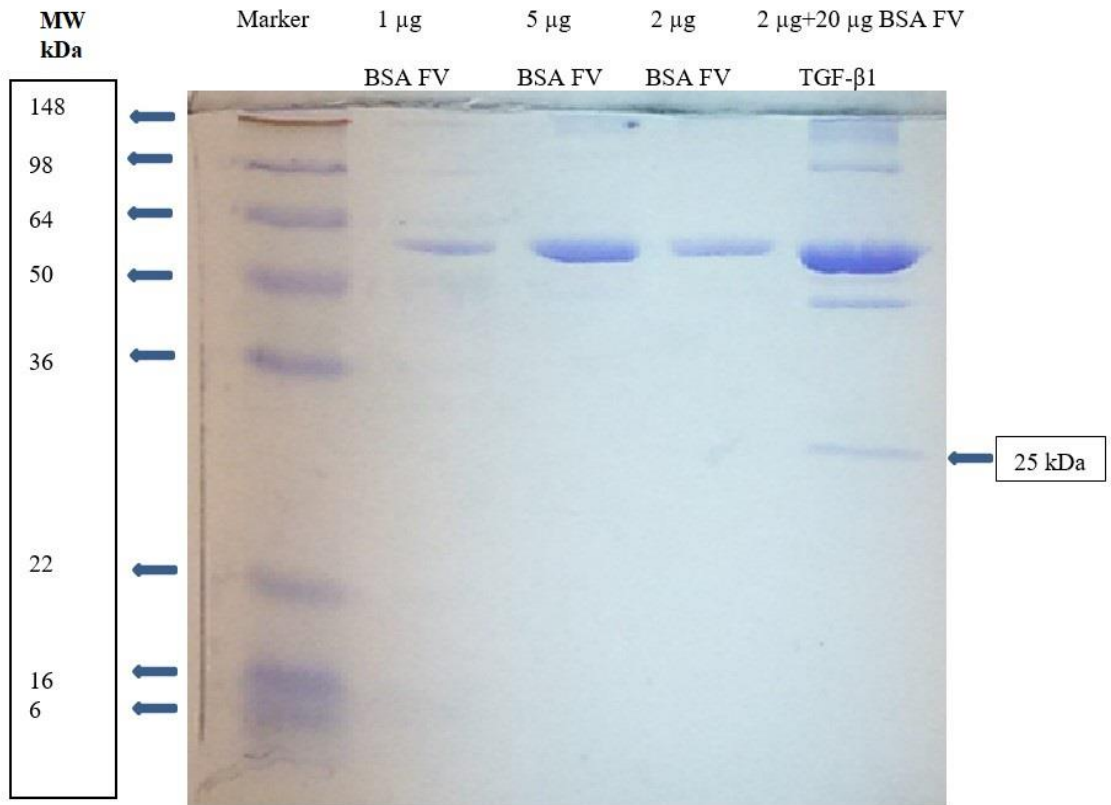


6.BULGULAR

6.1. Rekonstitüe Edilen rhTGF- β 1 Proteininde Yapılan Kontroller

6.1.1. Rekonstitüe edilen rhTGF- β 1 proteinin SDS-PAGE yöntemi ile kontrolü

5.2.1’de belirtildiği gibi hazırlanan rekonstitüe rhTGF- β 1 alikotlanırken BSA fraksiyon V kullanılmıştır. BSA fraksiyonlu olduğu için birden fazla band göstermekle birlikte rekonstitüe proteinde hem 66 kDa’luk BSA hem de 25 kDa’luk rhTGF- β 1 protein bandları gösterilmiştir.

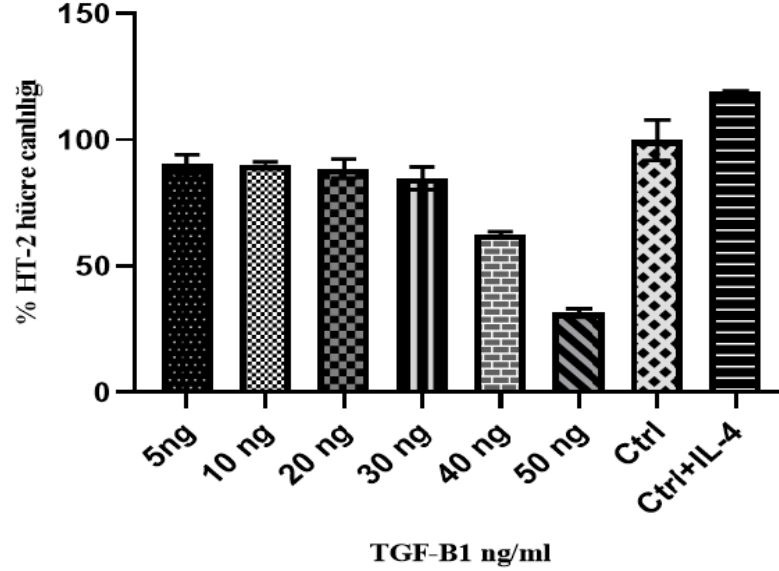


Resim 2. Rekonstitüe edilen rhTGF- β 1 proteinin SDS-PAGE görüntüsü.

6.1.2. Rekonstitüe edilen rhTGF- β 1 biyoaktivite deneyi

TGF- β 1 tarafından, IL-4 bağımlı HT-2 hücre proliferasyon inhibisyonu doza bağımlı olarak yapılmıştır. 5, 10, 20, 30, 40 ve 50 ng/ml olacak şekilde rhTGF- β 1 proteini HT-2 hücresi içeren kuyulara verilmiştir. Sırasıyla %90,41; %89,90; %88,60; %84,80; %62,69 ve %31,52 oranlarında hücre canlılığı tespit edilmiştir. TGF- β 1 ekli olmayan IL-4 ekli HT-2 içeren kuyularda ise % 119,1 hücre canlılığı görülmüştür. Bu sonuçlara göre rhTGF- β 1 proteini biyoaktiftir ve formülasyon

alışmalarında kullanılmıştır. Kontrole kıyasla tüm rhTGF-β1 dozları anlamlı derecede inhibisyon sağlamıştır (p<0,05).



Şekil 28. rhTGF-β1 protein biyolojik aktivite testi

6.2. rhTGF-β1'nin Standart Eğri Hazırlanmasına Ait Bulgular

rhTGF-B1 ait standart eğri yöntem bölümünde anlatıldığı gibi hazırlanmıştır. Enkapsülasyon etkinliği bu eğri ile hesaplanmıştır. rhTGF-β1, Enzo Life Science ELISA kit ile belirlenmiştir. Kullanılan kitin hassasiyeti 3.3 pg/ml olarak belirtilmiştir.

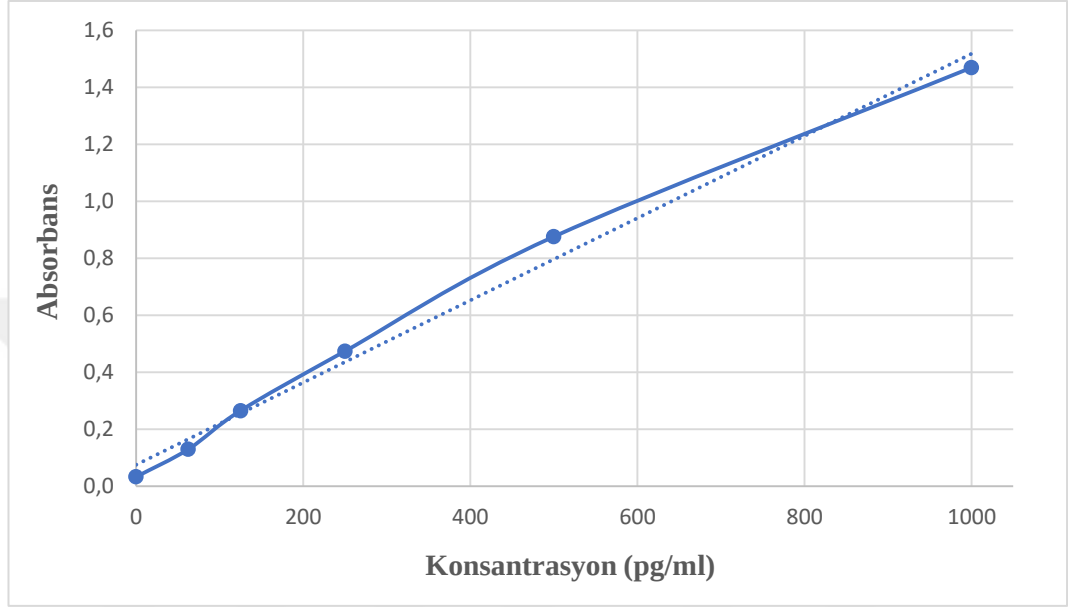
Tablo 10. rhTGF-β1 proteinin standart eğri absorbans değerleri (n=3).

Konsantrasyon (pg/ml)	Absorbans±SD
0	0±0,048
62,5	0,099±0,050
125	0,231±0,047
250	0,428±0,044
500	0,842±0,048
1000	1,437±0,049

Standart eğrinin çizilmesi ile elde edilen denklem ve R^2 değeri aşağıda belirtilmiştir:

$$y=0,0014x+0,0754$$

$$R^2 = 0,9911$$



Şekil 29. rhTGF-β1 standart eğrisi.

6.3. PLGA Nanopartikül Formülasyonlarına Ait Bulgular

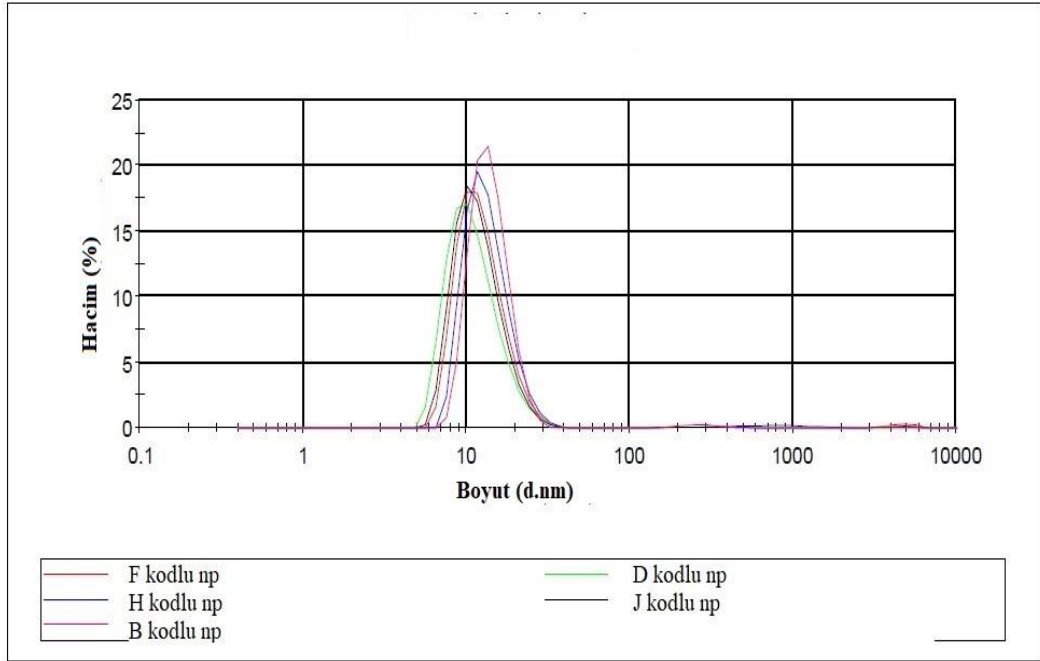
6.3.1. PLGA nanopartiküllerin boyut, zeta potansiyel ve PDI verilerine ait bulgular

5.2.5.1. de belirtilen şekilde hazırlanan nanopartikül formülasyonları; yüzey yükü, boyutları ve PDI değerleri **Tablo 11**'de belirtilmiştir.

Tablo 11. PLGA nanopartiküllerin boyut, yüzey yükü ve PDI değerleri (n=3).

Formülasyon kodu	PLGA %	PVA %	TGF-B1	Zeta potansiyel (mV)±(SD)	Boyut (Nm)±(SD)	Polidispersite indeks ±(SD)
A	1	1	-	-19,86± 0,40	240,66± 4,88	0,329±0,03
B	1	1	+	-26,83± 0,94	289,40± 3,90	0,323±0,01
C	2	1	-	-26,68± 1,64	195,63± 3,74	0,281±0,04
D	2	1	+	-26,98± 1,30	217,43± 3,40	0,286±0,04
E	3	1	-	-22,85± 3,50	215,83± 2,82	0,328±0,01
F	3	1	+	-27,17± 3,25	274,76± 1,50	0,317±0,01
G	4	1	-	-24,70± 0,63	197,16±16,31	0,346±0,02
H	4	1	+	-29,64± 2,09	236,06± 4,05	0,331±0,03
I	5	1	-	-28,08± 3,15	163,56±13,92	0,316±0,07
J	5	1	+	-28,52± 4,52	258,00±16,36	0,298±0,02

Tablo 11'de belirtilen nanopartikül formülasyonları hazırlanmıştır. Protein yüklü nanopartiküllerin boyutu $217,4 \pm 3,4$ ve $289,4 \pm 3,9$ nm arasında elde edilmiştir. Nanopartiküllerin zeta potansiyeli değerleri $-29,6 \pm 2,1$ ve $-26,8 \pm 0,9$ arasındadır ($p>0,05$). Nanopartiküllerin polidispersite indeksi (PDI) dar bir aralıktadır ve formülasyonlar arasında önemli bir fark gözlenmemektedir. PDI değerleri 0.281-0.346 aralığındadır. Polidispersite indeks değerleri nanopartiküllerin homojen olduğunu göstermiştir.



Şekil 30. PLGA nanopartiküllerin zetasizer lazer tekniği ile partikül boyut analizi.

6.3.2. TGF- β 1 içeren PLGA nanopatiküllerin verimine ait bulgular

5.2.5.2.2’de belirtildiği gibi PLGA nanopartiküllerin % verim hesaplamaları yapılmıştır. Ortalama ve standart sapma değerleri **Tablo 12’** de gösterilmiştir. B kodlu formülasyon % verim $71,67 \pm 7,64$; D kodlu formülasyonda % verim $50,83 \pm 9,46$; F kodlu formülasyon $81,67 \pm 6,94$; H formülasyon % $70,42 \pm 6,88$ ve J % verim $68 \pm 7,21$ olarak hesaplanmıştır. En yüksek % verim F formülasyonuna ait iken en düşük % verim D formülasyona aittir.

Tablo 12. TGF- β 1 içeren PLGA nanopartiküllerin % verimleri.

Formülasyon kodu	n=1 (mg)	n=2 (mg)	n=3 (mg)	ort	ss	% Verim	% ss
B	13	14	16	14,33	1,53	71,67	7,64
D	16	22	23	20,33	3,79	50,83	9,46
F	41	47	49	45,67	4,16	81,67	6,94
H	62	51	56	56,33	5,51	70,42	6,88
J	62	66	76	68,00	7,21	68,00	7,21

6.3.3. PLGA nanopartiküllerin enkapsülasyon etkinliğine ait bulgular

Nanopartiküllerin enkapsülasyon etkinliği, süpernatantlardaki enkapsüle olmamış TGF- β 1 protein miktarının ELISA yöntemi ile hesaplanmasıyla belirlenmiştir ve yüksek oranlar elde edilmiştir (**Tablo 13**). Tüm nanopartiküller yüksek enkapsülasyon etkinliği göstermiştir. PLGA nanopartiküllerin enkapsülleme verimi % $98,8 \pm 0,2$ ile % $99,8 \pm 0,04$ arasındadır. Maksimum enkapsülasyon etkinliği gösteren formülasyon kodu J'dir. % 99,8 ile yüzde yüze yakın bir değer elde edilmiştir.

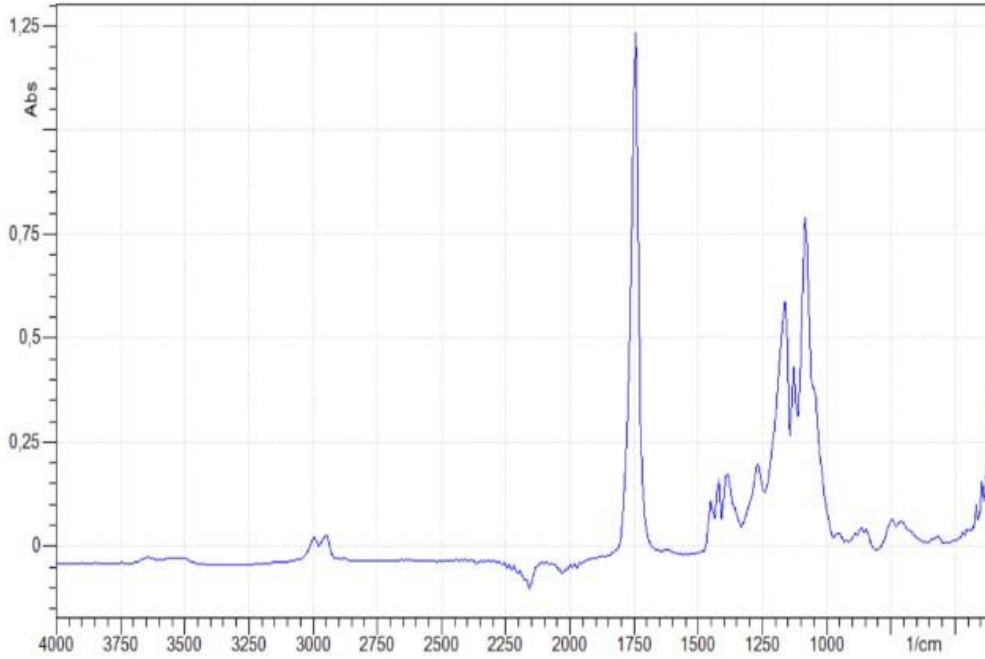
Tablo 13. TGF- β 1 içeren PLGA nanopartiküllerin enkapsülasyon etkinliği ve in vitro biyoadezyon ölçüm sonuçları (n=3).

Formülasyon kodu	Enkapsülasyon etkinliği (%) $\pm$ sd	<i>In vitro</i> biyoadezyon çalışması (mJ/cm ² $\pm$ sd)
B	98,85 $\pm$ 0,25	0,11 $\pm$ 0,13
D	99,54 $\pm$ 0,11	0,19 $\pm$ 0,03
F	99,52 $\pm$ 0,12	0,12 $\pm$ 0,08
H	99,64 $\pm$ 0,03	0,17 $\pm$ 0,02
J	99,88 $\pm$ 0,04	0,12 $\pm$ 0,03

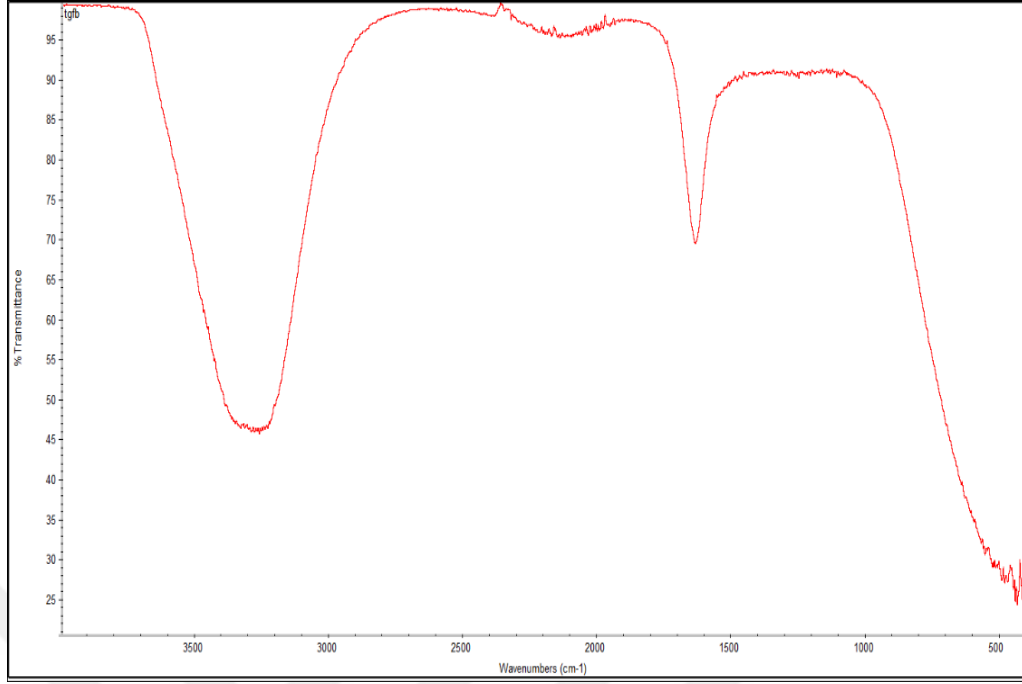
6.3.4. PLGA nanopartiküllerin fourier dönüşümlü kızılötesi spektroskopisine (FT-IR) ait bulgular

5.2.5.2.4' te belirtildiği gibi yapılan FT-IR çalışması, polimer PLGA ile ilaç etkin maddesi olan TGF- β 1 proteini arasındaki etkileşimi ve nanopartikül formülasyonunun oluşup oluşmadığına dair kimyasal gruplar açısından değerlendirme sağlamıştır. **Şekil 31**'de; karbonil (-C = O) gerilmesi (1780-1720 cm⁻¹), C – O germe (1310-1160 cm⁻¹), –CH (2990-2830 cm⁻¹) PLGA polimer yapısına ait gruplardır.

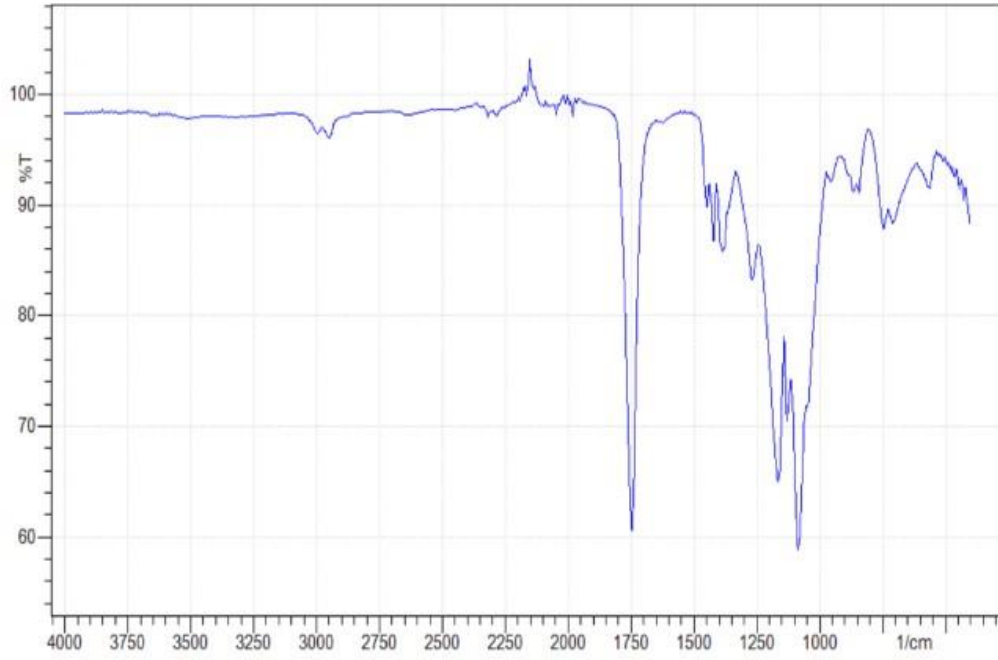
Şekil 32'de; proteinin temel yapısı olan amino asitler açısından, 3262 cm^{-1} 'deki büyük pik amin türevi N-H ve karboksil grubundan O-H tepe değeri değerlendirildi. 2140 cm^{-1} 'de zayıf bağ protein katlanması sonucunda kompakt yapıda görülen $\text{-C}=\text{N}$ titreşimleri dahil edilmiştir. $\text{-C}=\text{O}$ karbonil germe 1636 cm^{-1} 'de görülmüştür. **Şekil 33'** de; ilaç ve polimerler arasındaki etkileşimleri incelemek için kızılötesi spektroskopi kullanılmıştır. F3 kodlu dolu PLGA nanopartiküllerindeki OH gerinimi ($3560\text{-}3450\text{ cm}^{-1}$), -CH ($3000\text{-}2855\text{ cm}^{-1}$), karbonil $\text{-C}=\text{O}$ gerinimi ($1780\text{-}1720\text{ cm}^{-1}$) ve $\text{C}-\text{O}$ ($1310\text{-}1160\text{ cm}^{-1}$) gibi pikler görülmüştür. **Şekil 34'** de; E3 kodlu boş PLGA nanopartiküllerindeki OH gerinimi ($3600\text{-}3500\text{ cm}^{-1}$), -CH ($3000\text{-}2900\text{ cm}^{-1}$), karbonil $\text{-C}=\text{O}$ gerinimi ($1800\text{-}1750\text{ cm}^{-1}$) ve $\text{C}-\text{O}$ ($1200\text{-}1100\text{ cm}^{-1}$) gibi pikler görülmüştür.



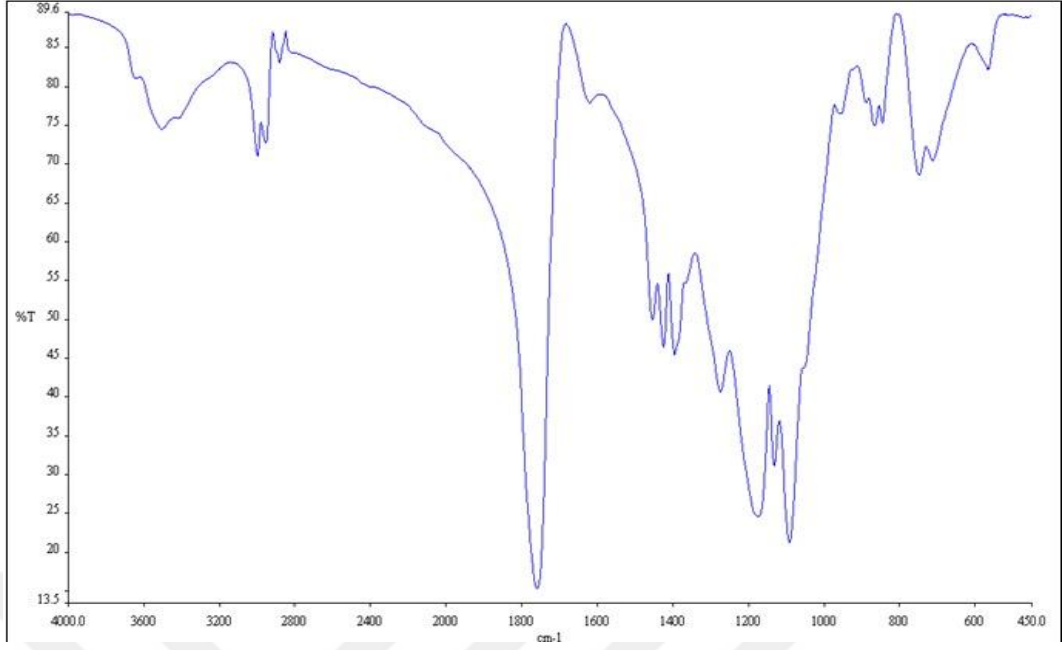
Şekil 31. PLGA 503H (L:G; 50:50) polimerin fourier dönüşümlü kızılötesi spektroskopisi.



Şekil 32. TGF-β1 proteinin fourier dönüştümlü kızılötesi spektroskopisi.



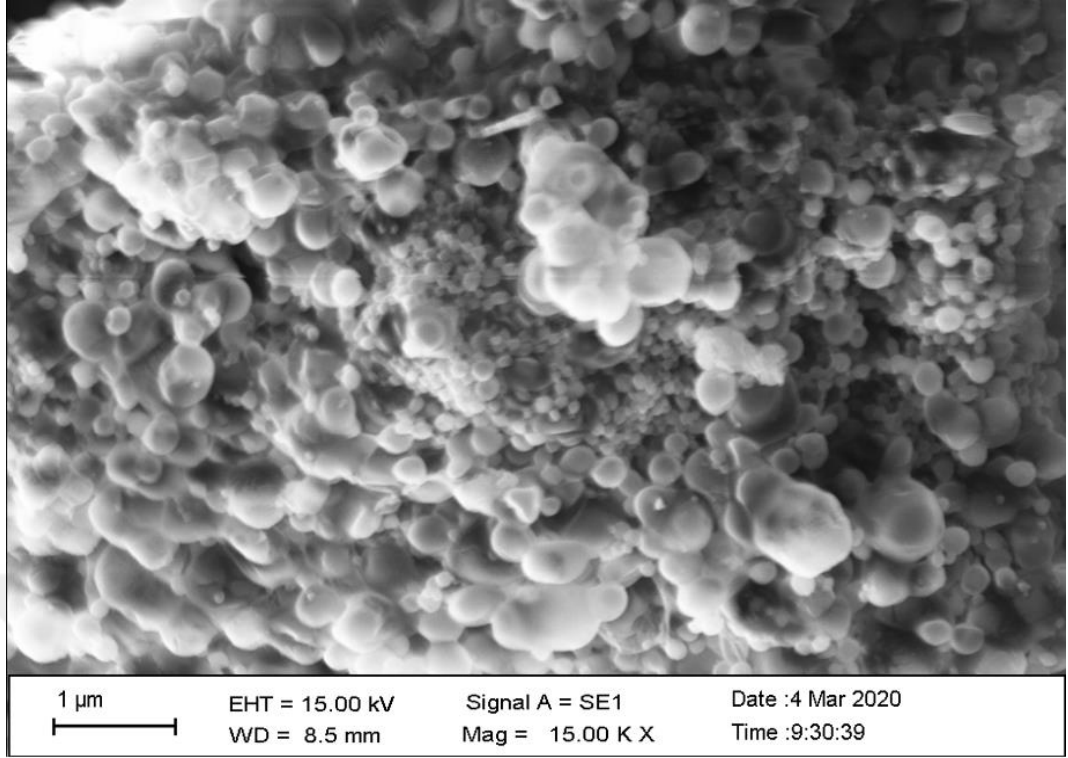
Şekil 33. F3 kodlu PLGA np'nin fourier dönüştümlü kızılötesi spektroskopisi.



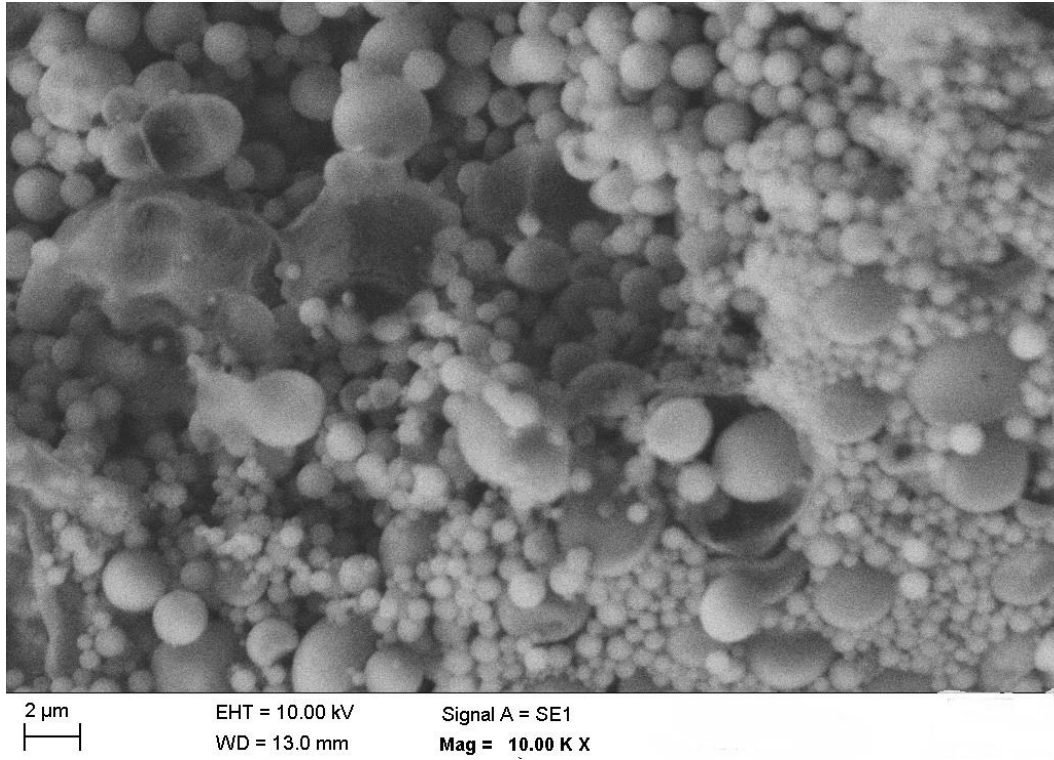
Şekil 34. E3 kodlu PLGA np'nin fourier dönüştümlü kızılötesi spektroskopisi.

6.3.5. rhTGF- β 1 içeren PLGA nanopartiküllerin morfolojik analizine ait bulgular

5.2.5.2.4'te ifade edildiği gibi TGF- β 1 içeren PLGA nanopartiküllerin SEM görüntü sonuçları değerlendirilmiştir. Ön formülasyon çalışmaları sırasında elde edilen PLGA nanopartiküllerin boyut, yüzey yükü ve ışık mikroskop görüntüleri de değerlendirilmesinin yanısıra, hazırlanan formülasyonlardan F3 ve J3 nolu nanopartiküllerin morfolojik görüntüleri **Resim 3** ve **Resim 4**'te verilmiştir. Bu görüntüler incelendiğinde nanopartiküllerin yuvarlak ve düz bir yüzeye sahip oldukları görülmektedir.



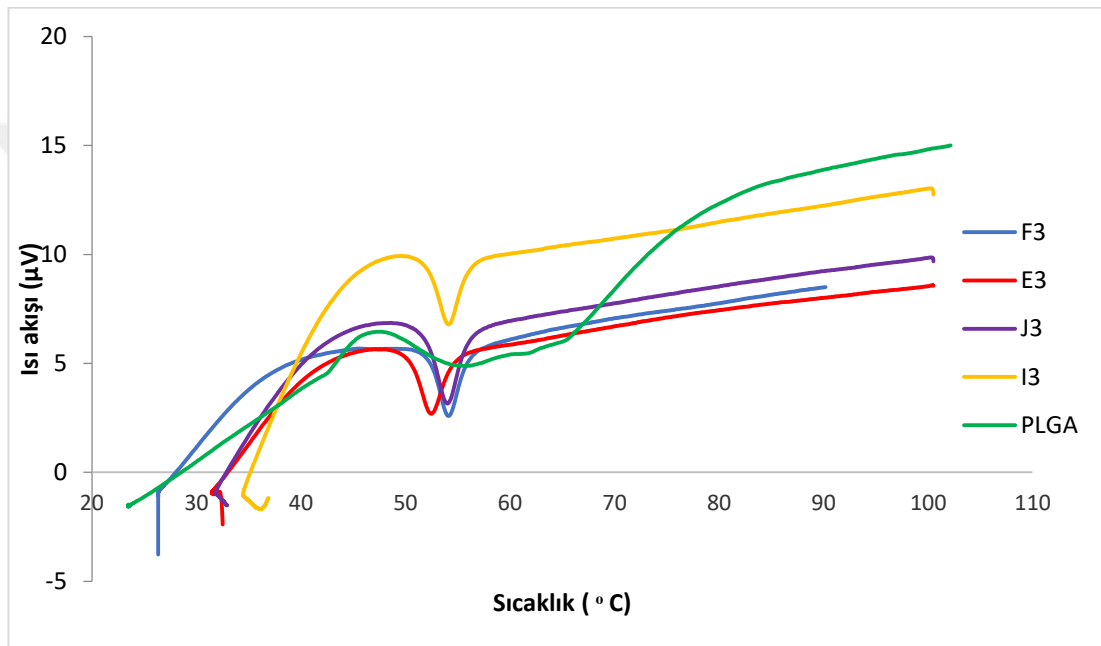
Resim 3. F3 kodlu PLGA nanopatiküllerin SEM görüntüsü (x15000).



Resim 4. J3 kodlu PLGA nanopatikül SEM görüntüsü (x10000).

6.3.6. PLGA nanopartiküllerin diferansiyel taramalı kolorimetrik (DSC) analizine ait bulgular

Hazırlanan nanopartiküllerde ilaç durumunu ve nanopartiküllerin üretimi sırasında ilaç-polimer geçimliliğini ve termal stabilite açısından değerlendirmeyi belirlemek için DSC çalışmaları yapılmıştır. **Şekil 35'** te boş PLGA npler ve TGF- β 1 yüklü nanopartiküllerin DSC termogramları gösterilmektedir. Yaklaşık 52 ° C'de belirgin bir pik gözlemlenmiştir.

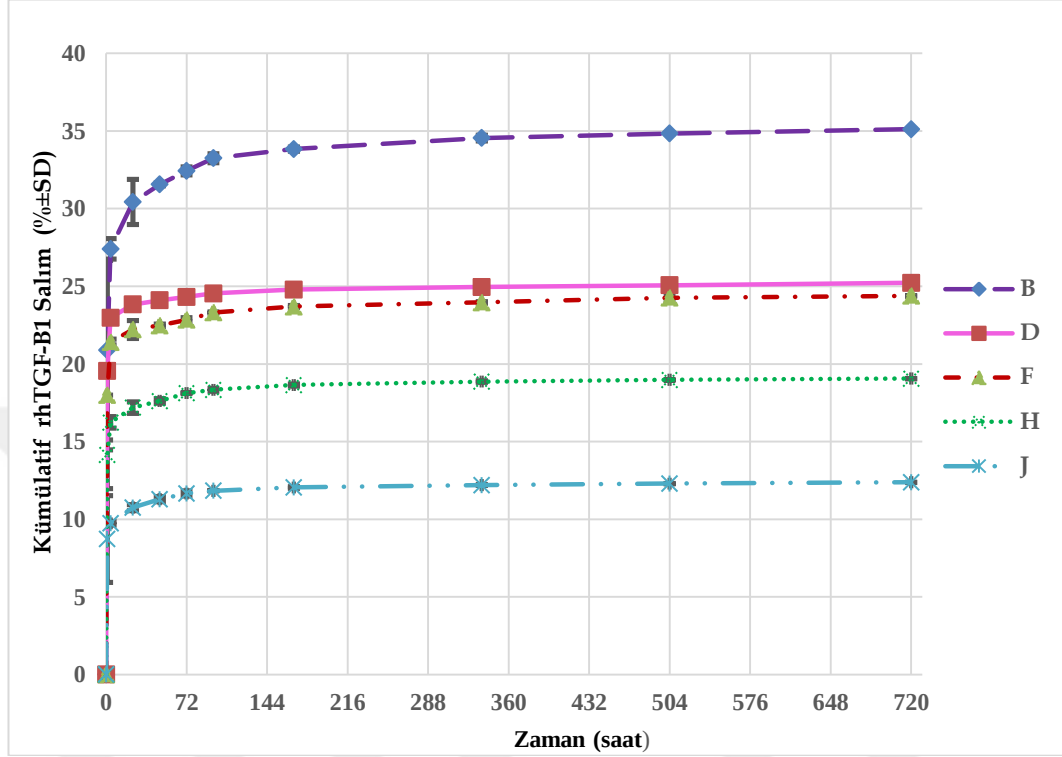


Şekil 35. TGF- β 1 içeren ve içermeyen PLGA nanopartiküllerin DSC analizi. Sırasıyla mavi renk F3, kırmızı renk E3, mor renk J3, sarı renk I3 kodlu nanopartikülleri temsil etmektedir. Yeşil renk ise PLGA (L:G) 50:50 polimerine aittir.

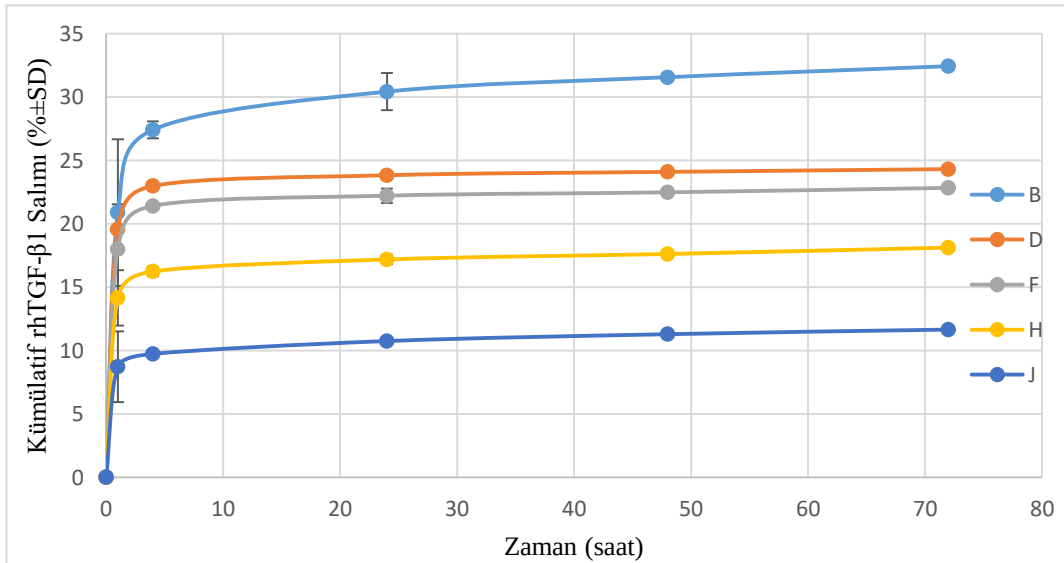
6.3.7. rhTGF- β 1 içeren PLGA nanopartiküllerin *in vitro* salım çalışmasına ait bulgular

In vitro salım çalışması 5.2.5.2.7'de ifade edildiği gibi yapılmış ve 30 gün devam ettirilmiştir. Salım çalışması ELISA kit kullanılarak belirlenmiştir. Bu yöntem ilgili proteini tanımlamak için oldukça spesifik ve hassastır. B, D, F, H ve J kodlu protein içeren nanopartikül formülasyonlarının ilaç salımı, **Şekil 36'** da gösterildiği gibi 30 günün sonunda sırasıyla % 35,11; % 25,22; % 24,38; % 19,06 ve %12,38 olarak elde edilmiştir. En düşük (% 8,72) patlama etkisi % 5 PLGA

konsantrasyonunda ve en yüksek oran ise (% 20,88) % 1'lik konsantrasyonda gözlemlenmiştir. Sırasıyla D, F ve H kodlu nanopartiküllerde patlama etkisi %19,55; %18 ve %14,15'tir.



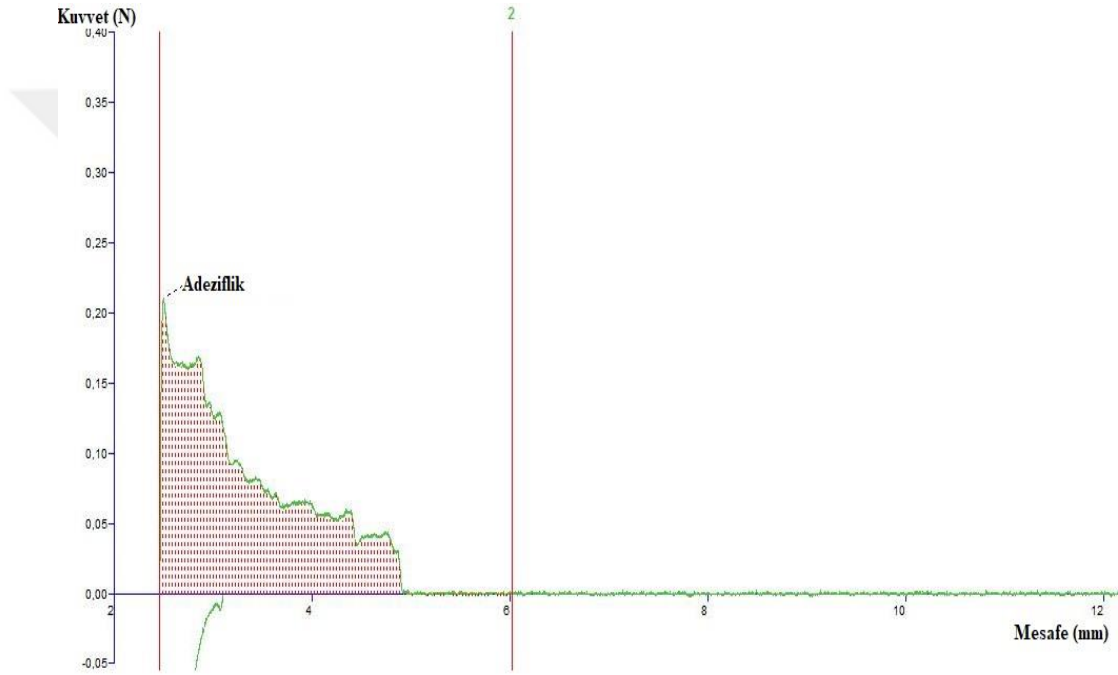
Şekil 36. rhTGF-β1 proteininin PLGA nanopartiküllerden salım grafiği. Her bir çalışma standard sapmalarıyla verilmiş olup n=3 paralelli çalışılmıştır, (PBS buffer, pH 7,4, 37°C).



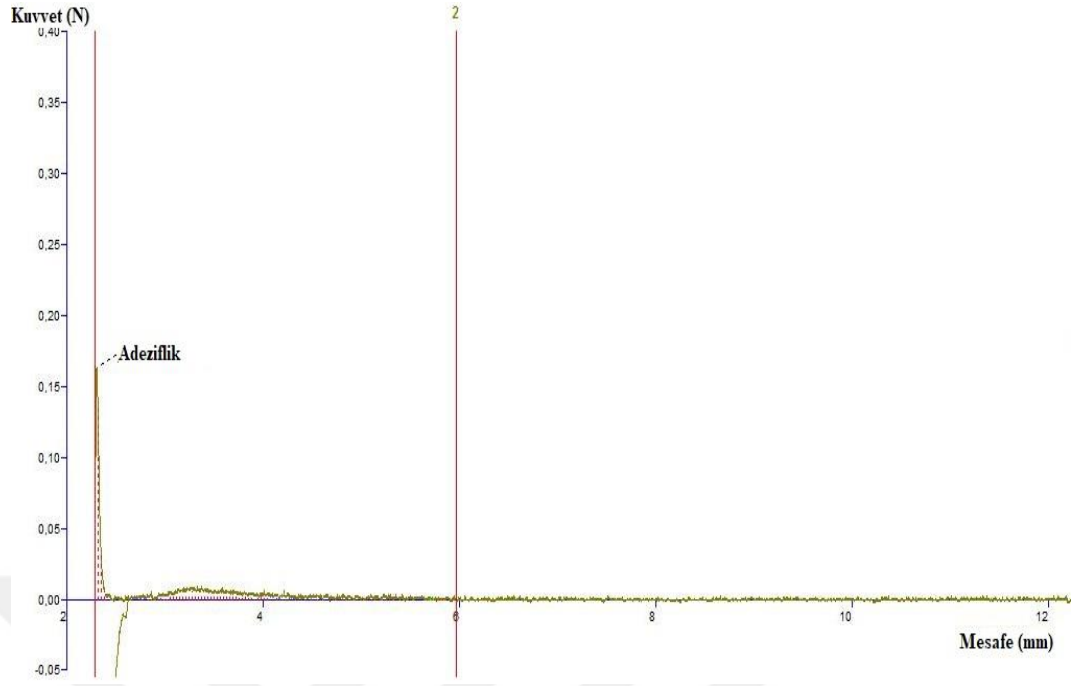
Şekil 36.1. rhTGF-β1 proteininin PLGA nanopartiküllerden 72 saatlik salım grafiği.

6.3.8. rhTGF- β 1 içeren PLGA nanopartiküllerin *in vitro* biyoadezyon analizlerine ait bulgular

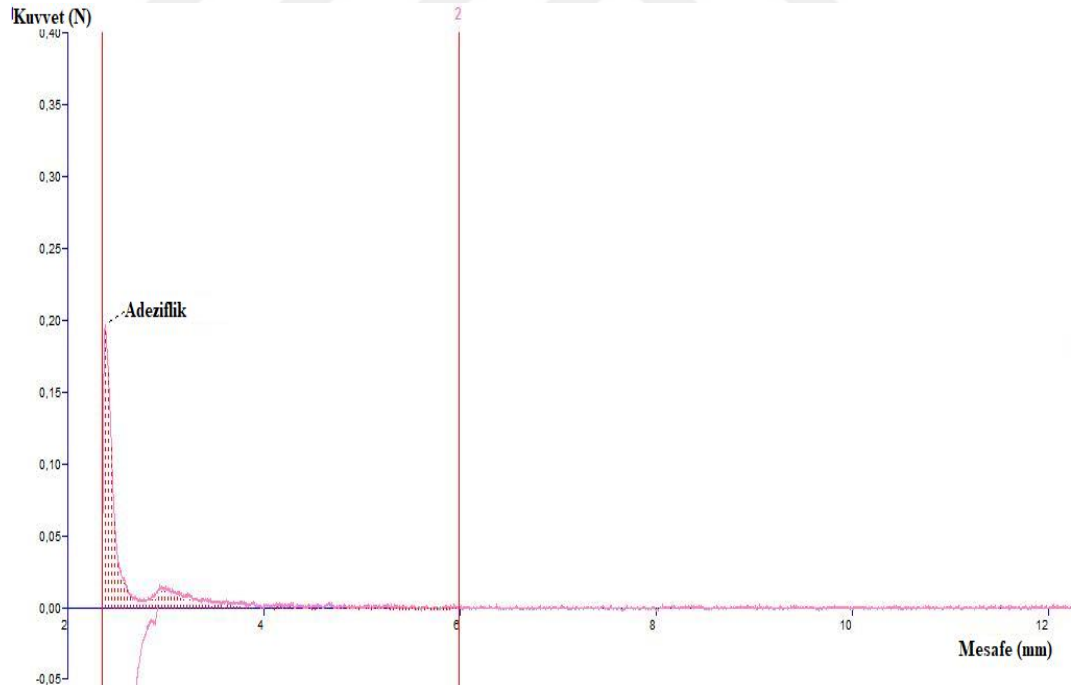
PLGA nanopartiküllerin *in vitro* biyoadezyon çalışması 5.2.5.2.8'deki yöntemine uygun olarak yapılmıştır. Nanopartiküllerin biyoadezyon değerleri sırasıyla B kodlu $0,11 \pm 0,13$; D kodlu $0,19 \pm 0,03$; F kodlu $0,12 \pm 0,08$; H kodlu $0,17 \pm 0,02$ ve J kodlu nanopartiküllerin $0,12 \pm 0,03$ mJ/cm² 'dir (**Tablo 13**). Ayrıca her formülasyonun n=3 paraleli olarak *in vitro* biyoadezyon grafikleri **Şekil 37, 38, 39, 40, 41, 42, 43, 44, 45, 46, 47, 50, 51**'da verilmiştir.



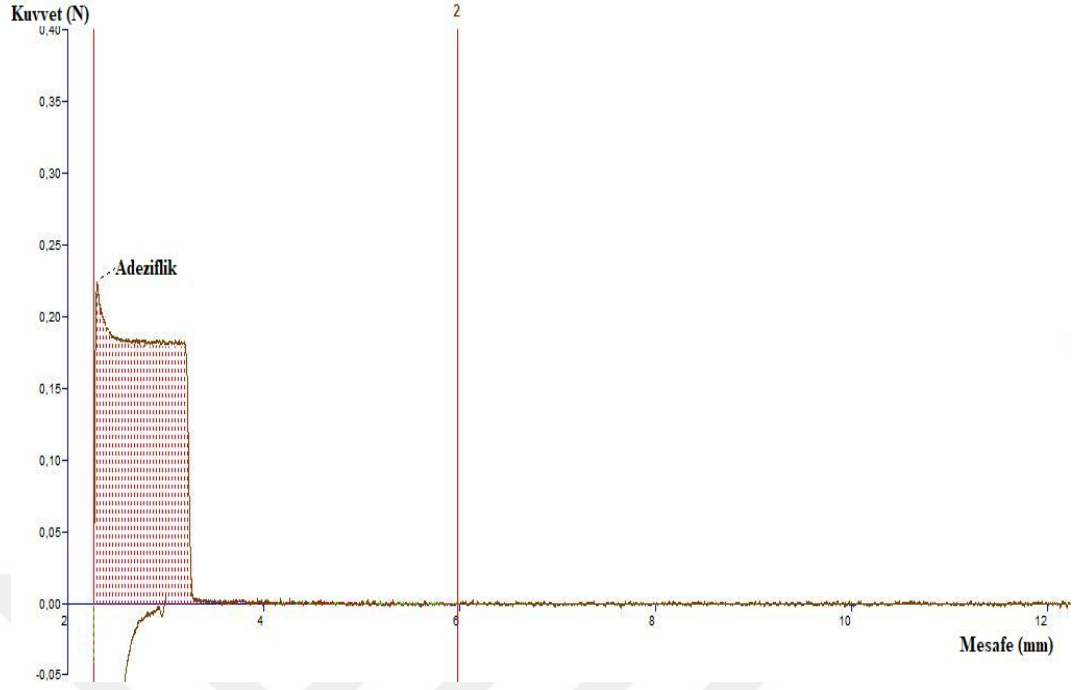
Şekil 37. B1 kodlu PLGA nanopartikülün *in vitro* biyoadezyon grafiği.



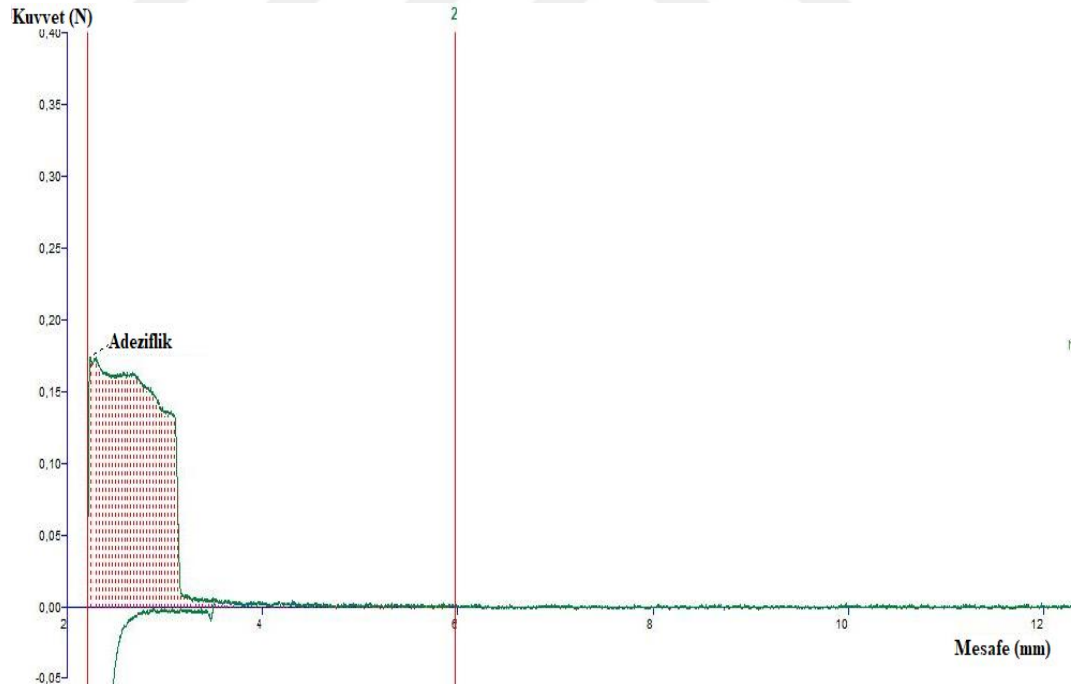
Şekil 38. B2 kodlu PLGA nanopartikülün *in vitro* biyoadezyon grafiği.



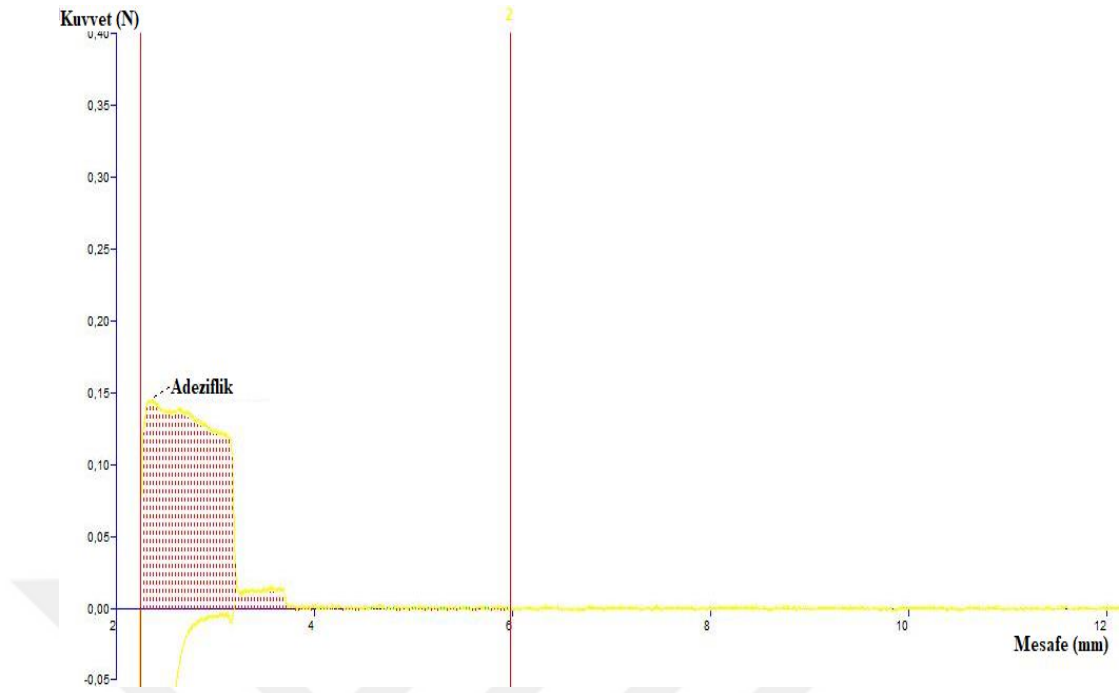
Şekil 39. B3 kodlu PLGA nanopartikülün *in vitro* biyoadezyon grafiği.



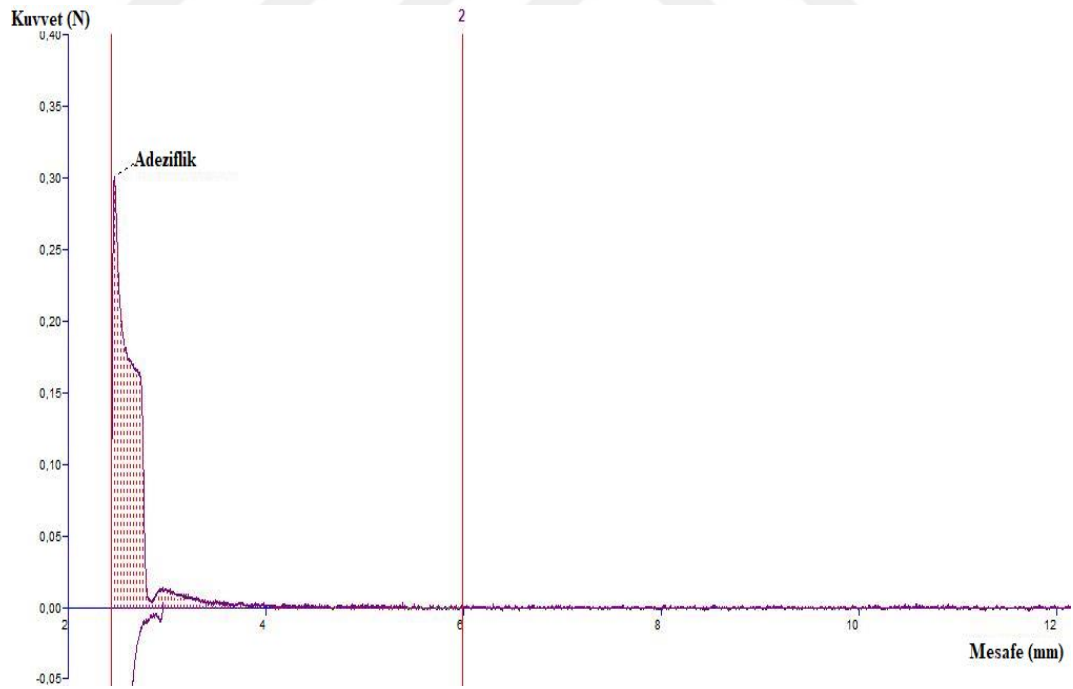
Şekil 40. D1 kodlu PLGA nanopartikülün *in vitro* biyoadezyon grafiği.



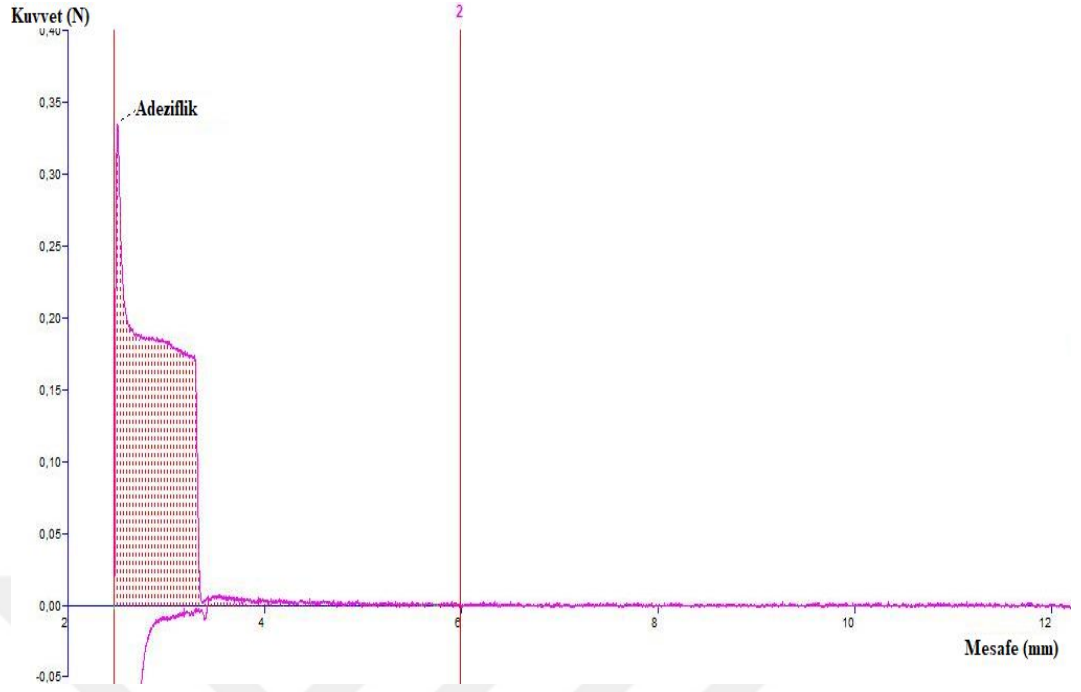
Şekil 41. D2 kodlu PLGA nanopartikülün *in vitro* biyoadezyon grafiği.



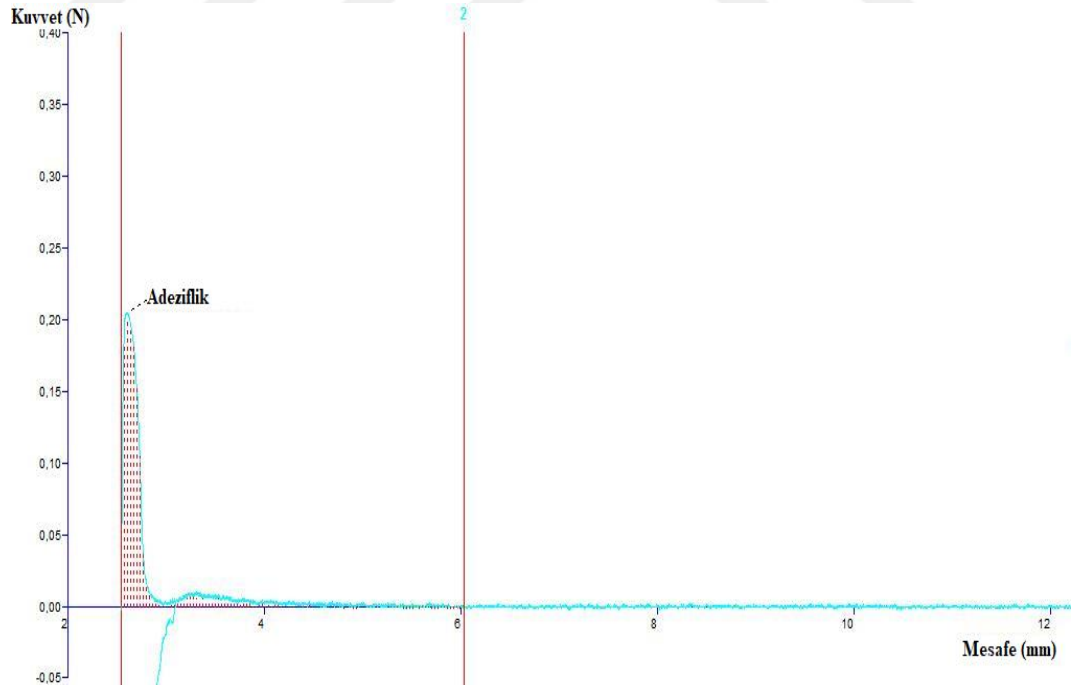
Şekil 42. D3 kodlu PLGA nanopartikülün *in vitro* biyoadesyon grafiği.



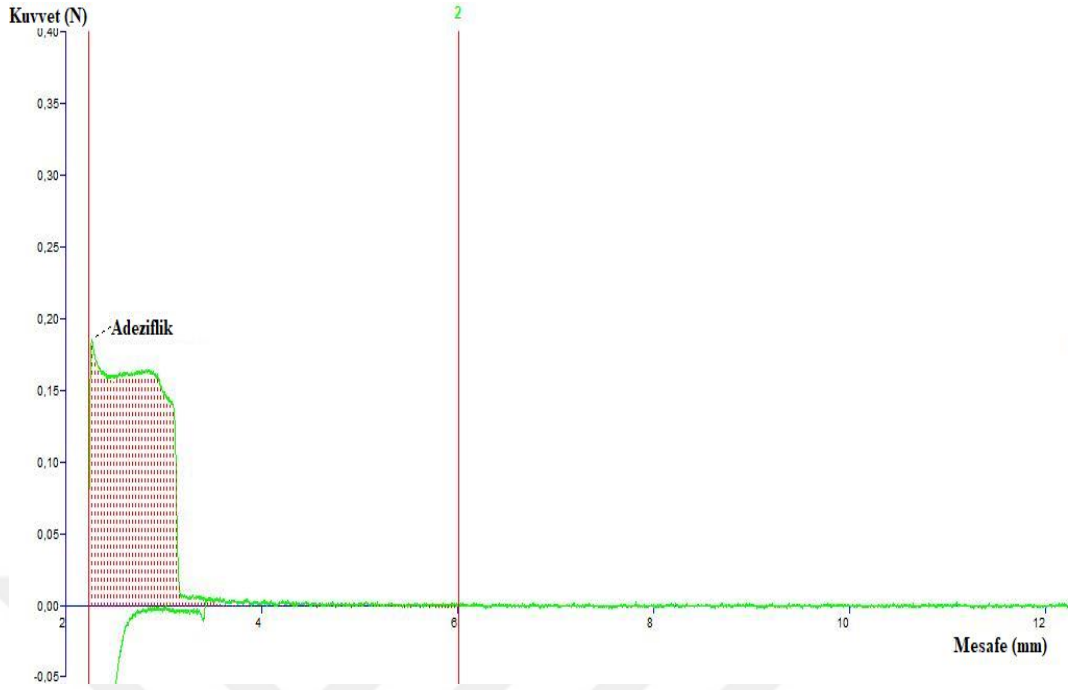
Şekil 43. F1 kodlu PLGA nanopartikülün *in vitro* biyoadesyon grafiği.



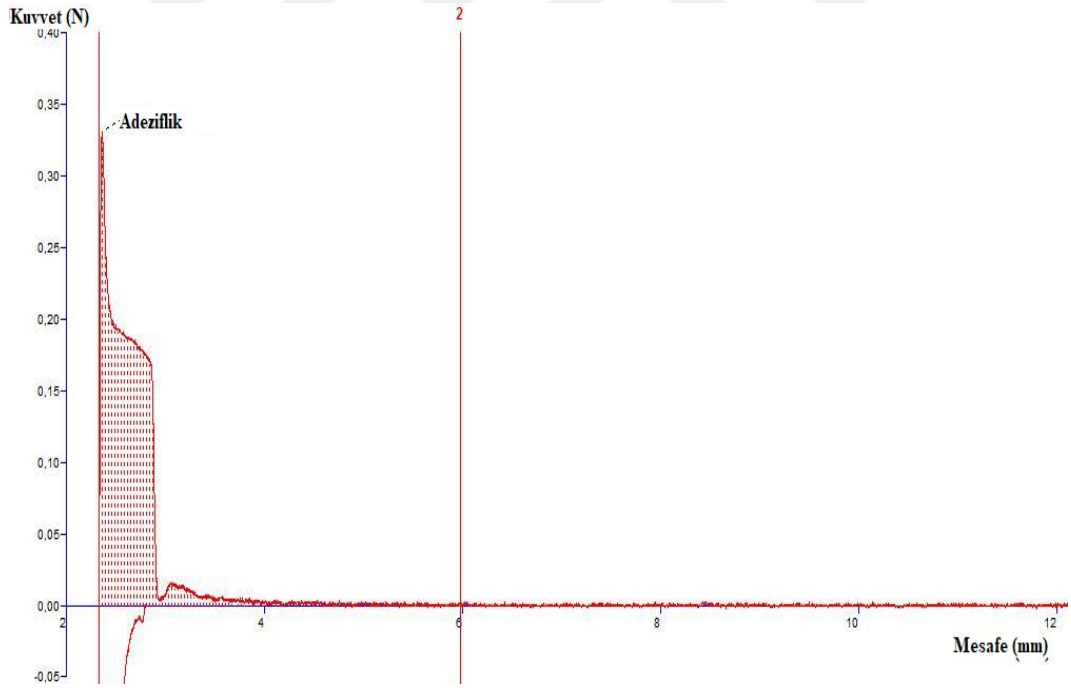
Şekil 44. F2 kodlu PLGA nanopartikülün *in vitro* biyoadezyon grafiği.



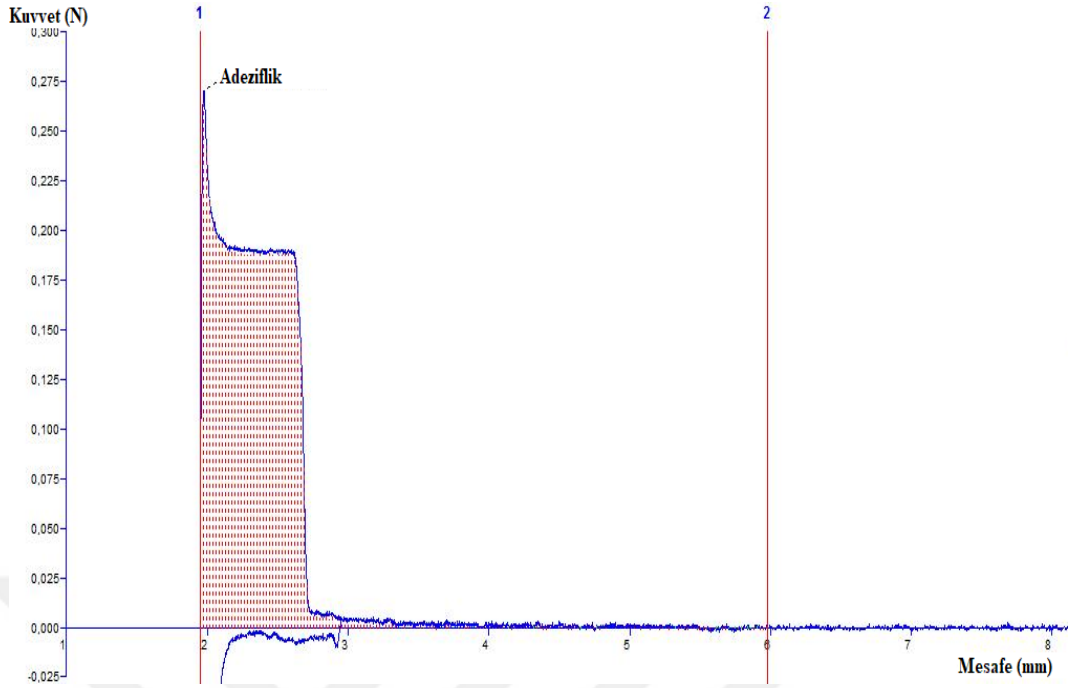
Şekil 45. F3 kodlu PLGA nanopartikülün *in vitro* biyoadezyon grafiği.



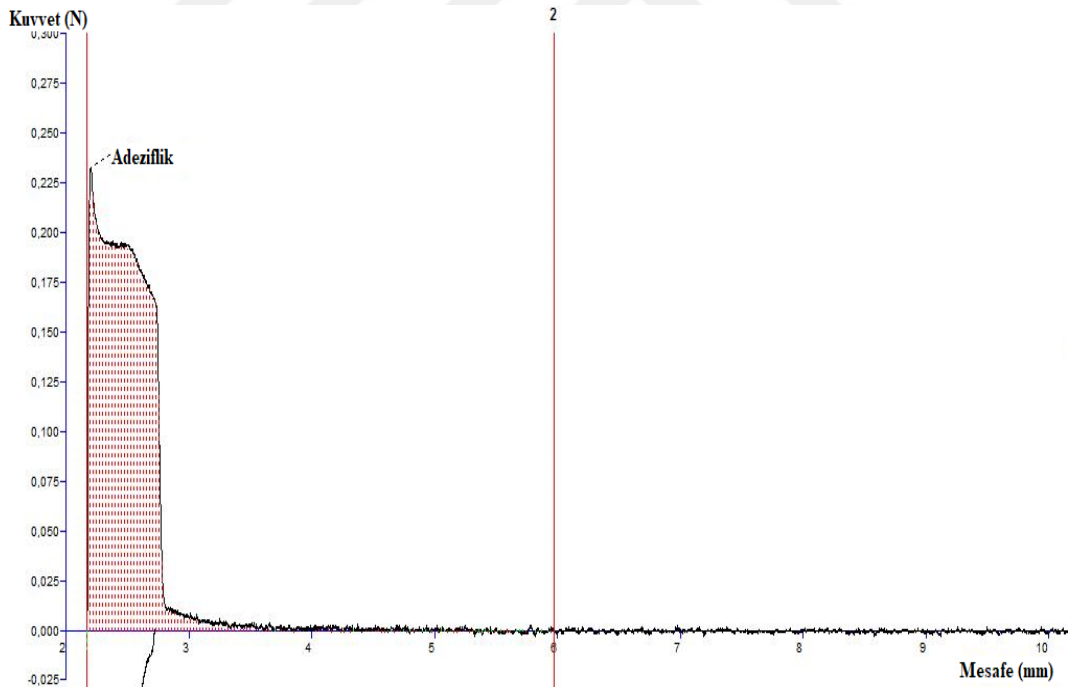
Şekil 46. H1 kodlu PLGA nanopartikülün *in vitro* biyoadezyon grafiği.



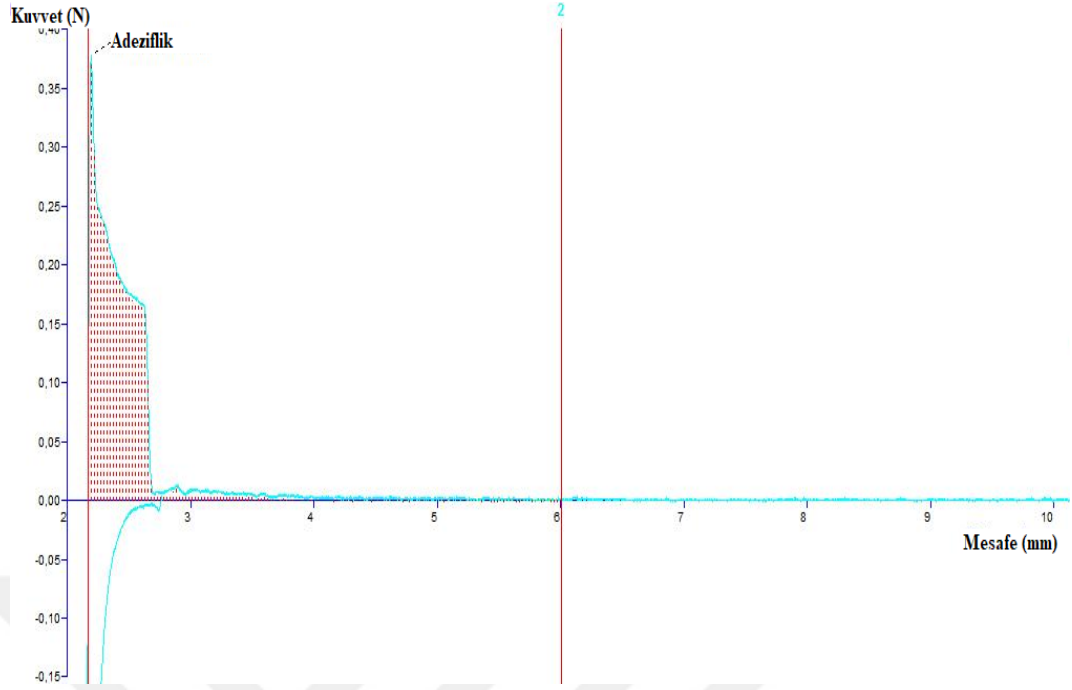
Şekil 47. H2 kodlu PLGA nanopartikülün *in vitro* biyoadezyon grafiği.



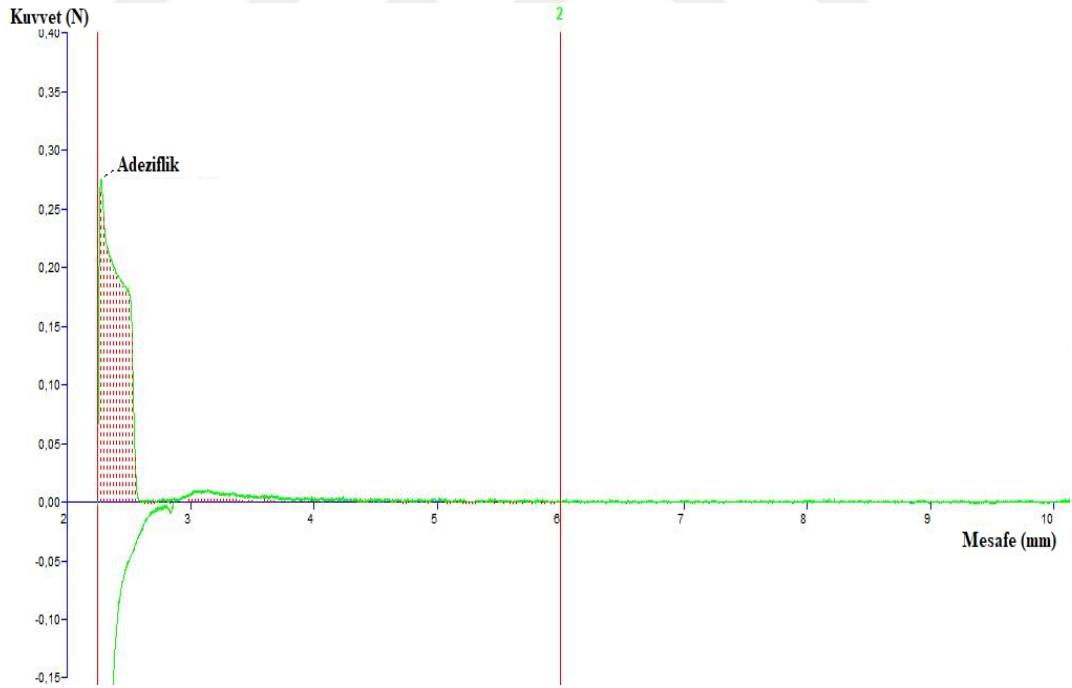
Şekil 48. H3 kodlu PLGA nanopartikülün *in vitro* biyoadezyon grafiği.



Şekil 49. J1 kodlu PLGA nanopartikülün *in vitro* biyoadezyon grafiği.



Şekil 50. J2 kodlu PLGA nanopartikülün *in vitro* biyoadezyon grafiği.



Şekil 51. J3 kodlu PLGA nanopartikülün *in vitro* biyoadezyon grafiği.

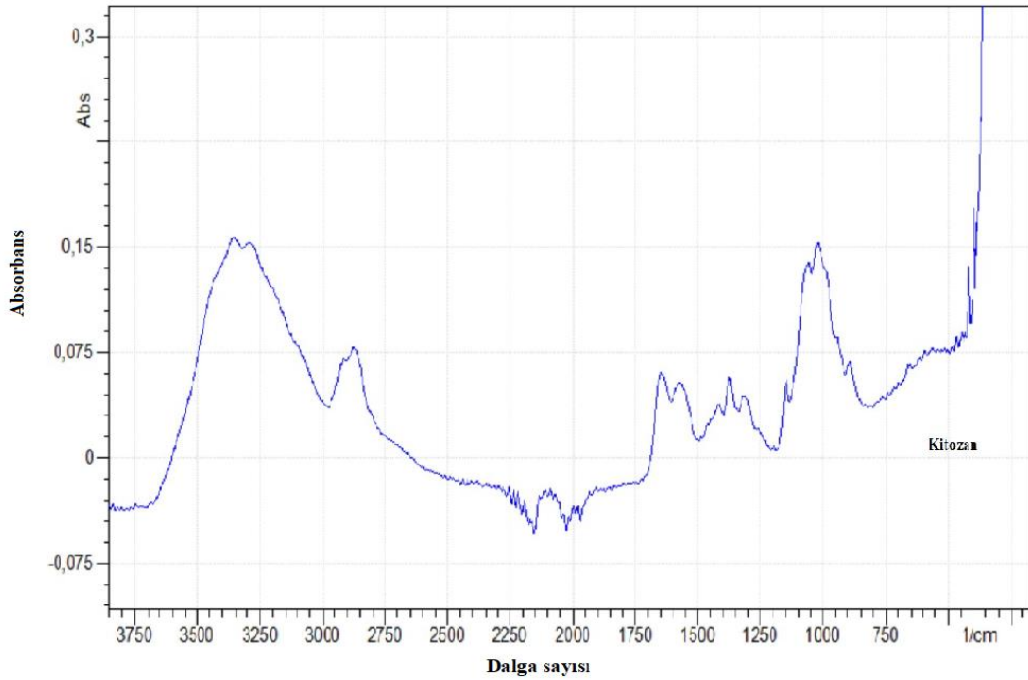
6.4. PVA/Kitozan Hidrojellerin Hazırlanması ve Karakterizasyonuna Ait Bulgular

6.4.1. PVA/Kitozan hidrojenlerin fourier dönüşümlü kızılötesi spektroskopisine (FT-IR) ait bulgular

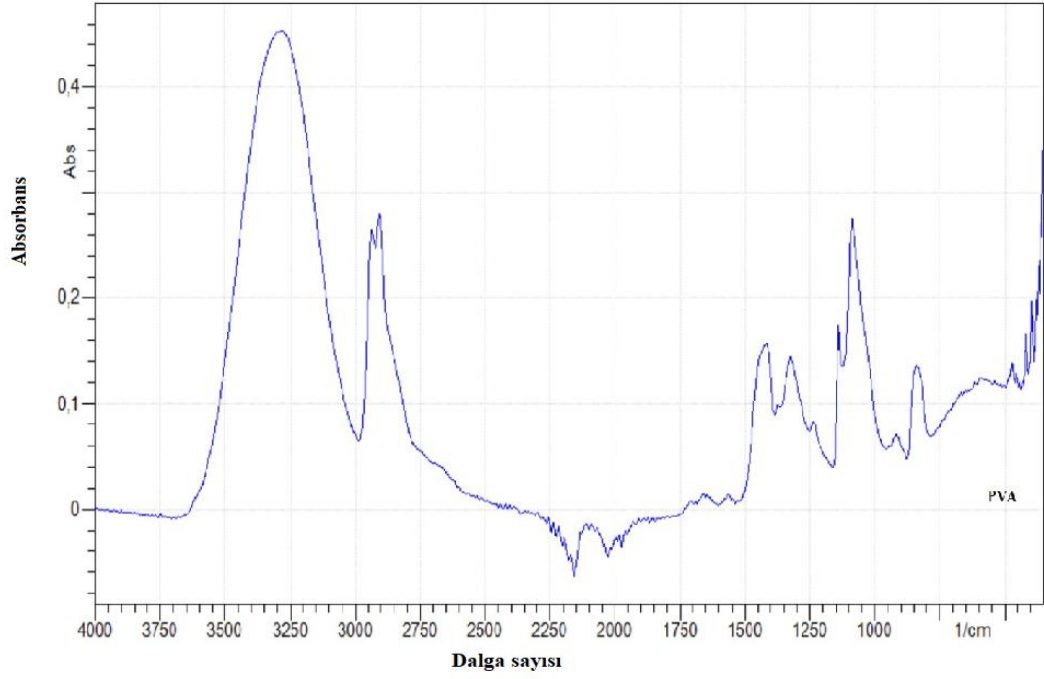
Hazırlanan PVA/Kitozan hidrojenlerde 5.2.6.2.1’de ifade edildiği gibi yapısal kontrolleri için FT-IR analizleri yapılmıştır. **Şekil 52**’de kitozanın FT-IR spektrumu gösterilmiştir. 1475-1445 cm^{-1} ’deki epik aralığı, C-H grubu için karakteristiktir. 1645 cm^{-1} ’teki absorpsiyon piklerinin amin grubundaki karbonil grupları ($-\text{C} = \text{O}$) olduğunu göstermiştir. 1020-1070 cm^{-1} ’deki geniş pik, CH’deki C = O gerilme titreşimini göstermektedir. 1151 cm^{-1} ’deki tepe noktası glikozidik bağlantıdaki $-\text{C}-\text{O}-\text{C}$ grubunun karakteristik noktasıdır.

Şekil 53’de PVA polimerinin FT-IR spektrumu gösterilmiştir. Burada, serbest alkol için tipik güçlü hidroksil bantları ($\nu = 3450-3225 \text{ cm}^{-1}$ ’de bağlanmamış $-\text{OH}$ germe bandı) ile birlikte bir C – H geniş alkil gerim bandı ($\nu = 2855-3000 \text{ cm}^{-1}$) gözlenmiştir. Saf PVA’da C-O’nun 1125-1080 cm^{-1} ’de gerinimi gösterilmiştir.

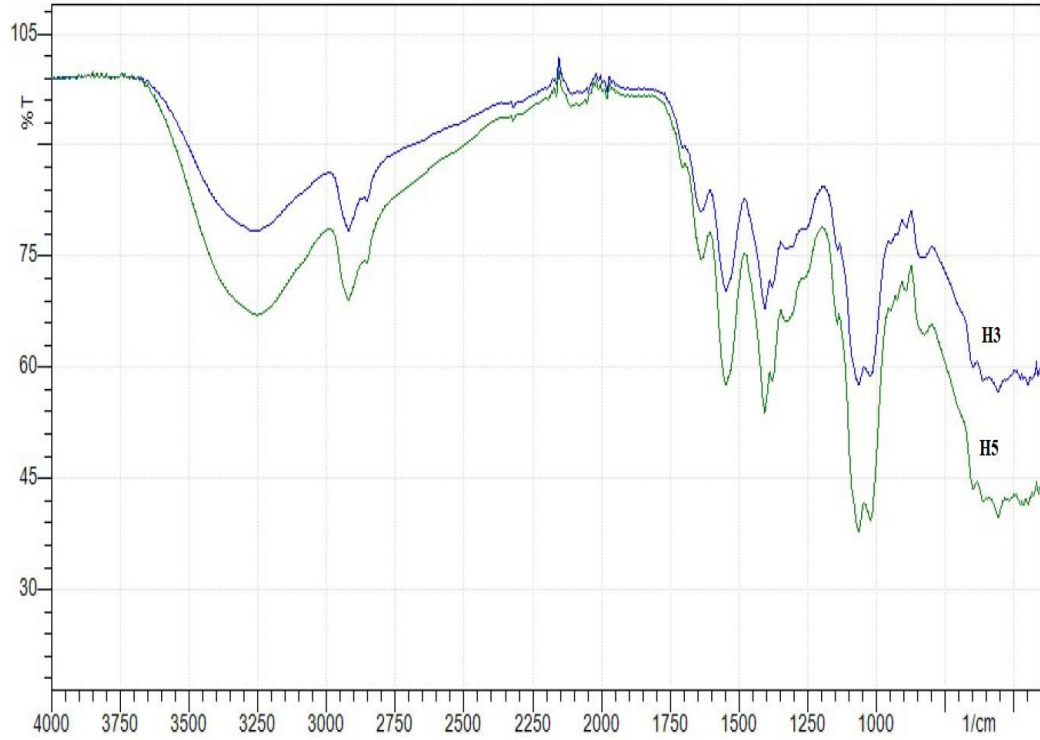
Şekil 54’de sentezlenmiş PVA/Kitozan hidrojenli H3 ve PLGA nanopartikül yüklü hidrojenli H5’in FT-IR spektrumu değerlendirilmiştir.



Şekil 52. Kitozan (orta moleküler ağırlıklı) polimerin fourier dönüşümlü kızılötesi spektroskopisi.



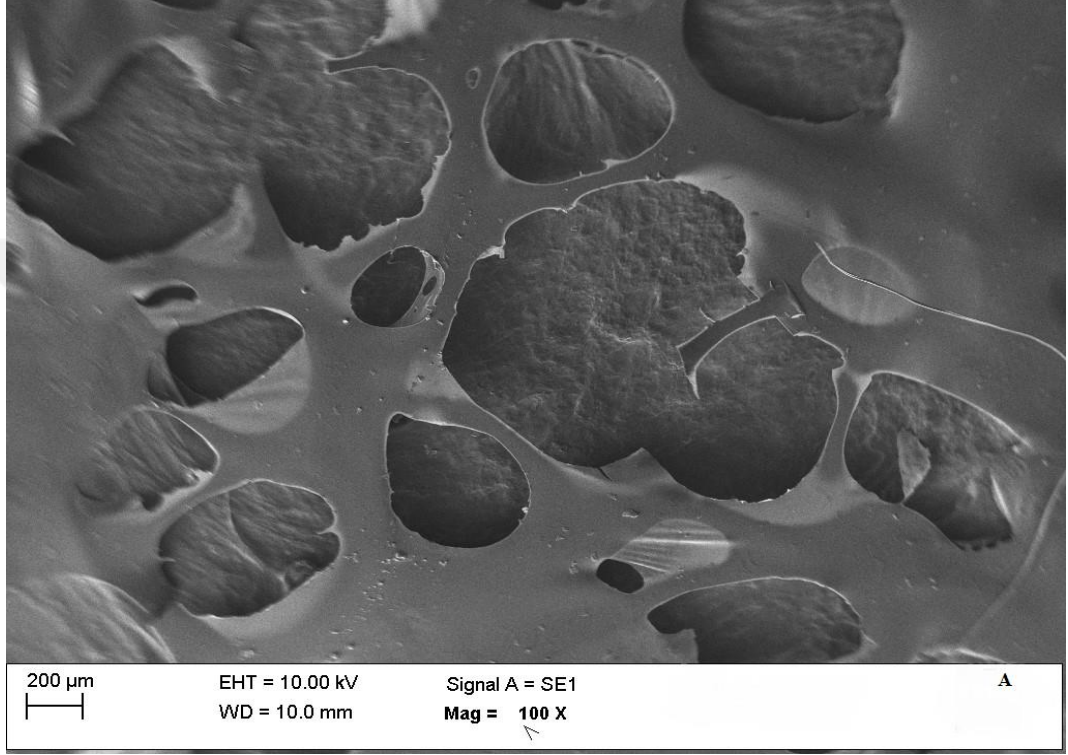
Şekil 53. PVA polimerinin fourier dönüşümlü kızılötesi spektroskopisi.



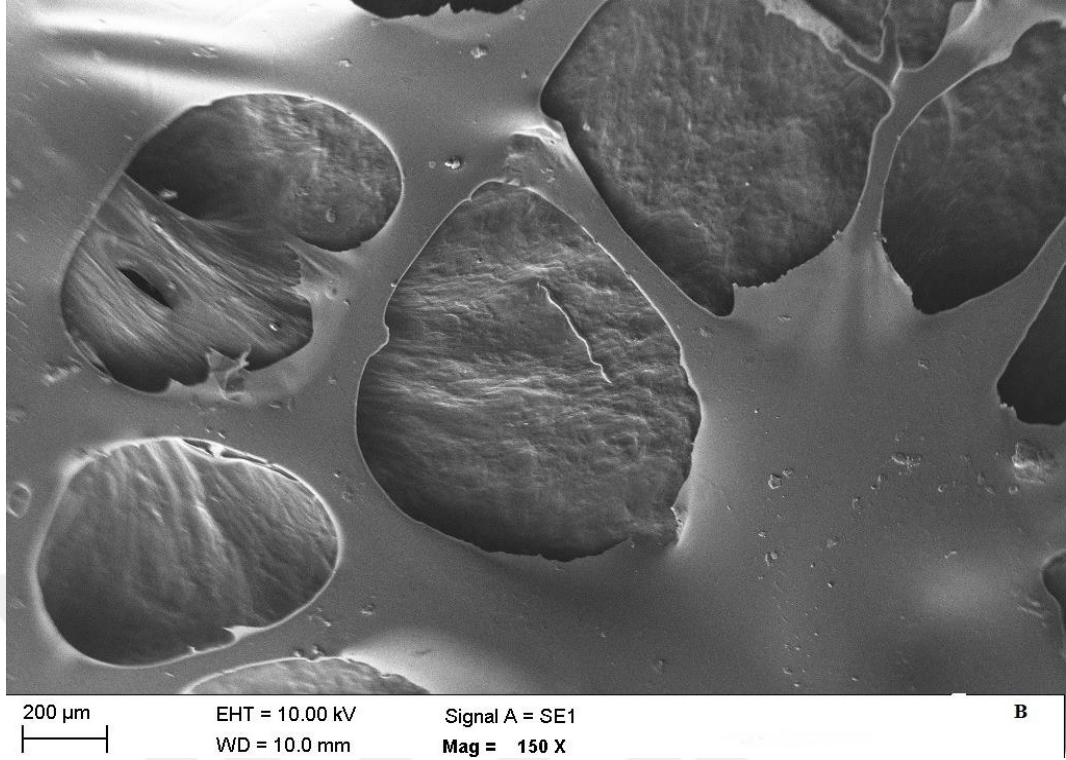
Şekil 54. PVA/Kitozan hidrojellerden H3_3 ve H5_3 formülasyonlarının fourier dönüşümlü kızılötesi spektroskopisi.

6.4.2. Hazırlanan PVA/Kitozan hidrojellerin morfolojik incelemesi

Hazırlanan PVA/Kitozan hidrojellerin taramalı elektron mikroskop görüntüleri 5.2.6.3.2’de belirtilen yöntemle yapılmıştır. Kitozan ve PVA ile hazırlanan çapraz bağlı hidrojellerin yoğun ağ yapısına sahip görüntüler elde edilmiştir.



Resim 5. H3_3 kodlu hidrojel formülasyonunun yüzey SEM görüntüsü (x100).



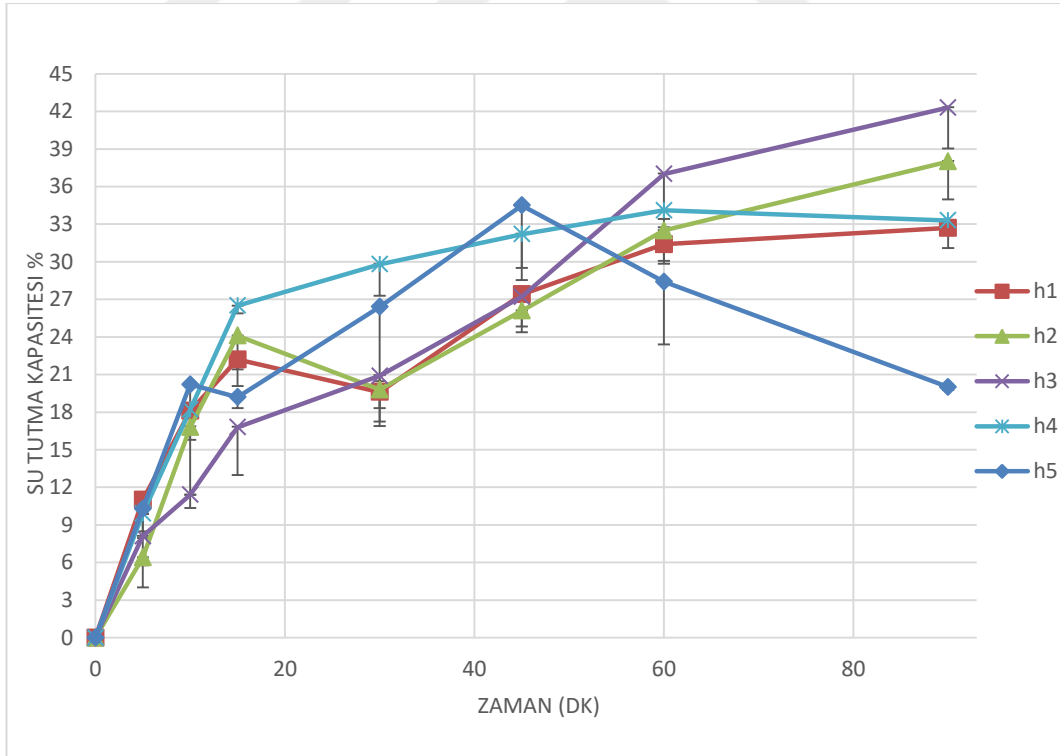
Resim 6. H5_3 hidrojel formülasyonunun yüzey SEM görüntüsü (x150).

6.4.3. PVA/Kitozan hidrojellerin su tutma kapasitesine ait bulgular

5.2.6.3.3’ de belirtilen şekilde hidrojellerin su tutuma kapasitesi analiz edilmiştir. Her hidrojel formülasyonu için su tutma kapasitesi üç kez çalışılmıştır. En yüksek PVA oranına sahip H3 formülasyonu, en yüksek su tutma kapasitesine sahip olduğu saptanmıştır. PLGA nanopartiküllerin topikal uygulaması ve tedavide taşıyıcı sistem etkinliği için H5 formülasyonu oluşturulmuştur. Mekanik ve biyoadezif özellikler açısından optimize olan H3 hidrojel formülasyonuna, F3 kodlu PLGA nanopartikülün eklenerek hazırlanmıştır. **Tablo 14**’de 90 dakikanın sonundaki su tutma kapasiteleri verilmiştir. **Şekil 53**’de % su tutma oranları standart sapmaları ile belirtilmiştir.

Tablo 14. PVA/Kitozan hidrojenlerin su tutma kapasitesi (n=3).

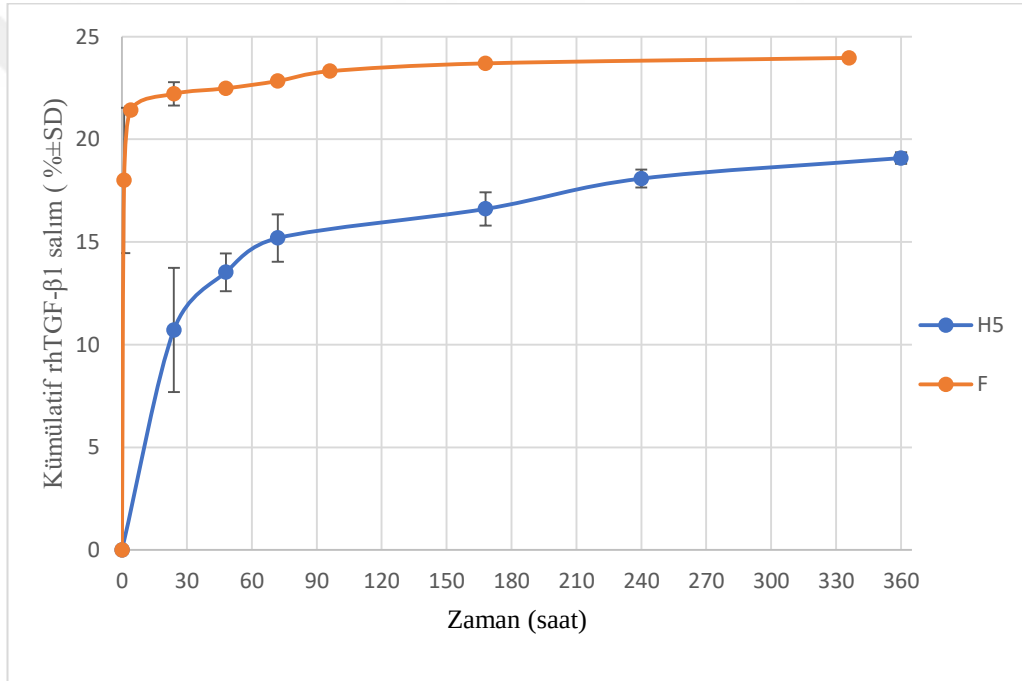
Formülasyon kodları	I (g)	II(g)	III(g)	Ortalama su tutma kapasitesi (g±SS)	Su tutma yüzdesi %
H1	0,322	0,309	0,351	0,327 ± 0,022	32,7
H2	0,351	0,428	0,361	0,380 ± 0,04	38
H3	0,465	0,432	0,373	0,424 ± 0,05	42,3
H4	0,345	0,325	0,330	0,333 ± 0,01	33,3
H5	0,203	0,200	0,198	0,200 ± 0,00	20



Şekil 55. PVA/Kitozan hidrojenlerin zamana bağlı su tutma yüzdeleri (PBS pH:7,4, 25 °C).

6.4.4. PVA/Kitozan hidrojenlerin *in vitro* salım çalışmalarına ait bulgular

5.2.6.3.4'te belirtilen yöntem ile H5 kodlu hidrojenlerin üç tekrarlı bir şekilde *in vitro* salım çalışması yapılmıştır. İlk 24 saat içinde PLGA nanopartikül içeren hidrojenlerden salınan protein miktarı $10,714 \pm 3,02$ 'dir. 24 saat içinde F formülasyonundan protein salımı ise $22,22 \pm 0,57$ gerçekleşmiştir (**Şekil 56**). Hidrojen içerisine hapsedilen nanopartikülün patlama etkisi ve uzatılmış salım çalışması açısından F nanopartiküle kıyasla anlamlı bir farklılık göstermiştir ($p < 0,05$). 15 günün sonunda elde edilen verilerin sonucuna göre H5 hidrojen formülasyonu rhTGF- $\beta 1$ 'in $19,08 \pm 0,29$ 'unun salımını sağlamıştır.



Şekil 56. rhTGF- $\beta 1$ proteinin F kodlu nanopartikülden ve H5 kodlu hidrojenlerden salım grafiğı. Her bir çalışma standard sapmalarıyla verilmiş olup $n=3$ paralelli çalışılmıştır (PBS buffer, pH 7,4, 37°C). H5 (F3 PLGA np içeren H3 PVA/Kitozan hidrojen).

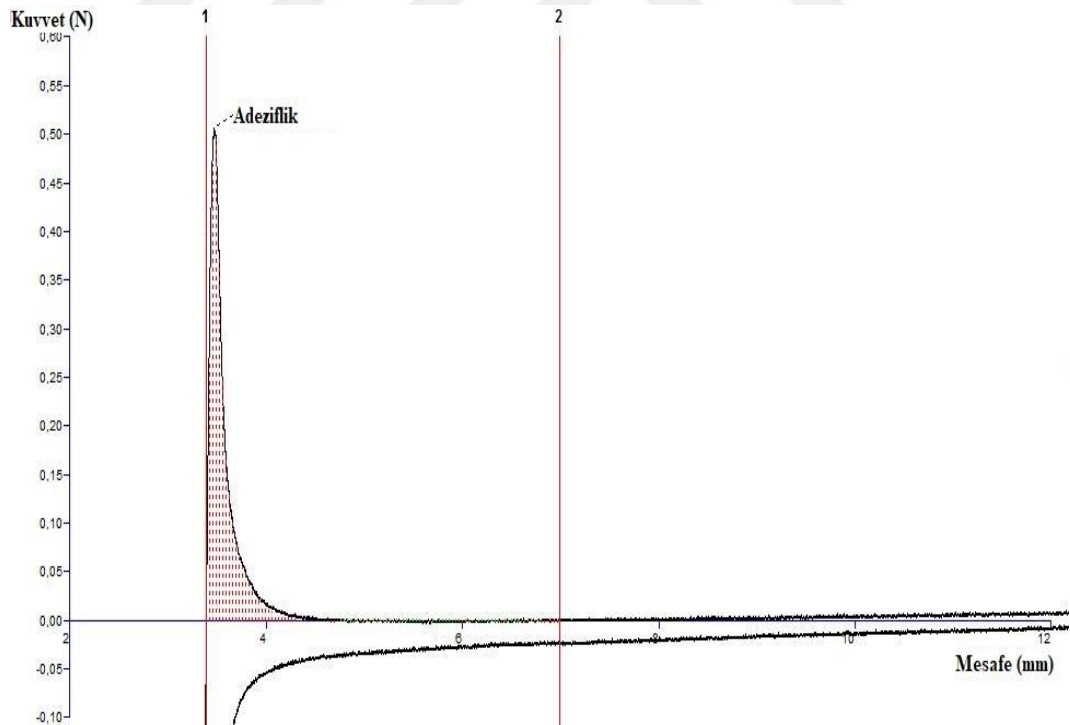
6.4.5. PVA/Kitozan hidrojenlerin *in vitro* biyoadezyon çalışmalarına ait bulgular

5.2.6.3.5'de belirtilen yöntemle göre çalışma gerçekleştirilmiştir. Tavuk derisi ile biyoadezyon çalışmalarında beş hidrojen formülasyonu çalışılmıştır. **Tablo 15**'de belirtildiğı gibi formülasyonlardan en yüksek biyoadezyon kapasitesine sahip formülasyon H3 ve onun nanopartikül içeren formu H5 formülasyonudur. Artan PVA konsantrasyonu biyoadezyon özelliğinde de artış sağlamıştır. Formülasyonların

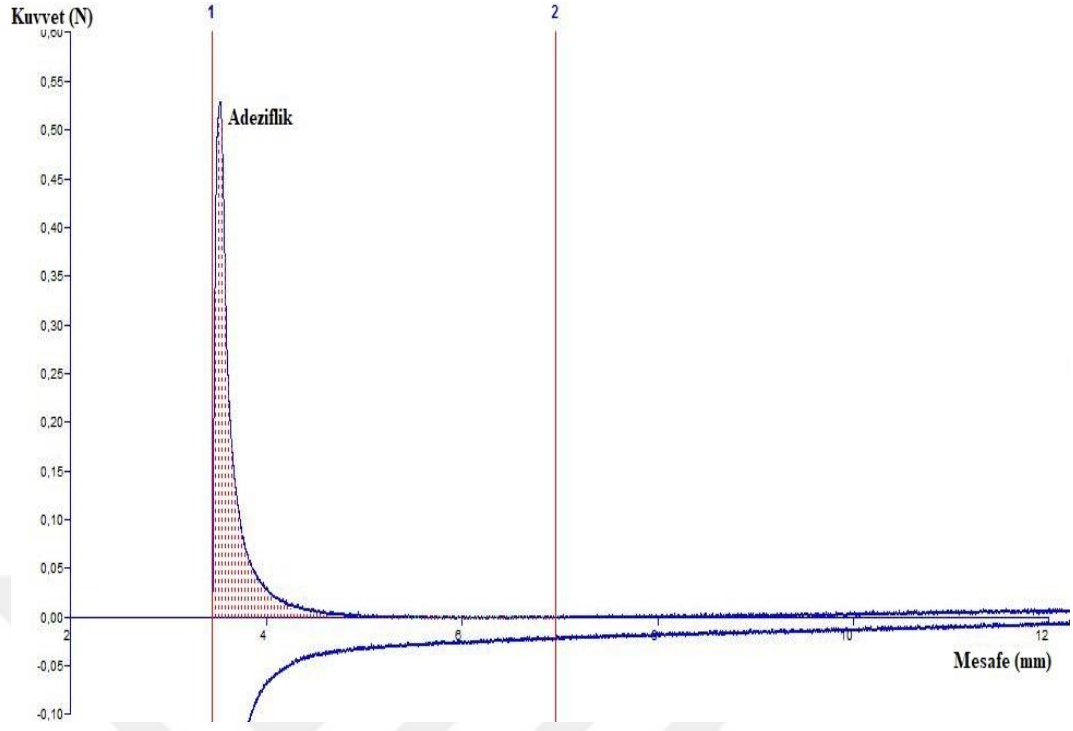
biyoadezyon grafikleri her bir jel formülasyonu için Şekil 57, 58, 59, 60, 61, 62, 63, 64, 65, 66, 67, 68, 69, 70 ve 71’de belirtilmiştir.

Tablo 15. PVA/Kitozan hidrojenlerin *in vitro* biyoadezyon ve viskozite ölçüm sonuçları.

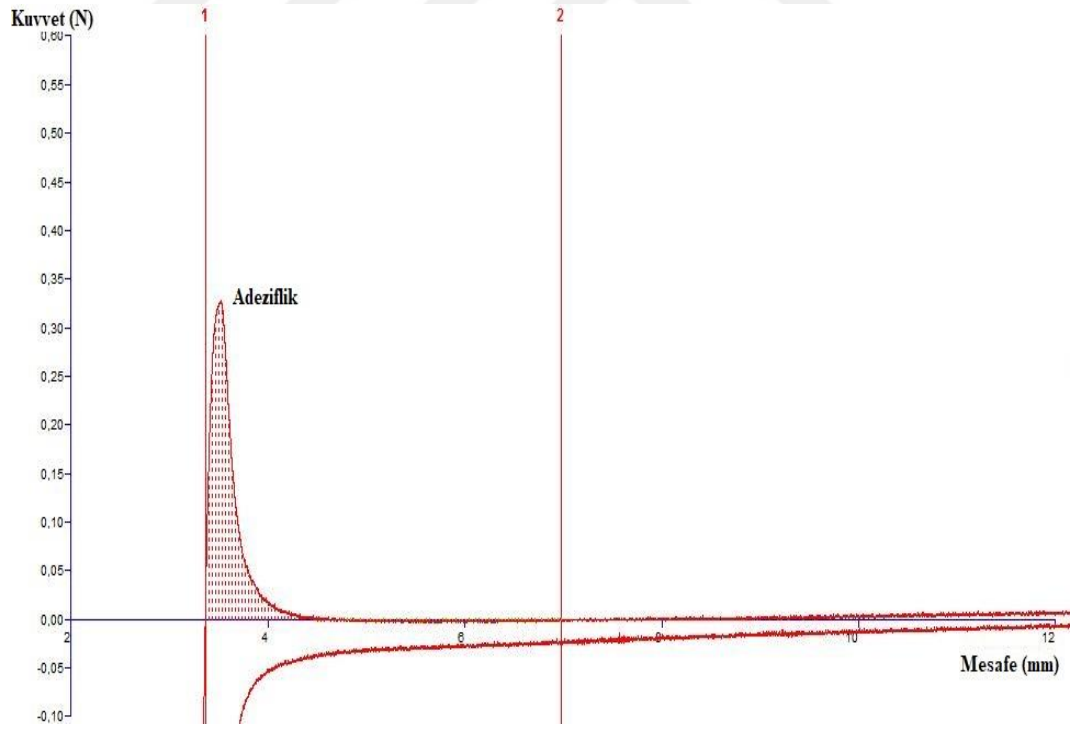
Formülasyon Kodları	<i>In vitro</i> biyoadezyon çalışması ($\text{mJ}/\text{cm}^2 \pm \text{SD}$)	Viskozite ($\text{cps} \pm \text{SD}$)
H1	$0,072 \pm 0,007$	$6766,7 \pm 450,8$
H2	$0,218 \pm 0,011$	$8196,7 \pm 57,7$
H3	$0,509 \pm 0,032$	$21300,0 \pm 5208,4$
H4	$0,430 \pm 0,045$	$15233,3 \pm 1615,0$
H5	$0,547 \pm 0,010$	$19433 \pm 0,365$



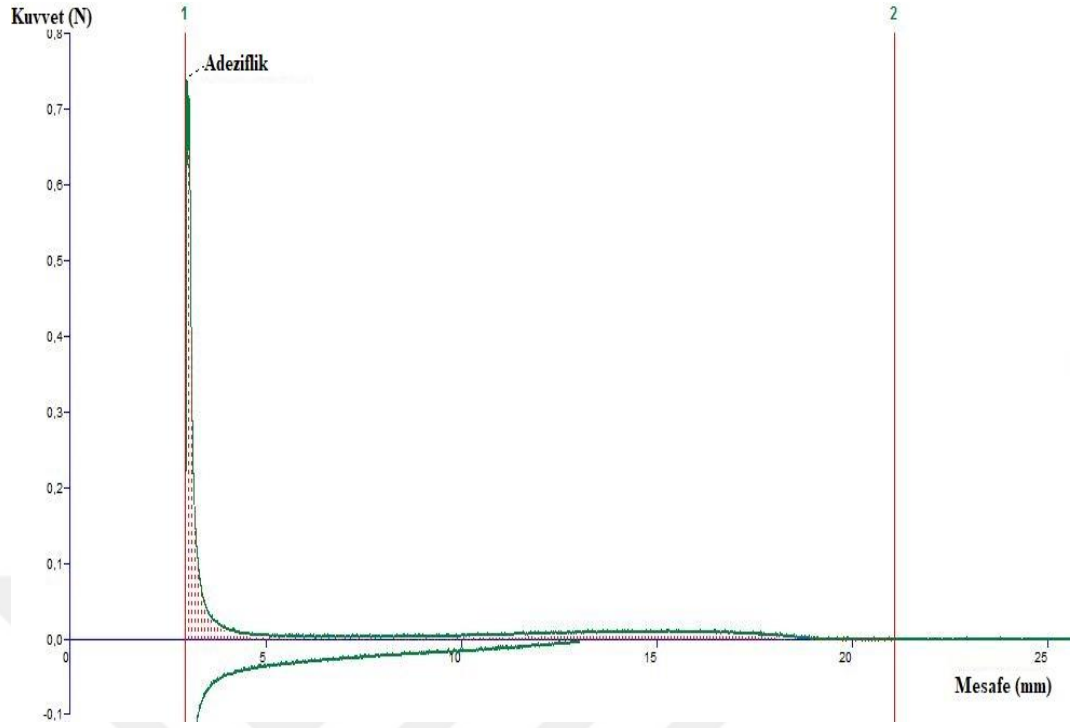
Şekil 57. H1_1 kodlu PVA/Kitozan hidrojel formülasyonunun *in vitro* biyoadezyon grafiği.



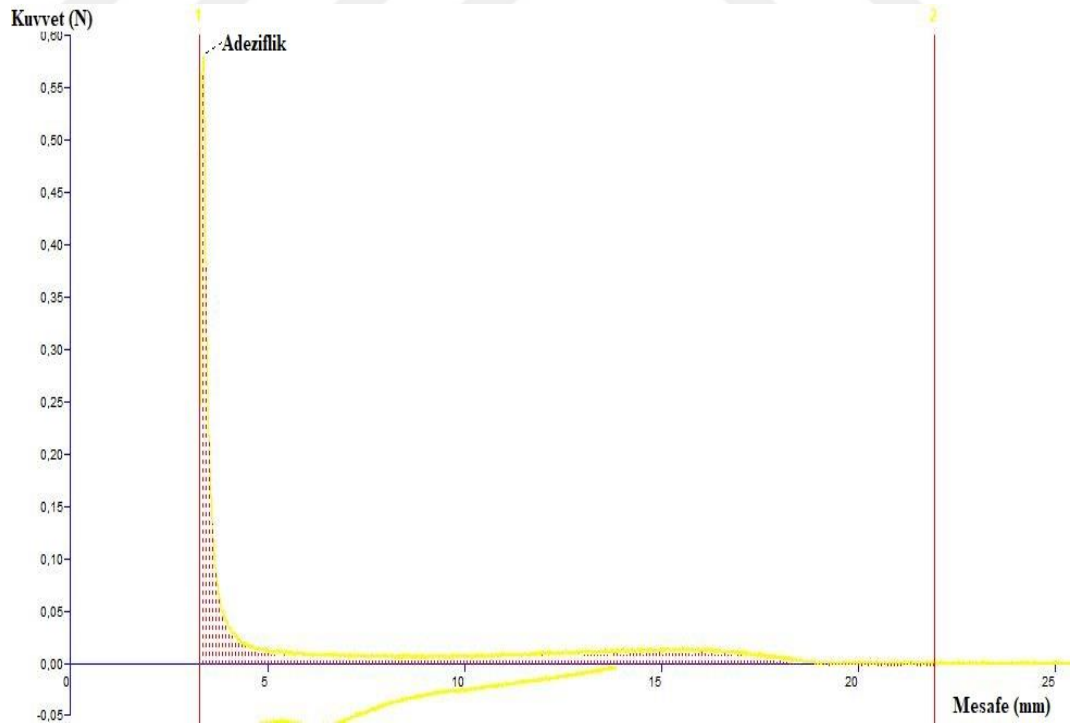
Şekil 58. H1_2 kodlu PVA/Kitozan hidrojel formülasyonunun *in vitro* biyoadezyon grafiği.



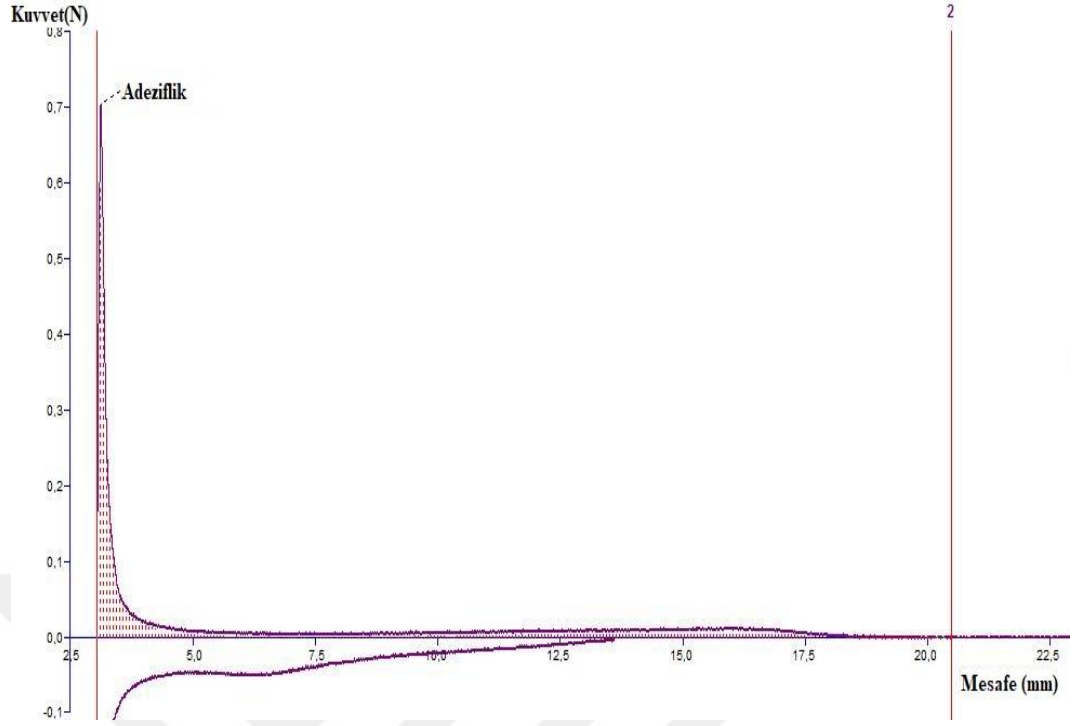
Şekil 59. H1_3 kodlu PVA/Kitozan hidrojel formülasyonunun *in vitro* biyoadezyon grafiği.



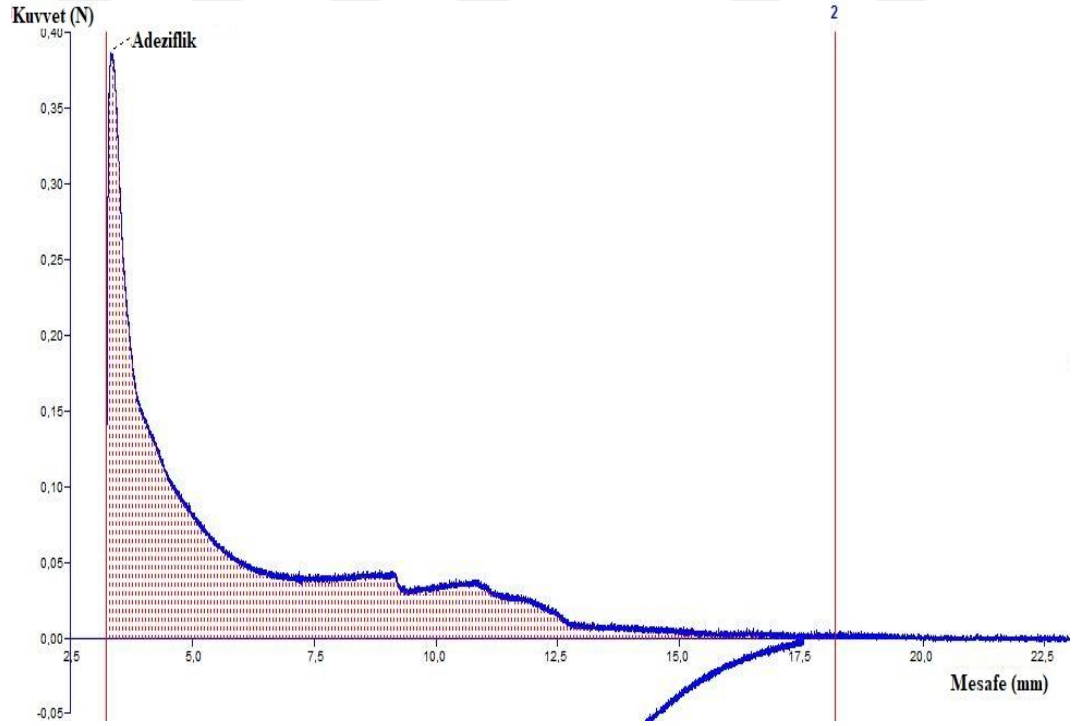
Şekil 60. H2_1 kodlu PVA/Kitozan hidrojel formülasyonunun *in vitro* biyoadezyon grafiği.



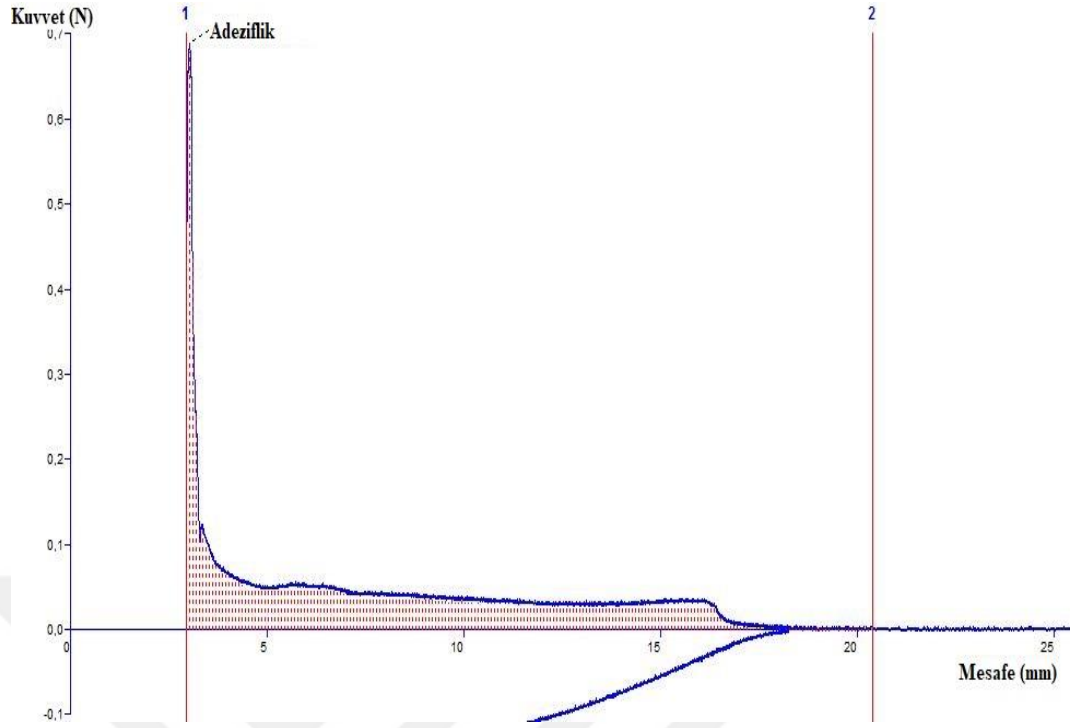
Şekil 61. H2_2 kodlu PVA/Kitozan hidrojel formülasyonunun *in vitro* biyoadezyon grafiği.



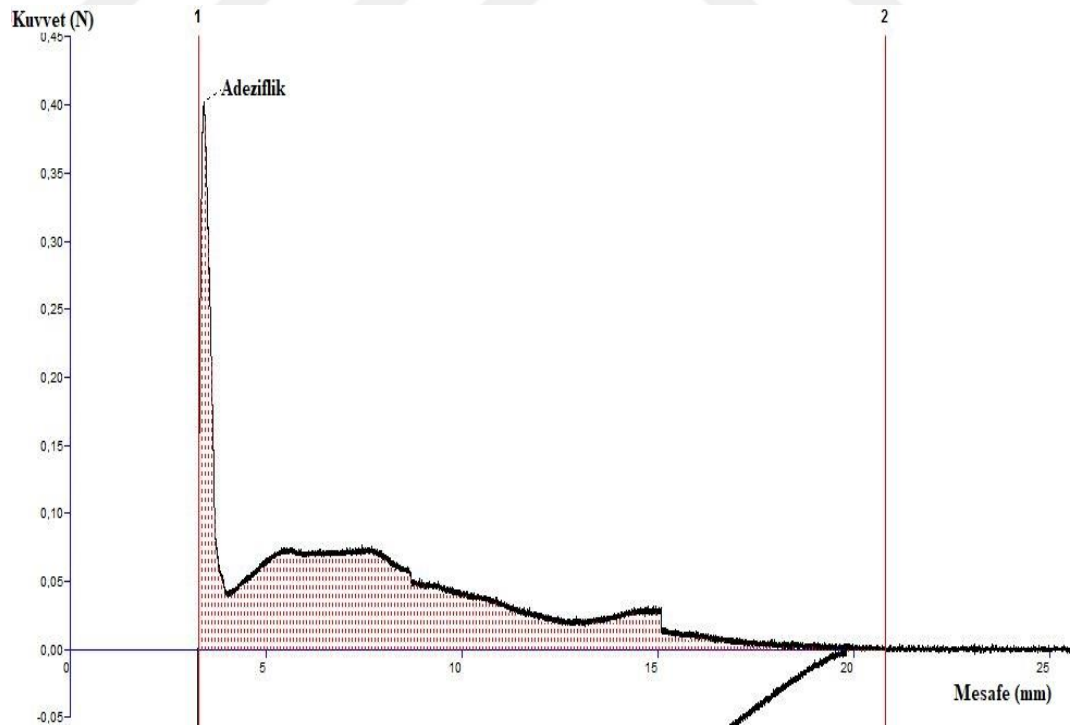
Şekil 62. H2_3 kodlu PVA/Kitozan hidrojel formülasyonunun *in vitro* biyoadesyon grafiği.



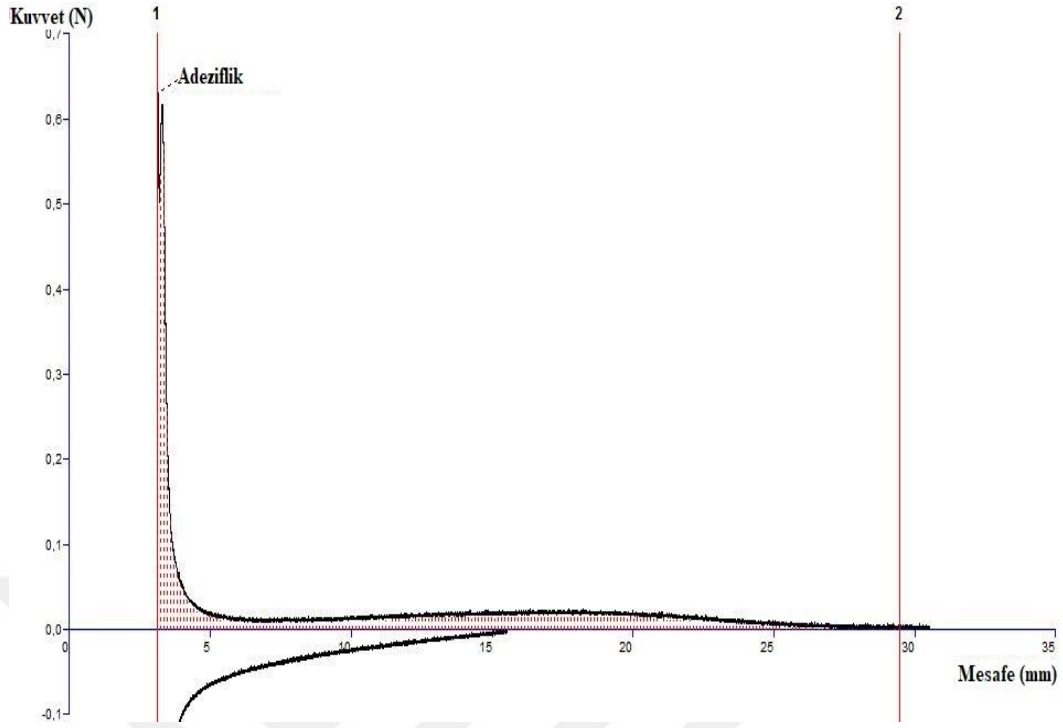
Şekil 63. H3_1 kodlu PVA/Kitozan hidrojel formülasyonunun *in vitro* biyoadesyon grafiği.



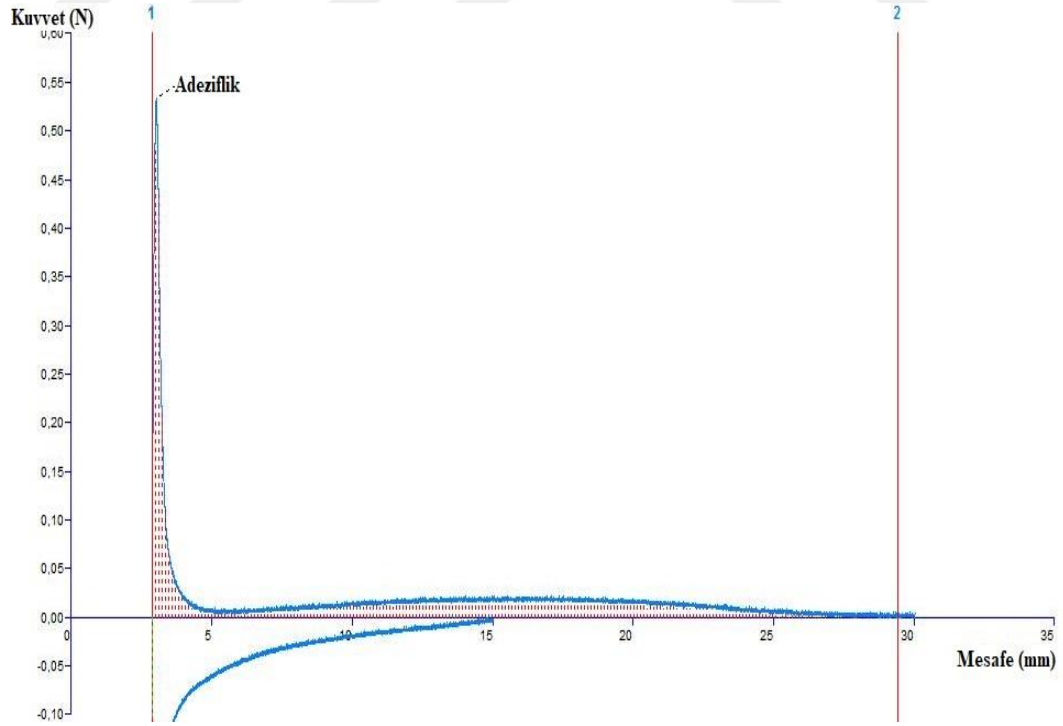
Şekil 64. H3_2 kodlu PVA/Kitozan hidrojel formülasyonunun *in vitro* biyoadezyon grafiği.



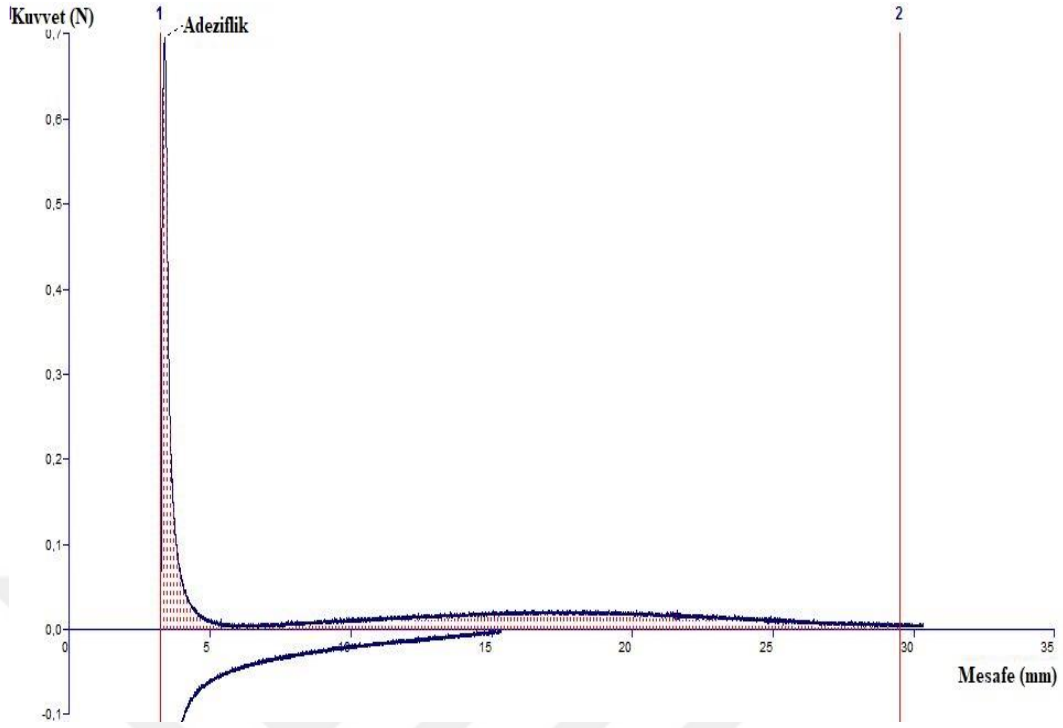
Şekil 65. H3_3 kodlu PVA/Kitozan hidrojel formülasyonunun *in vitro* biyoadezyon grafiği.



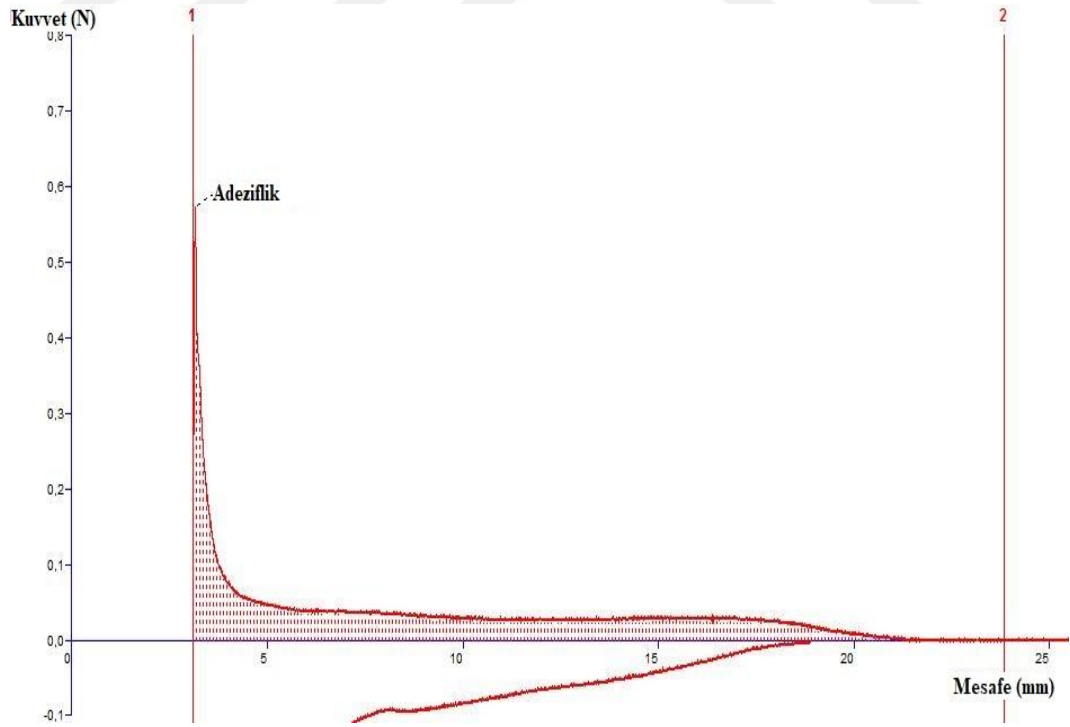
Şekil 66. H4_1 kodlu PVA/Kitozan hidrojel formülasyonunun *in vitro* biyoadezyon grafiği.



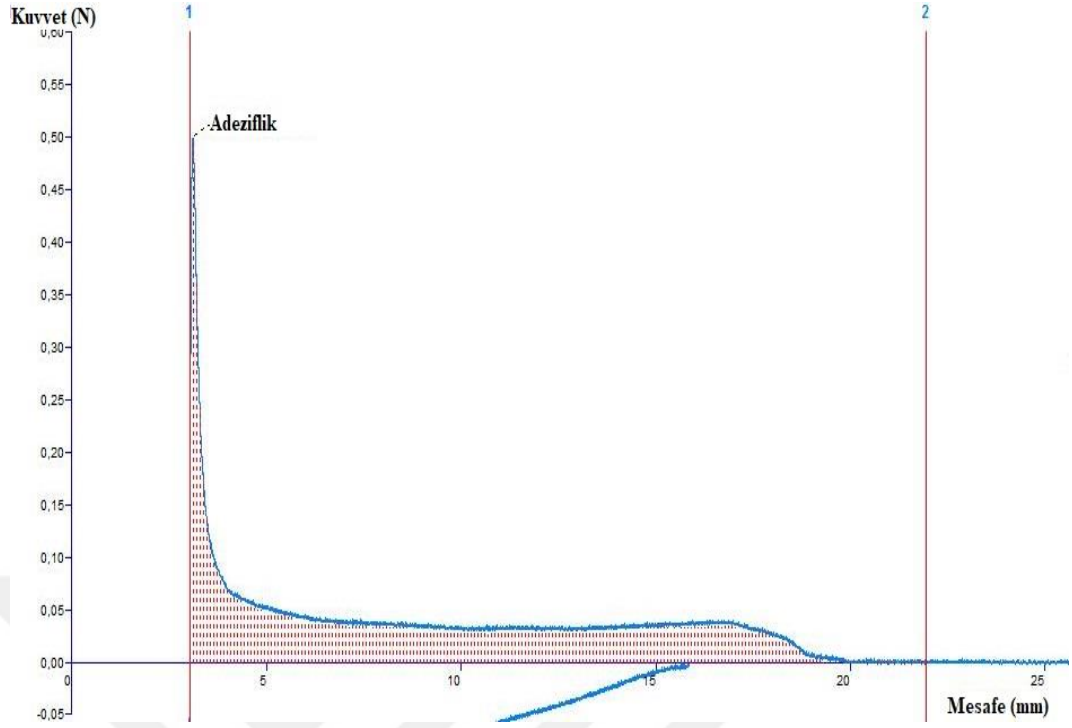
Şekil 67. H4_2 kodlu PVA/Kitozan hidrojel formülasyonunun *in vitro* biyoadezyon grafiği.



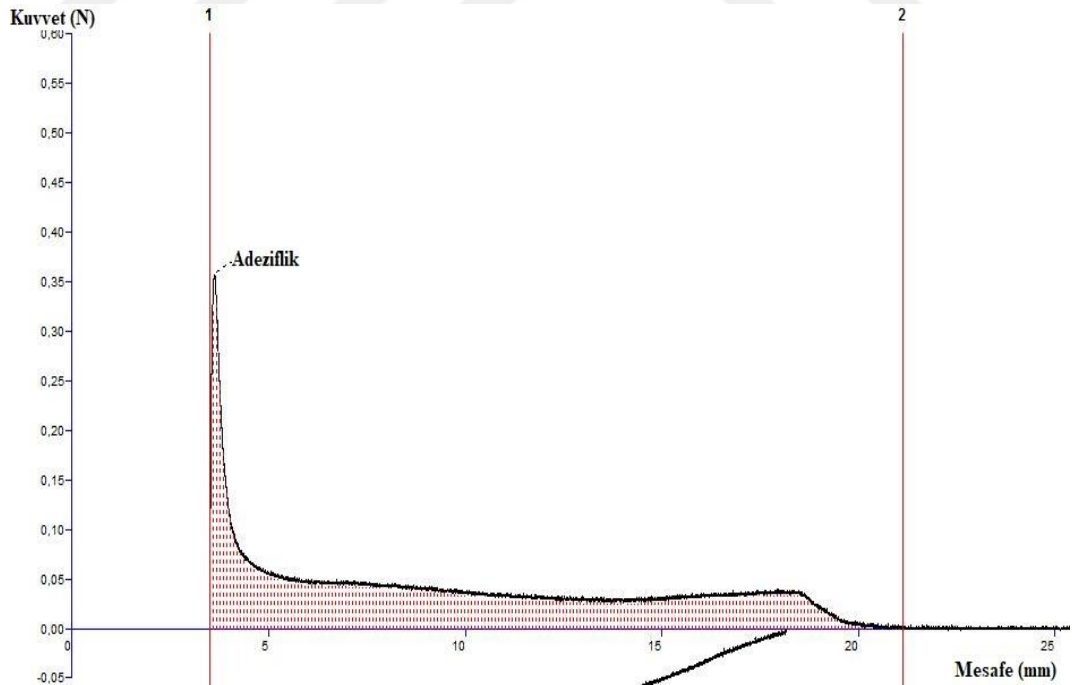
Şekil 68. H4_3 kodlu PVA/Kitozan hidrojel formülasyonunun *in vitro* biyoadezyon grafiği.



Şekil 69. H5_1 kodlu PVA/Kitozan hidrojel formülasyonunun *in vitro* biyoadezyon grafiği.



Şekil 70. H5_2 kodlu PVA/Kitozan hidrojel formülasyonunun *in vitro* biyoadezyon grafiği.



Şekil 71. H5_3 kodlu PVA/Kitozan hidrojel formülasyonunun *in vitro* biyoadezyon grafiği.

6.4.6. PVA/Kitozan hidrojenlerin mekanik özelliklerine ait bulgular

5.2.6.3.6'da belirtildiği üzere tüm PVA/Kitozan hidrojel formülasyonlarının mekanik özellikleri incelenmiştir ve gerekli hesaplamalar yapılmıştır. Hidrojellerin mekanik özellikleri özet olarak **Tablo 16**'da verilmiştir. Hidrojellerin başlıca mekanik özellikleri; sertlik, adezivlik, elastisite, kohezivlik ve dirençlilik olarak değerlendirilmiştir. Hidrojellerin mekanik özellikler ile ilgili grafikler **Şekil 72, 73, 74, 75, 76, 77, 78, 79, 80, 81, 82, 83, 84, 85 ve 86**'da belirtilmiştir.

Table 16. PVA/Kitozan hidrojel formülasyonlarının mekanik özelliklerinin analiz değerleri.

Formülasyon kodları	Sertlik (N±SD)	Adezivlik (N.mm±SD)	Elastisite ±SD	Kohezivlik ±SD	Dirençlilik ±SD
H1	0,052 ± 0,002	0,037 ± 0,007	0,957 ± 0,010	0,626 ± 0,012	0,178 ± 0,009
H2	0,089 ± 0,003	0,053 ± 0,009	0,934 ± 0,005	0,470 ± 0,032	0,202 ± 0,017
H3	0,455 ± 0,077	0,315 ± 0,026	0,918 ± 0,017	0,453 ± 0,043	0,137 ± 0,003
H4	0,098 ± 0,019	0,086 ± 0,020	0,940 ± 0,006	0,665 ± 0,014	0,256 ± 0,042
H5	0,207 ± 0,037	0,243 ± 0,013	0,907 ± 0,006	0,503 ± 0,070	0,142 ± 0,008

6.4.6.1. PVA/Kitozan hidrojenlerde sertlik tayinine ait bulgular

Hidrojel formülasyonları arasında en yüksek sertlik değeri H3 formülasyonuna aittir. En düşük sertlik değeri ise H1 formülasyonundadır.

Tablo 17. PVA/Kitozan hidrojenlerin sertlik sonuçları.

Hidrojenlerde Sertlik Değerleri (N)				
Formülasyon kodu	I	II	III	Ortalama±SD
H1	0,050	0,054	0,053	0,052 ± 0,002
H2	0,086	0,091	0,090	0,089 ± 0,003
H3	0,440	0,387	0,539	0,455 ± 0,077
H4	0,091	0,085	0,120	0,098 ± 0,019
H5	0,164	0,226	0,230	0,207 ± 0,037

6.4.6.2. PVA/Kitozan hidrojenlerde adeziflik tayinine ait bulgular

Hazırlanan en adezif hidrojen H3 ve H5 formlasyonlarıdır. En düşük adeziflik ise H1 formülasyonuna aittir. PVA konsantrasyonu arttıkça adeziflik değerinde anlamlı artış gözlemlenmiştir ($p<0,05$).

Tablo 18. PVA/Kitozan hidrojenlerin adeziflik sonuçları.

Hidrojenlerde Adeziflik Değerleri (N.mm)				
Formülasyon kodu	I	II	III	Ortalama±SD
H1	0,038	0,043	0,029	0,037 ± 0,007
H2	0,043	0,053	0,062	0,053 ± 0,009
H3	0,293	0,309	0,344	0,315 ± 0,026
H4	0,104	0,064	0,091	0,086 ± 0,020
H5	0,231	0,257	0,242	0,243 ± 0,013

6.4.6.3. PVA/Kitozan hidrojenlerde elastisite tayinine ait bulgular

PVA/Kitozan hidrojenler arasında elastisite değeri en yüksek olan H1 formülasyonu iken en düşük elastisite değeri H5 formülasyonunda görülmüştür.

Tablo 19. PVA/Kitozan hidrojenlerin elastisite sonuçları.

Hidrojenlerde Elastisite Değerleri				
Formülasyon kodu	I	II	III	Ortalama±SD
H1	0,959	0,947	0,967	0,957 ± 0,010
H2	0,937	0,937	0,928	0,934 ± 0,005
H3	0,935	0,901	0,918	0,918 ± 0,017
H4	0,937	0,946	0,936	0,940 ± 0,006
H5	0,905	0,902	0,913	0,907 ± 0,006

6.4.6.4. PVA/Kitozan hidrojenlerde koheziflik tayinine ait bulgular

Hazırlanan hidrojenler arasında en yüksek koheziflik değeri H4 hidrojeninde elde edilmiştir. En yüksek PVA konsantrasyonuna sahip H3 formülasyonu ise en düşük kohezif etkiyi göstermiştir (p<0,05).

Tablo 20. PVA/Kitozan hidrojenlerin koheziflik sonuçları.

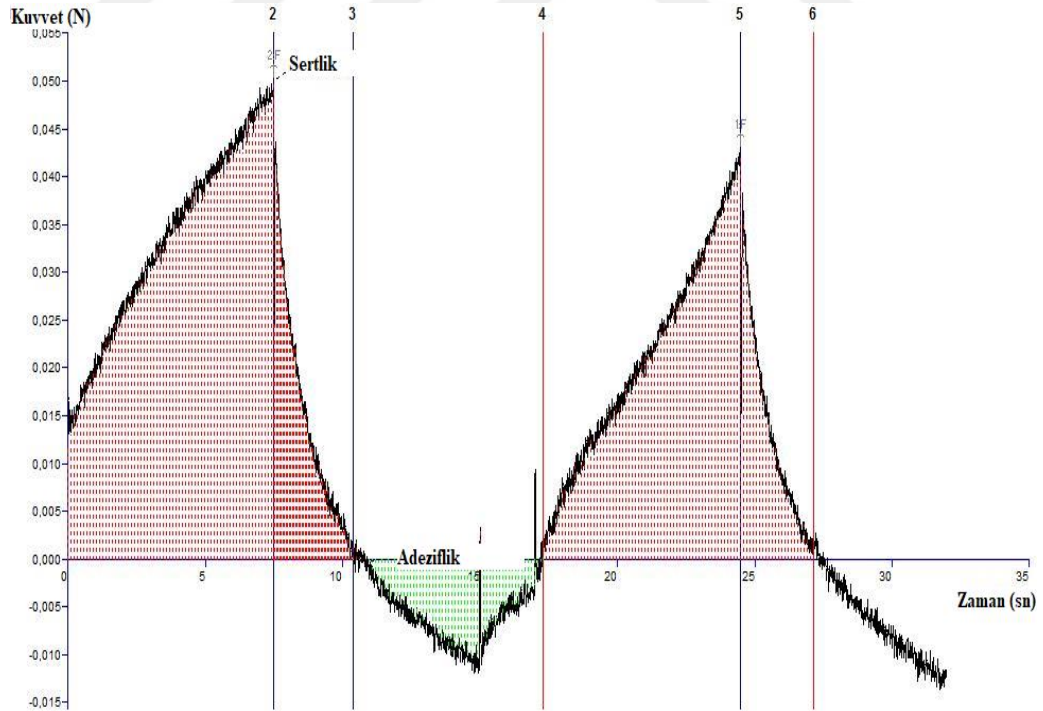
Hidrojenlerde Koheziflik Değerleri				
Formülasyon kodu	I	II	III	Ortalama±SD
H1	0,637	0,613	0,627	0,626 ± 0,012
H2	0,436	0,499	0,474	0,470 ± 0,032
H3	0,460	0,407	0,492	0,453 ± 0,043
H4	0,660	0,681	0,655	0,665 ± 0,014
H5	0,584	0,471	0,455	0,503 ± 0,070

6.4.6.5. PVA/Kitozan hidroojellerde dirençlilik tayinine ait bulgular

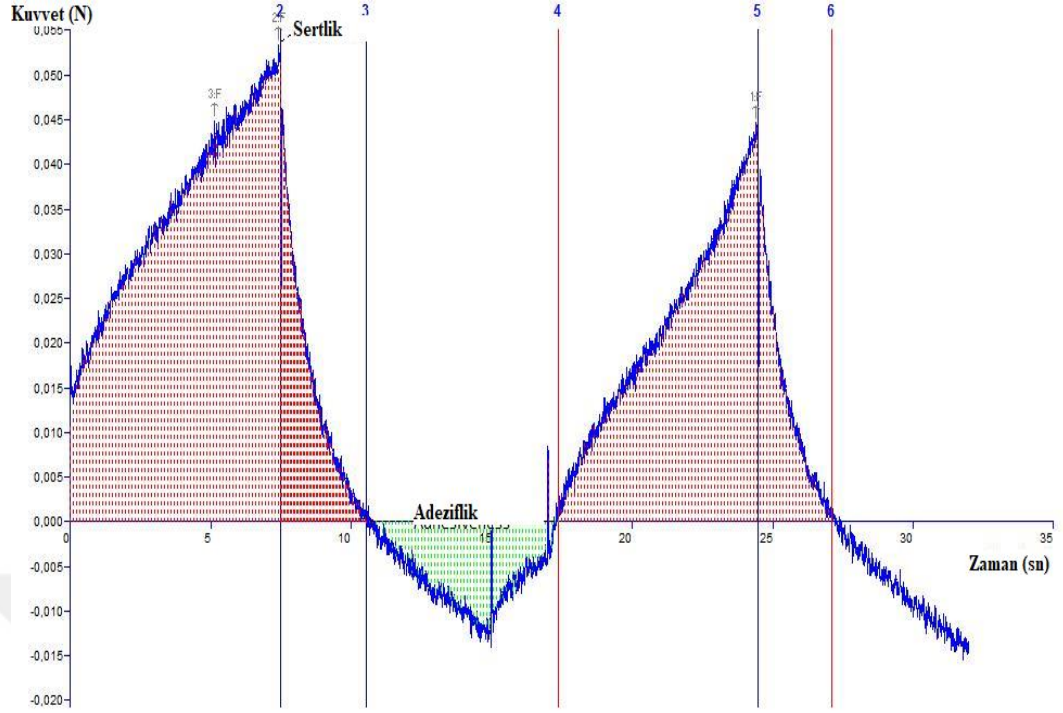
Geliştirilen formülasyonlar arasında sadece kitozan ile hazırlanmış H4 formülasyonuna ait hidrojel en yüksek dirençlilik değerine sahiptir. PVA artışı doğrusal bir anlamlılık oluşturmamıştır ($p>0,05$).

Tablo 21. PVA/Kitozan hidroojellerin dirençlilik sonuçları.

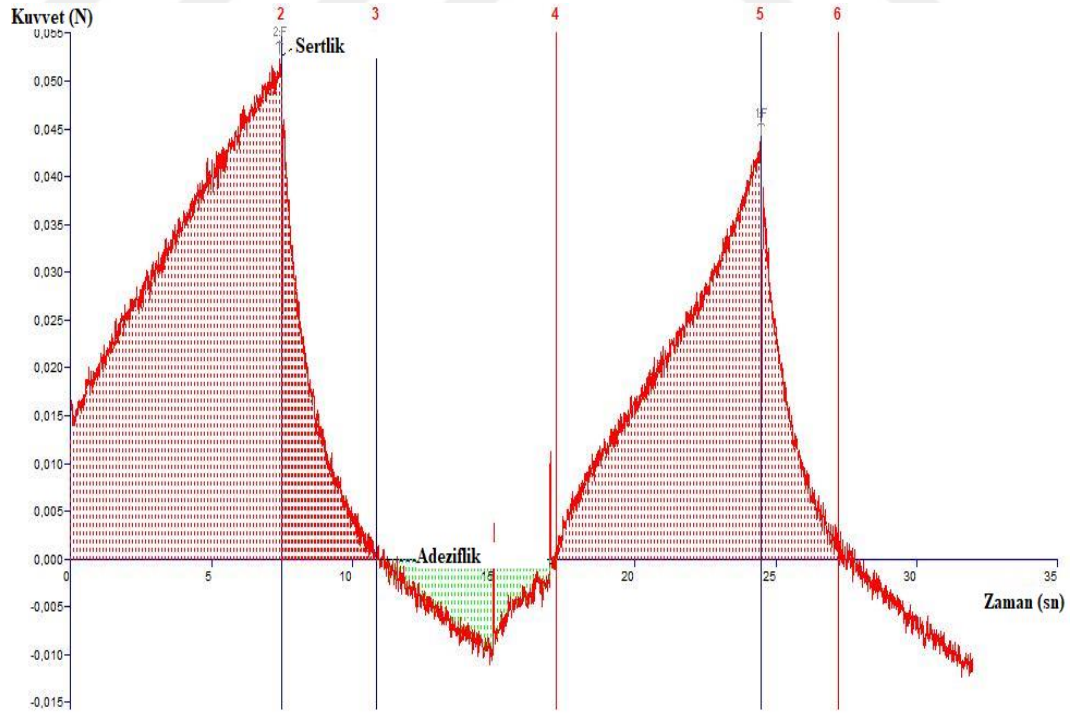
Hidroojellerde Dirençlilik Değerleri				
Formülasyon kodu	I	II	III	Ortalama $\pm$ SD
H1	0,173	0,172	0,187	0,178 $\pm$ 0,009
H2	0,198	0,221	0,187	0,202 $\pm$ 0,017
H3	0,133	0,139	0,138	0,137 $\pm$ 0,003
H4	0,208	0,284	0,277	0,256 $\pm$ 0,042
H5	0,149	0,133	0,144	0,142 $\pm$ 0,008



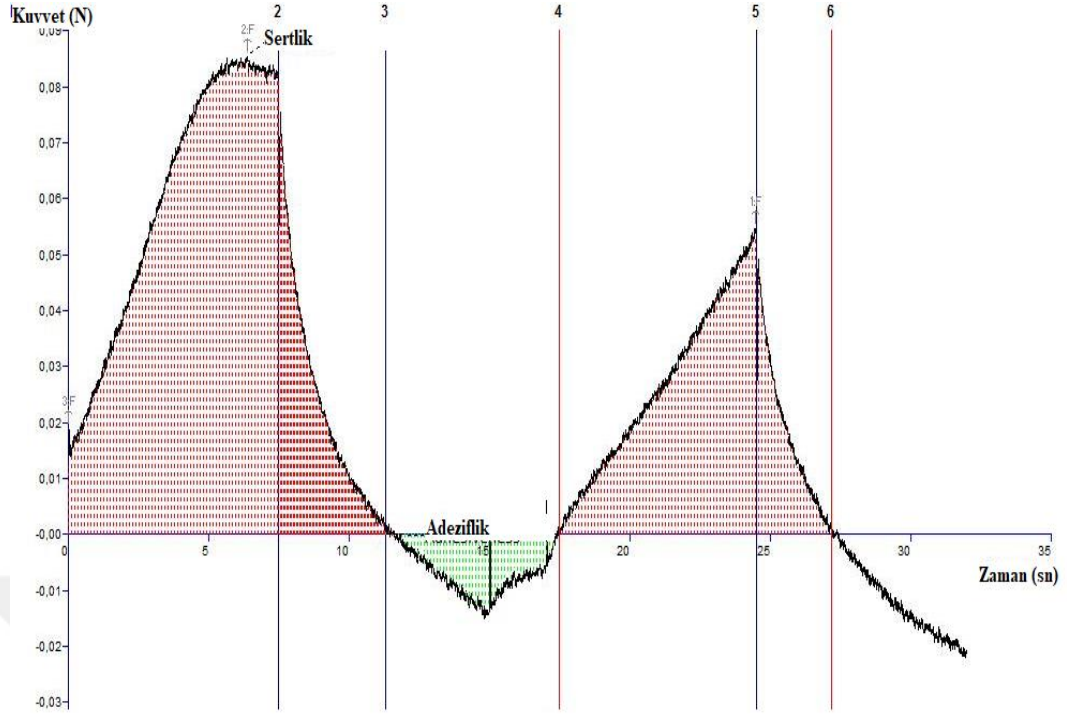
Şekil 72. H1_1 kodlu PVA/Kitozan hidrojel formülasyonunun mekanik özellik grafiği.



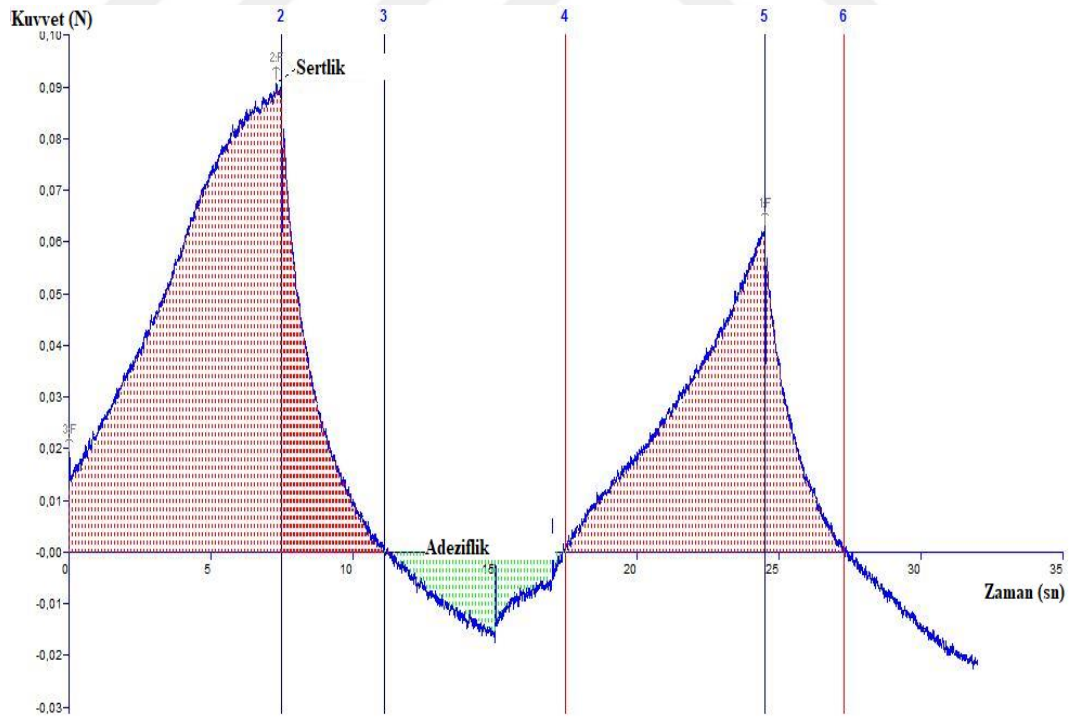
Şekil 73. H1_2 kodlu PVA/Kitozan hidrojel formülasyonunun mekanik özellik grafiği.



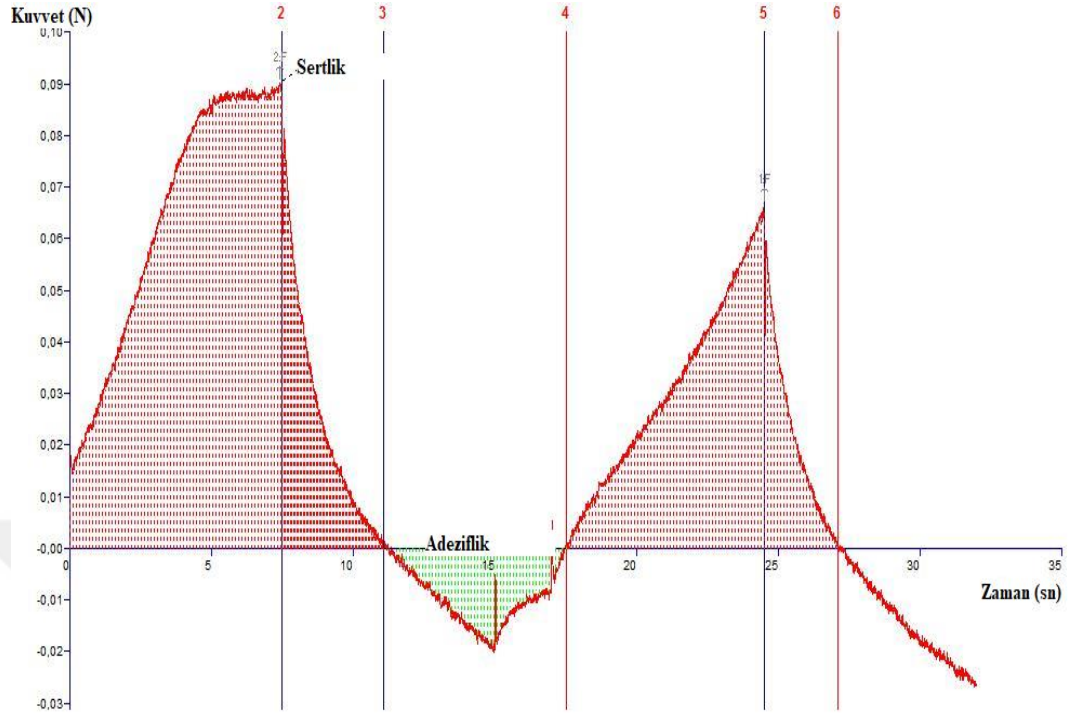
Şekil 74. H1_3 kodlu PVA/Kitozan hidrojel formülasyonunun mekanik özellik grafiği.



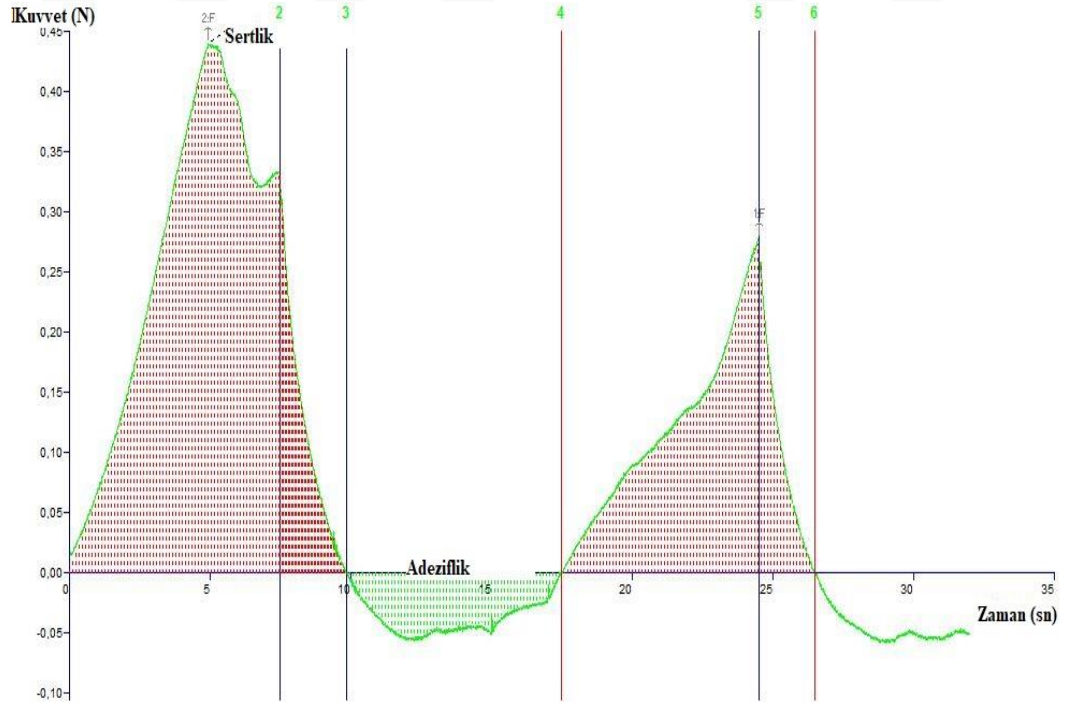
Şekil 75. H2_1 kodlu PVA/Kitozan hidrojel formülasyonunun mekanik özellik grafiği.



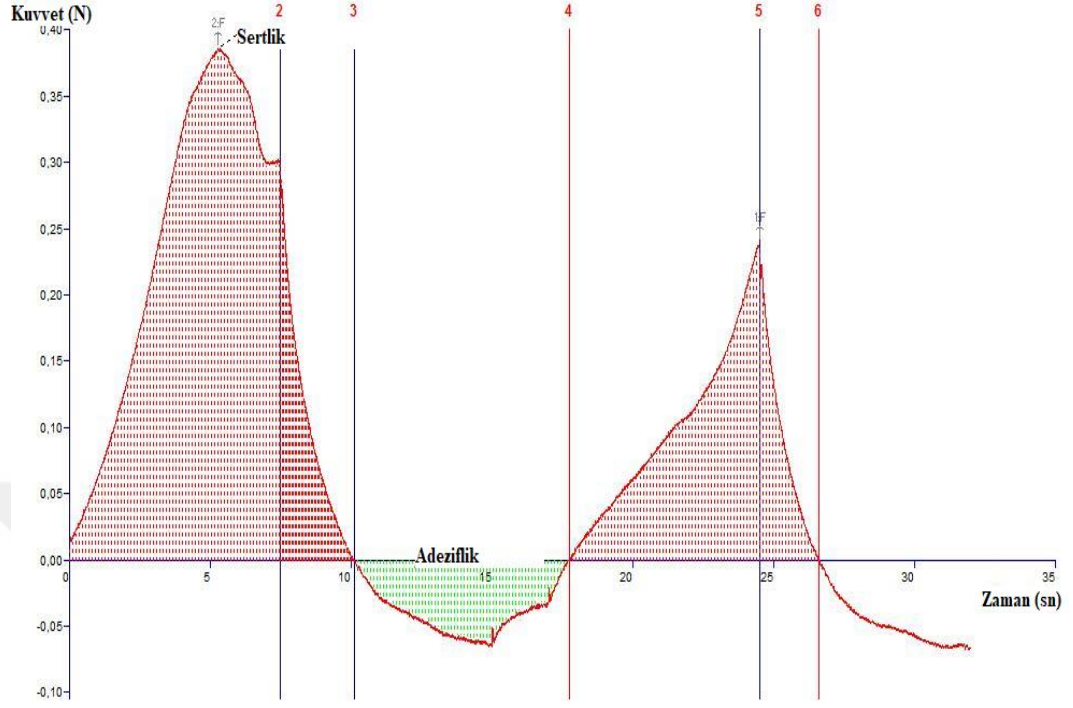
Şekil 76. H2_2 kodlu PVA/Kitozan hidrojel formülasyonunun mekanik özellik grafiği.



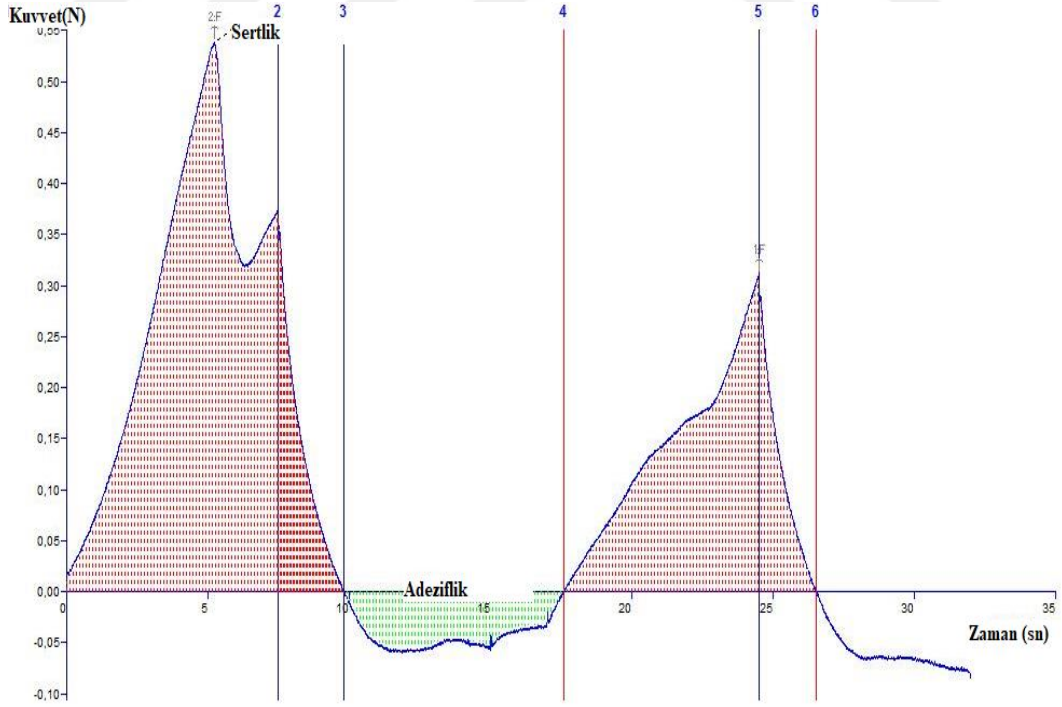
Şekil 77. H2_3 kodlu PVA/Kitozan hidrojel formülasyonunun mekanik özellik grafiği.



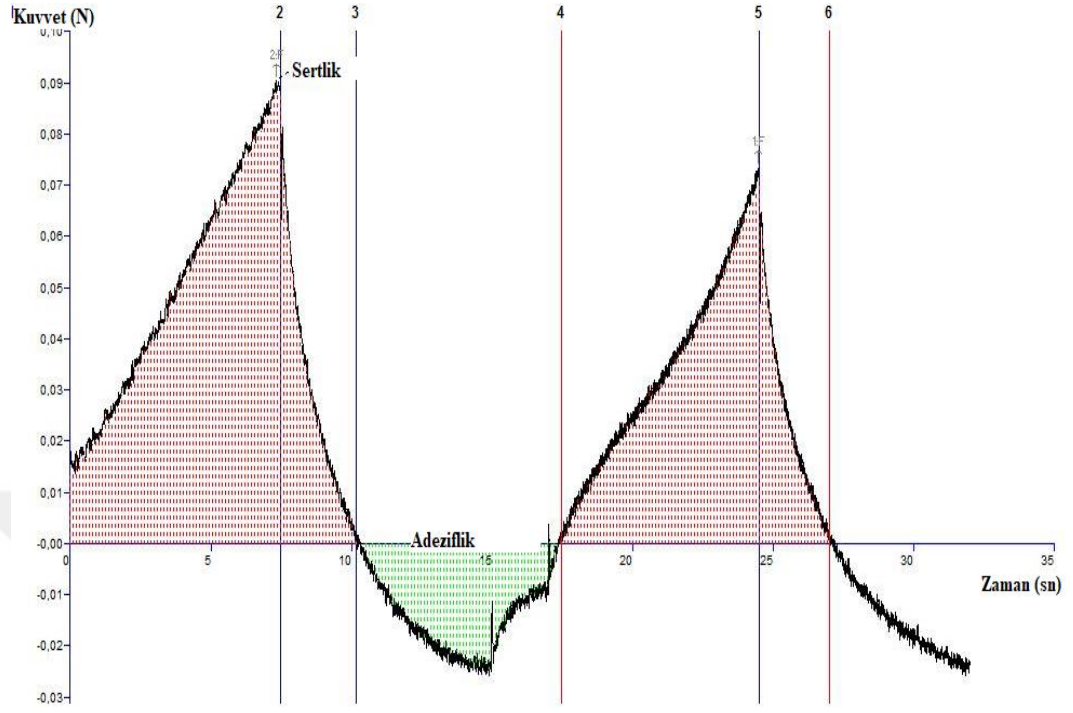
Şekil 78. H3_1 kodlu PVA/Kitozan hidrojel formülasyonunun mekanik özellik grafiği.



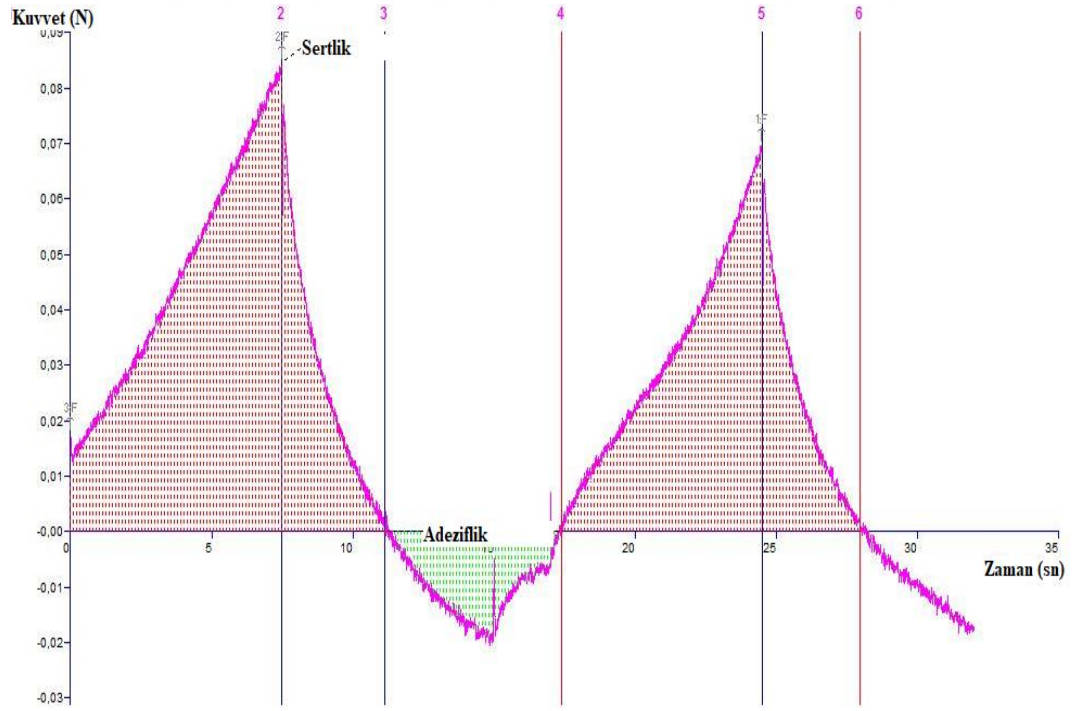
Şekil 79. H3_2 kodlu PVA/Kitozan hidrojel formülasyonunun mekanik özellik grafiği.



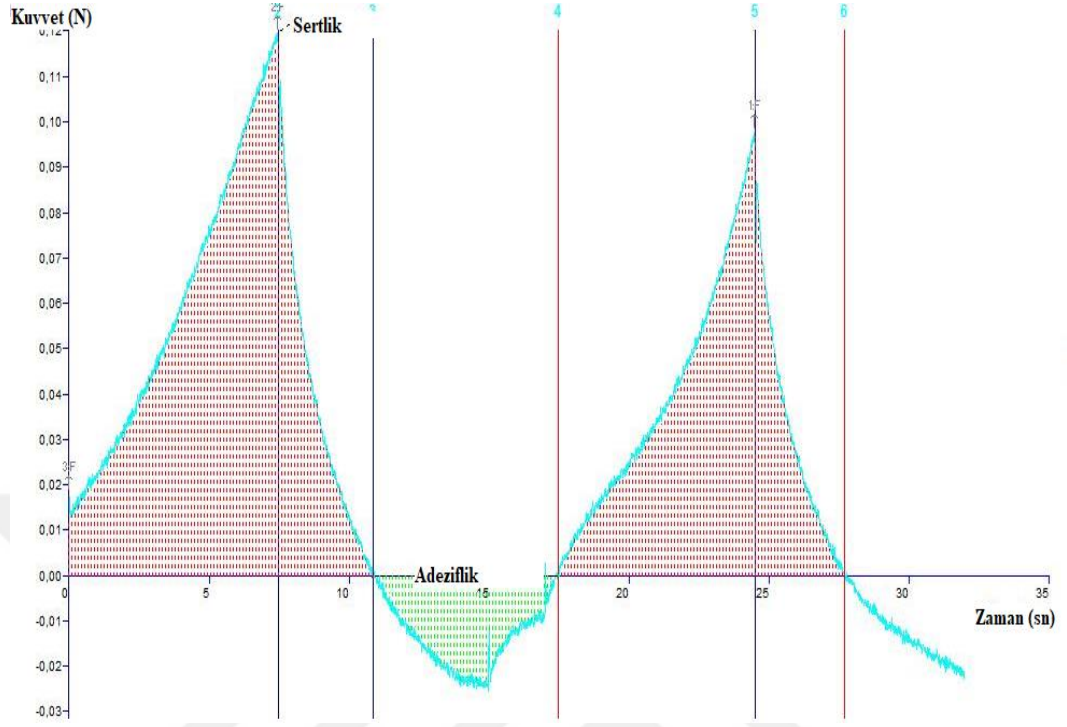
Şekil 80. H3_3 kodlu PVA/Kitozan hidrojel formülasyonunun mekanik özellik grafiği.



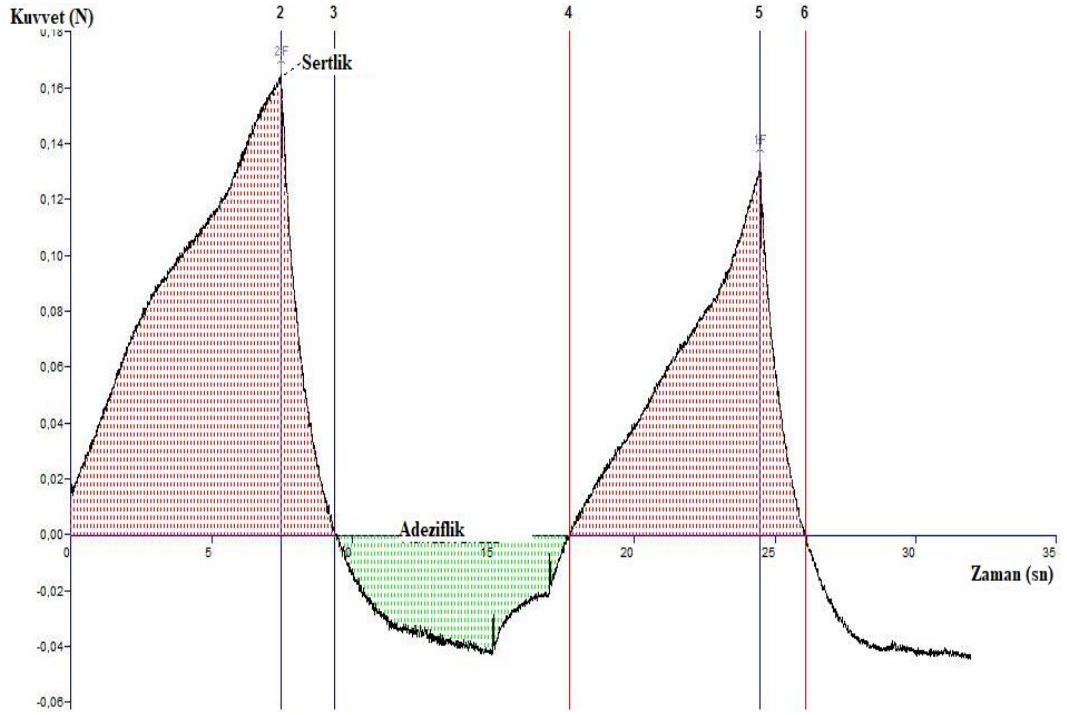
Şekil 81. H4_1 kodlu PVA/Kitozan hidrojel formülasyonunun mekanik özellik grafiği.



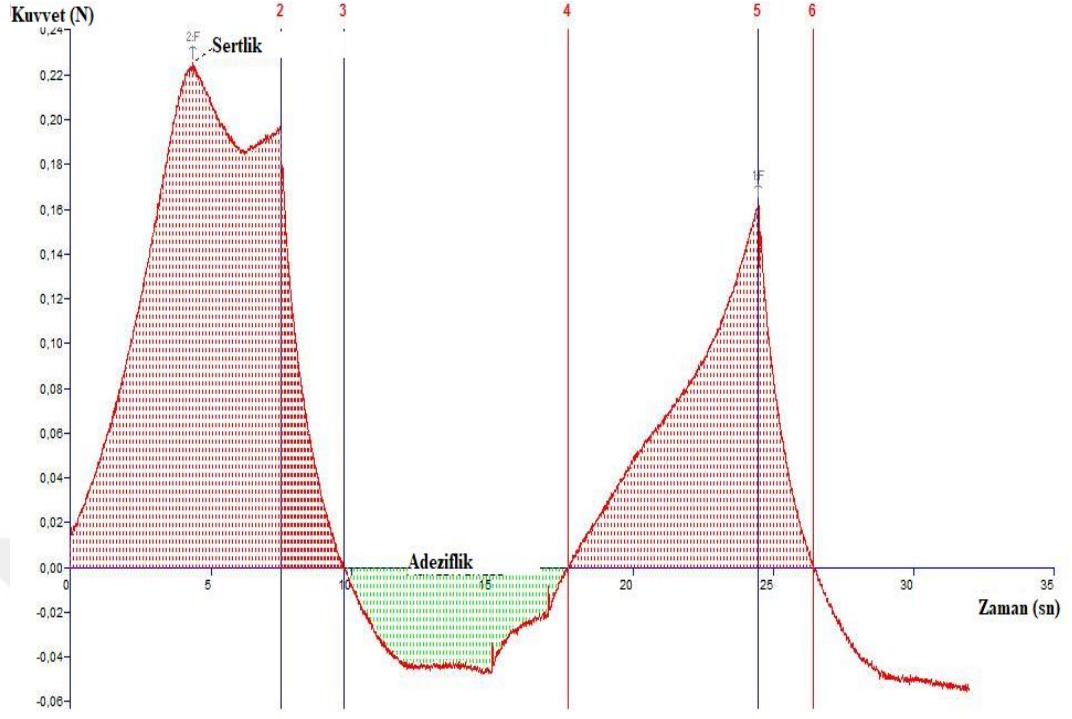
Şekil 82. H4_2 kodlu PVA/Kitozan hidrojel formülasyonunun mekanik özellik grafiği.



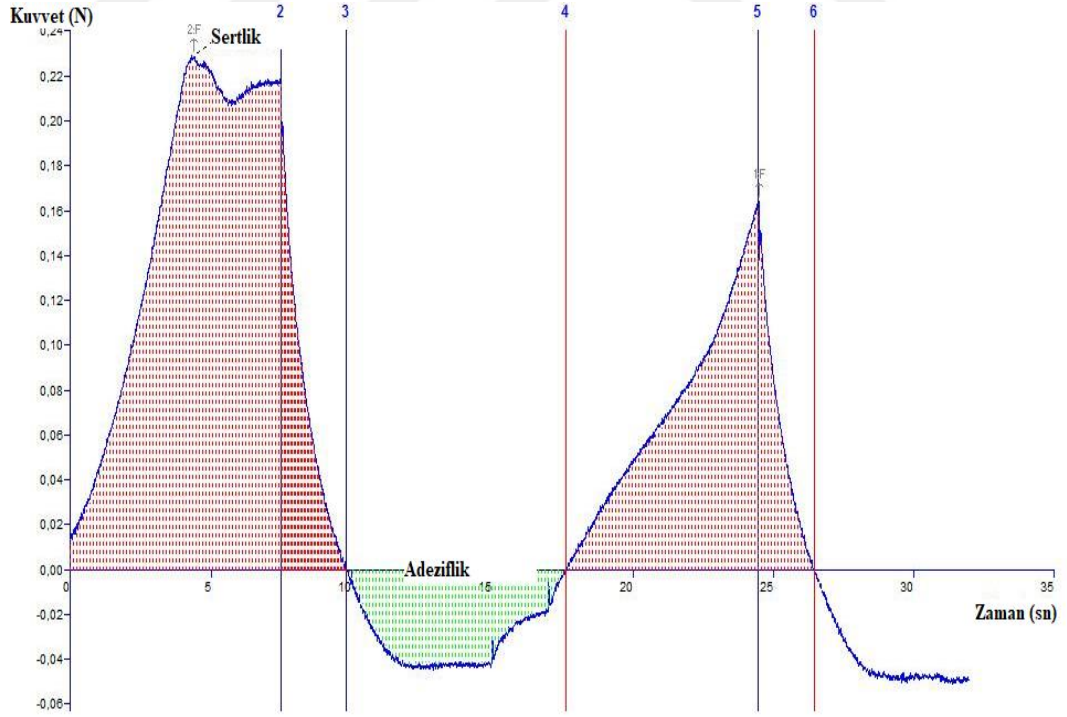
Şekil 83. H4_3 kodlu PVA/Kitozan hidrojel formülasyonunun mekanik özellik grafiği.



Şekil 84. H5_1 kodlu PVA/Kitozan hidrojel formülasyonunun mekanik özellik grafiği.



Şekil 85. H5_2 kodlu PVA/Kitozan hidrojel formülasyonunun mekanik özellik grafiği.



Şekil 86. H5_3 kodlu PVA/Kitozan hidrojel formülasyonunun mekanik özellik grafiği.

6.4.7. PVA/Kitozan hidrojellerin viskozite ölçümlerine ait bulgular

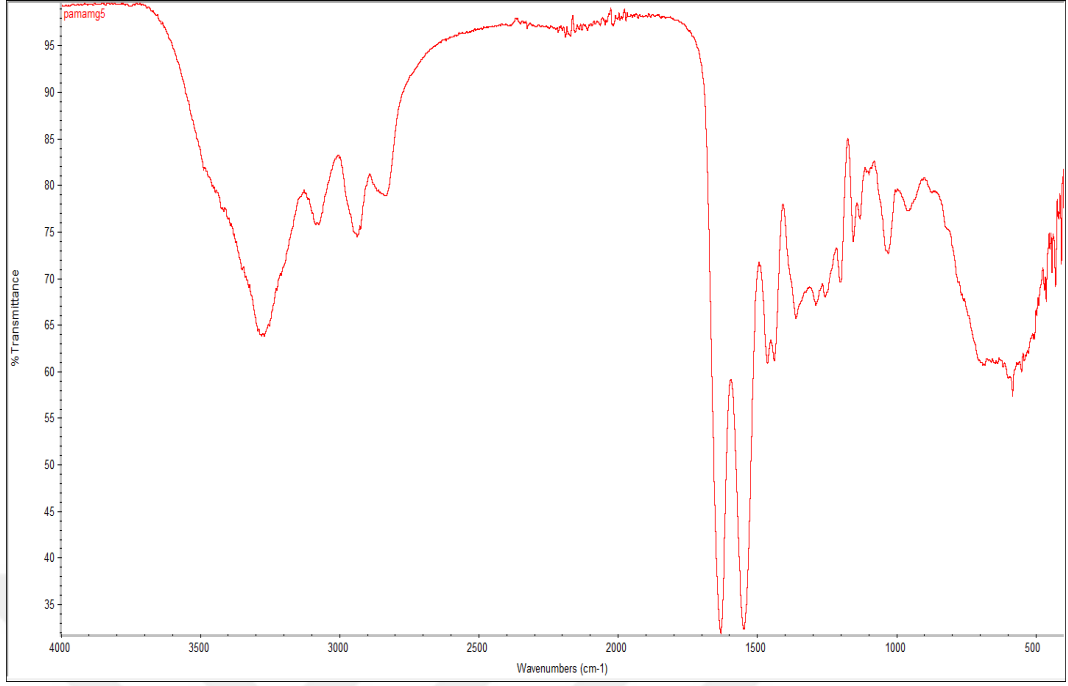
5.2.6.3.7’de belirtilen yöntemle göre hidrojellerin viskozite ölçümleri yapılmıştır. Tüm hidrojel formülasyonların viskozite değerleri **Tablo 15**’de belirtilmiştir. Elde edilen sonuçlara göre en viskoz hidrojel $21300,0 \pm 5208,4$ cp ile H3 formülasyonudur. Nanopartikül içeren H5 kodlu hidrojel ise $19433 \pm 0,365$ cp ile ikinci en yüksek viskoziteye sahip hidrojeldir.

6.5. PAMAM/PVA Hidrojellerin Hazırlanması ve Karakterizasyonuna Ait Bulgular

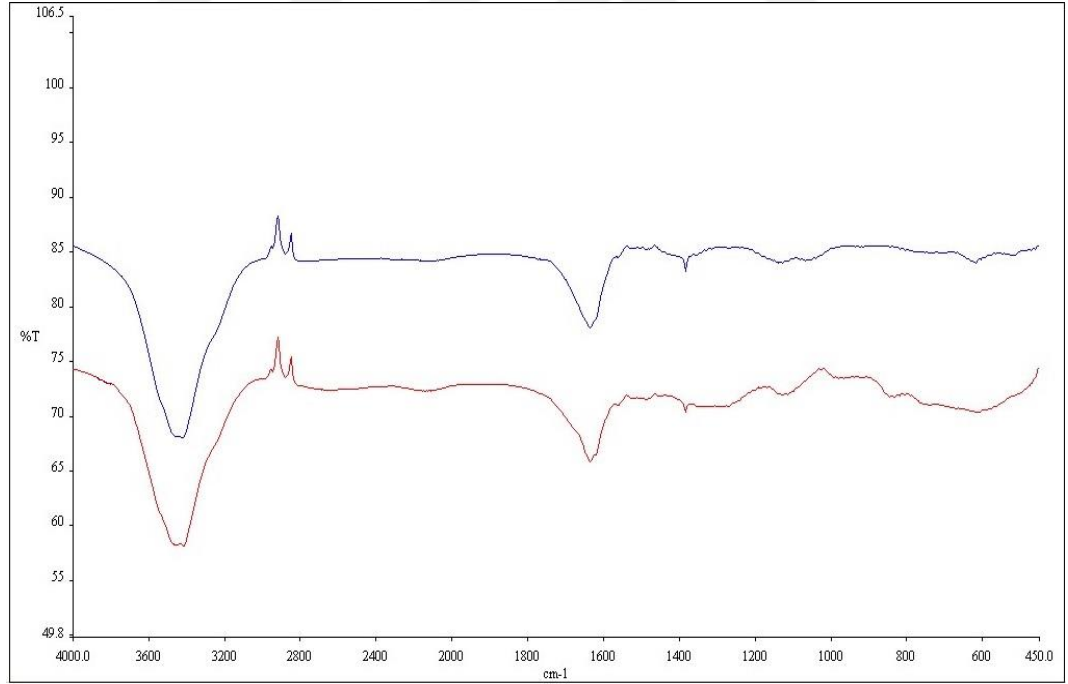
6.5.1. PAMAM/PVA hidrojellerin fourier dönüşümlü kızılötesi spektroskopisine (FT-IR) ait bulgular

5.2.7.2.1’de ifade edildiği gibi formülasyonların FT-IR analizi yapılmıştır. **Şekil 87**’de PAMAM G5- (NH₂) dendrimerin kimyasal yapı grupları gösterilmiştir. 3277 cm^{-1} (N-H) gerilimi, 2937 ve 2863 cm^{-1} simetrik ve asimetrik (-CH₂) gerilimi, 1641 cm^{-1} amid I bağı ve 1559 cm^{-1} amid II bağı görülmüştür. **Şekil 88** ve **Şekil 89**’da PVA ve PAMAM çapraz bağlı hidrojellerin protein içeren ve içermeyen formlarının yapılarına ait kimyasal bağlar belirtilmiştir. PVA ve PAMAM G5’den gelen -(OH) ve (-NH) gerilimleri $3350\text{-}3400\text{ cm}^{-1}$ aralığında belirgin bir pik oluşturmuştur. Yaklaşık 1650 cm^{-1} ’de karbonil (-CONH-) geriliminden kaynaklı amid I bağı görülürken yaklaşık 1450 cm^{-1} ‘e kayan ve belirgin olmayan bir pik olarak amid II bağı görülmüştür.

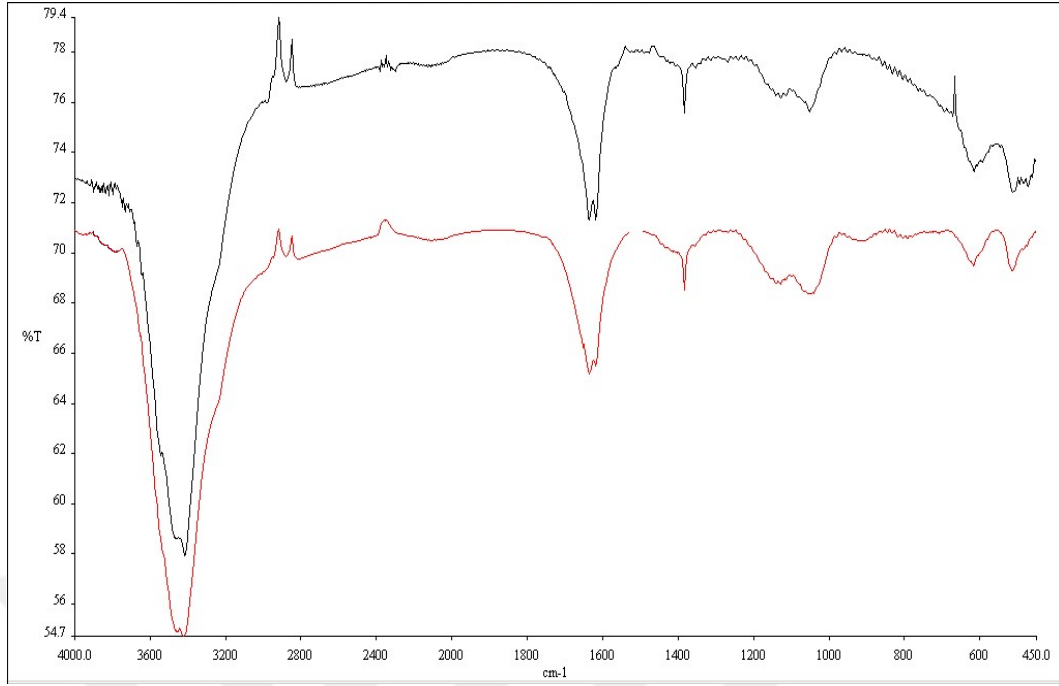
Şekil 90’da yaklaşık 3450 cm^{-1} geriliminde belirgin -(OH) piki, 1650 cm^{-1} piki polivinil asetat öncüsünden kalan asetat ve karboksilik asit fonksiyonel gruplarından uzanan -(C=O) karbonil olarak gözlemlenmiştir. Saf PVA polimerinde bulunan geniş C-H gerinimi PVA hidrojelde zayıf olarak 2900 cm^{-1} civarında görülmüştür.



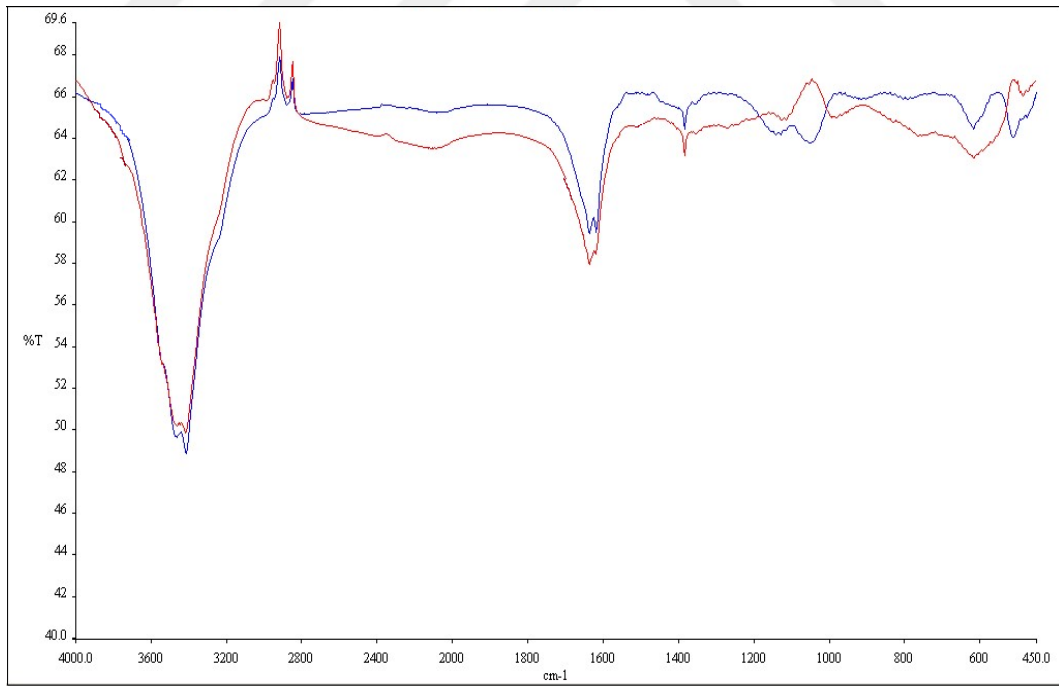
Şekil 87. PAMAM G5 polimerin fourier dönüştümlü kızılötesi spektroskopisi.



Şekil 88. F1_1 (mavi) ve F4_1 (kırmızı) kodlu PAMAM/PVA hidrojelilerin fourier dönüştümlü kızılötesi spektroskopisi.



Şekil 89. F2_1 (kırmızı) ve F5_1 (siyah) kodlu PAMAM/PVA hidrojenlerin fourier dönüşümlü kızılötesi spektroskopisi.



Şekil 90. F3_1 (mavi) ve F6_1 (kırmızı) kodlu PAMAM/PVA hidrojenlerin fourier dönüşümlü kızılötesi spektroskopisi.

6.5.2.PAMAM/PVA hidrojenlerin su tutma kapasitesi

5.2.7.2.2' deki yöntemde belirtilen şekilde hidrojenlerin su tutma kapasitesi hesaplanmıştır. 90 dakika boyunca en yüksek su tutma kapasitesi %33,867± 0,008 F1 kodlu formülasyonda elde edilmiştir. F2 kodlu hidrojen %28,867±0,005; F3 kodlu hidrojen ise %23,433±0,006 oranında su tutma kapasitesine sahiptir. **Tablo 22, 23 ve 24'**de hidrojenlerin zamana bağlı su tutma kapasiteleri gram olarak verilmiştir. **Şekil 91'**de yüzde grafikleri belirtilmiştir.

Tablo 22. F1 kodlu PAMAM/PVA hidrojenlerinin su tutma kapasitesi.

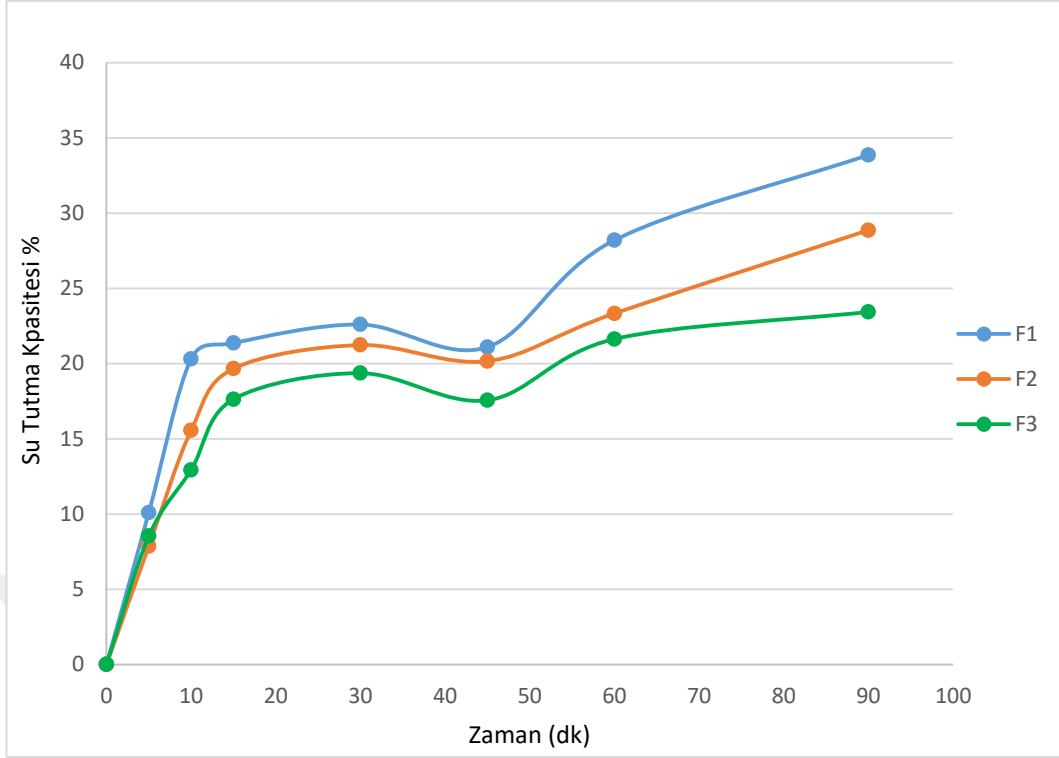
F1 kodlu hidrojenin su tutma kapasitesi (g) (n=3)				
Zaman (dk)	I	II	III	Ortalama ± SD
'5	0,100	0,113	0,090	0,101± 0,012
'10	0,187	0,220	0,202	0,203± 0,017
'15	0,208	0,222	0,211	0,214 ± 0,007
'30	0,231	0,229	0,218	0,226 ± 0,007
'45	0,211	0,215	0,207	0,211 ± 0,004
'60	0,279	0,291	0,276	0,282 ±0,008
'90	0,347	0,331	0,338	0,339 ±0,008

Tablo 23. F2 kodlu PAMAM/PVA hidrojelinin su tutma kapasitesi.

F2 kodlu hidrojin su tutma kapasitesi (g) (n=3)				
Zaman (dk)	I	II	III	Ortalama $\pm$ SD
'5	0,094	0,058	0,084	0,079 $\pm$ 0,019
'10	0,155	0,163	0,149	0,156 $\pm$ 0,007
'15	0,195	0,203	0,192	0,197 $\pm$ 0,006
'30	0,212	0,217	0,208	0,212 $\pm$ 0,005
'45	0,202	0,204	0,199	0,202 $\pm$ 0,003
'60	0,233	0,240	0,227	0,233 $\pm$ 0,007
'90	0,287	0,294	0,285	0,289 $\pm$ 0,005

Tablo 24. F3 kodlu PAMAM/PVA hidrojelinin su tutma kapasitesi.

F3 kodlu hidrojin su tutma kapasitesi (g) (n=3)				
Zaman (dk)	I	II	III	Ortalama $\pm$ SD
'5	0,087	0,089	0,080	0,085 $\pm$ 0,005
'10	0,130	0,132	0,126	0,129 $\pm$ 0,003
'15	0,172	0,173	0,184	0,176 $\pm$ 0,007
'30	0,187	0,195	0,199	0,194 $\pm$ 0,006
'45	0,171	0,176	0,180	0,176 $\pm$ 0,005
'60	0,208	0,221	0,220	0,216 $\pm$ 0,007
'90	0,228	0,240	0,235	0,234 $\pm$ 0,009



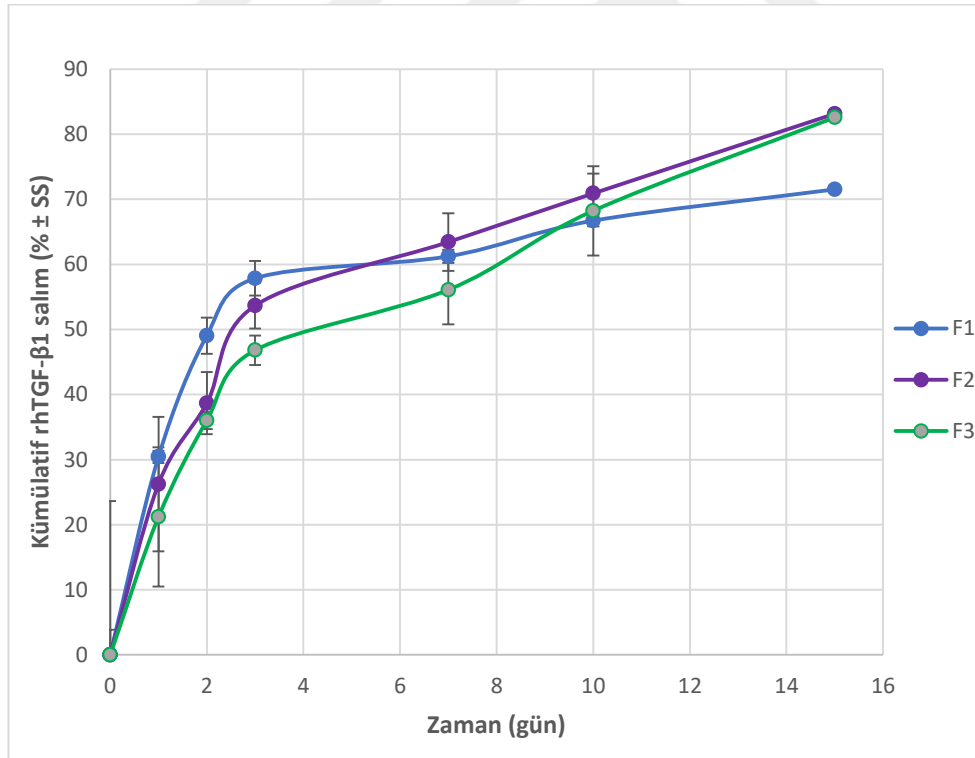
Şekil 91. PAMAM/PVA hidrojenlerin zamana bağlı su tutma yüzdeleri (PBS pH:7.4, 25 °C).

6.5.3. PAMAM/PVA hidrojenlerin *in vitro* salım çalışması

5.2.7.2.3'te belirtilen yöntemle göre hidrojenlerin *in vitro* salım çalışması yapılmıştır. **Tablo 25**'de ayrıntılı bir şekilde hidrojenlerden salınan rhTGF- β 1 proteinin zaman bağlı salım yüzde sonuçları verilmiştir. 15 günlük *in vitro* salım çalışması sonucunda 500 pg proteinin hidrojel formülasyonlarından salımı sırasıyla F1 % 71,524 $\pm$ 0,9; F2 % 83,143 $\pm$ 3,1; F3 % 82,571 $\pm$ 6,9 oranında gerçekleşmiştir. **Şekil 92**'de hidrojenlerin kümülatif salım grafiği verilmiştir.

Tablo 25. PAMAM/PVA hidrojelilerin *in vitro* % salım sonuçları.

% Ortalama $\pm$ %SD			
Zaman (gün)	F1	F2	F3
1	30,429 $\pm$ 1,8	26,238 $\pm$ 3,9	21,19 $\pm$ 23,6
2	49,048 $\pm$ 0,9	38,667 $\pm$ 10,3	36,000 $\pm$ 10,7
3	57,858 $\pm$ 2,8	53,667 $\pm$ 4,8	46,810 $\pm$ 1,3
7	61,239 $\pm$ 2,7	63,428 $\pm$ 3,5	56,095 $\pm$ 2,3
10	66,715 $\pm$ 1,0	70,905 $\pm$ 4,4	68,238 $\pm$ 5,3
15	71,524 $\pm$ 0,9	83,143 $\pm$ 3,1	82,571 $\pm$ 6,9



Şekil 92. rhTGF-β1 proteinin PAMAM/PVA hidrojellerden salım grafiği. Her bir çalışma standard sapmalarıyla verilmiş olup n=3 paralelli çalışılmıştır (PBS buffer, pH 7,4, 37°C).

6.6. Hücre Kültürü Çalışmalarına Ait Bulgular

6.6.1. Hücre canlılığı deneyine ait bulgular

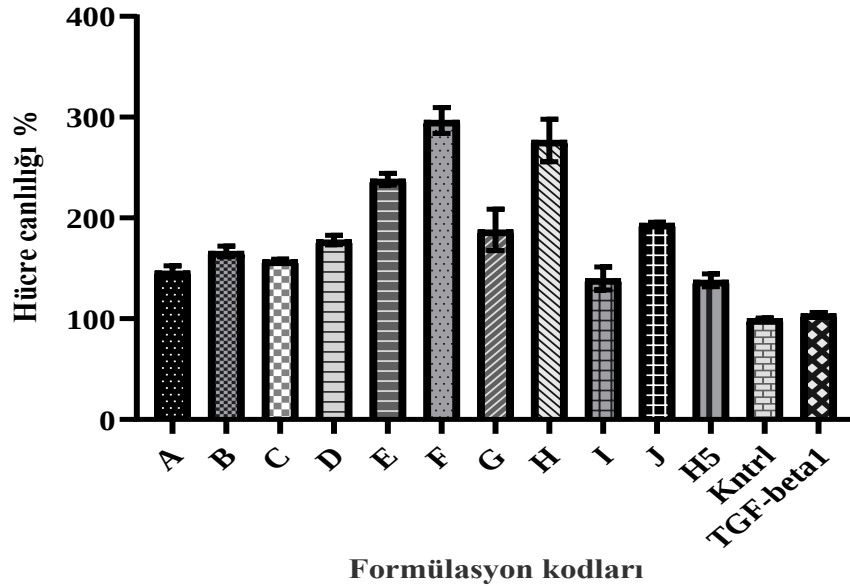
Tez kapsamında hazırlanan tüm farmasötik formlar MTT çalışmasında; yara iyileşmesinde *in vitro* etkinlik açısından yaygın olarak kullanılan NIH-3T3 fibroblast ve HaCaT keratinosit hücre hatları üzerinde değerlendirilmiştir. 5.2.8.1’de belirtilen yöntemle göre 96 kuyucuklu plakalarda çalışma gerçekleştirilmiştir. MTT deneyinde hazırlanan formülasyonların sitotoksik olup olmadığı belirtilmiştir. Geliştirilen farmasötik formların hiçbiri sitotoksik bulunmamıştır. Deneyde yer alan kontrol gruplarını içeren kuyular sadece DMEM besiyeri ve ilgili hücreyi içermektedir. PAMAM/PVA hidrojelde kullanılan PAMAM dendrimerin formülasyonlarda içerdiği miktar olan %10 (a/h) konsantrasyonunda kuyu başına 25µl eklenmiştir ve sitotoksik etkisi incelenmiştir. rhTGF-β1 proteini de kuyu başına 2.5ng/25µl olacak şekilde eklenerek sitotoksikite etkisi değerlendirilmiştir.

6.6.1.1. PLGA Nanopartiküllerin hücre canlılığı deneyine ait bulgular

PLGA nanopartiküllerin her iki hücre hattı üzerine sitotoksikite değerlendirilmesi için MTT deneyi yapılmıştır. Hem rhTGF-β1 içeren hemde içermeyen PLGA nanopartiküllerin hücre canlılığı üzerine etkisi 24 saatlik deney sonucu gözlemlenmiştir. **Tablo 26**’te ve **Tablo 27**’de sırasıyla fibroblast ve keratinosit hücre hatları üzerinde PLGA nanopartiküllerin üç tekrarlı çalışıldığı ve yüzde sonuçları ortalama ve standart sapmaları ile birlikte verilmiştir. **Şekil 93** ve **Şekil 94**’de elde edilen sonuçların % canlılık grafikleri belirtilmiştir. Ayrıca bu grafiklere F kodlu nanopartikül içeren H5 PVA/Kitozan hidrojel formülasyonu da eklenerek verilerin kıyaslaması yapılmıştır.

Tablo 26. PLGA nanopartiküllerin NIH-3T3 hücre hattındaki sitotoksisite sonuçları.

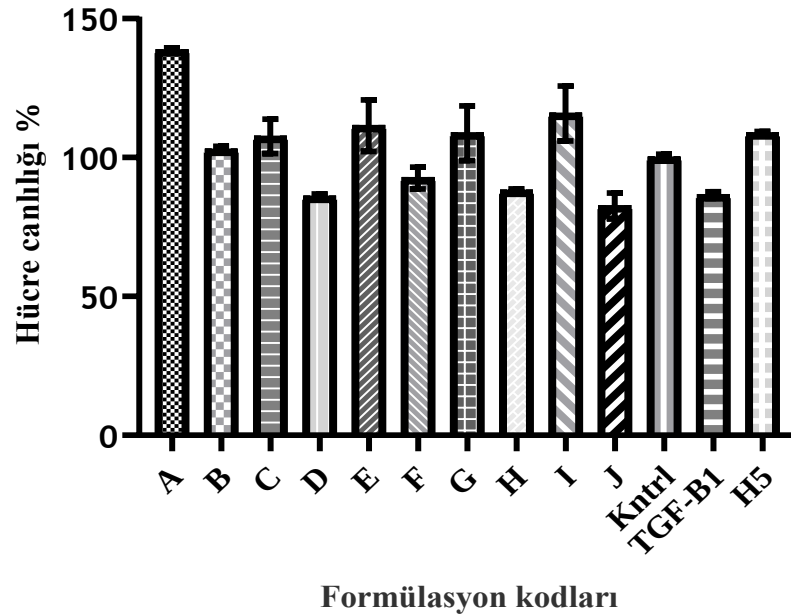
Formülasyon kodları	I	II	III	% Canlılık Ort.±SS
A	142,86	153,01	145,69	147,2±5,23
B	162,93	172,73	164,7	166,8±5,22
C	157,5	159,15	158,09	158,2±0,83
D	180,05	172,85	181,46	178,1±4,61
E	241,09	242,5	231,88	238,5±5,76
F	288,9	289,96	311,57	296,8±12,79
G	190,91	166,35	207,08	188,1±20,51
H	292,44	285,36	252,89	276,9±21,09
I	153,13	133,41	133,29	139,9±11,42
J	194,81	193,51	195,63	194,7±1,06
TGF-β1	103,66	106,26	104,13	104,7±1,38
Kontrol	99,53	99,65	100,83	100,0±0,71



Şekil 93. NIH-3T3 fibroblast hücre hattında PLGA nanopartiküllerin ve H5 kodlu PVA/Kitozan hidrojelin sitotoksisite % grafiği.

Tablo 27. PLGA nanopartiküllerin HaCaT hücre hattındaki sitotoksosite sonuçları.

Formülasyon kodları	I	II	III	% Canlılık Ort.±SD
A	137,802	139,438	138,784	138,7±0,82
B	102,354	104,251	102,158	102,9±1,15
C	114,716	103,532	104,578	107,6±6,17
D	85,808	86,985	85,154	85,98±0,92
E	121,648	109,091	103,597	111,4±9,25
F	94,375	88,162	95,422	92,65±3,92
G	119,751	105,625	100,916	108,8±9,80
H	87,508	88,62	88,293	88,14±0,57
I	126,357	114,323	106,736	115,8±9,89
J	80,51	79,398	87,901	82,60±4,62
TGF-β1	86,789	87,574	85,219	86,53±1,19
Kontrol	98,757	100,981	100,327	100,0±1,14



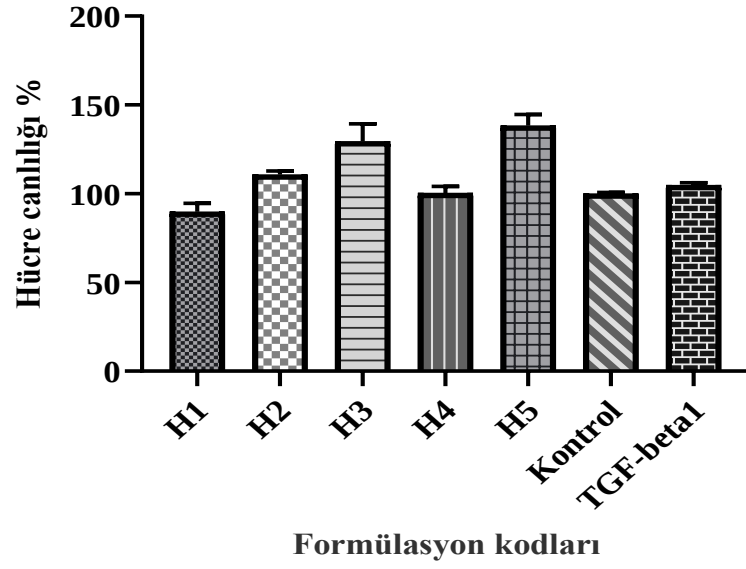
Şekil 94. HaCaT keratinosit hücre hattında PLGA nanopartiküllerin ve H5 kodlu PVA/Kitozan hidrojel sitotoksosite % grafiği.

6.6.1.2. PVA/Kitozan hidrojellerin hücre canlılığı deneyine ait bulgular

PVA/Kitozan hidrojeller nanopartiküllerin topikal uygulanması için geliştirilmiştir ve her iki hücre hattı üzerinde sitotoksosite değerlendirilmesi MTT deneyi ile yapılmıştır. **Tablo 28**'de ve **Tablo 29**'de sırasıyla fibroblast ve keratinosit hücre hatları üzerinde hidrojellerin üç tekrarlı çalışılmış ve yüzde sonuçları ortalama ve standart sapmaları ile birlikte verilmiştir. Nanopartikül içeren ve içermeyen tüm hidrojellerin hücre canlılığı üzerine etkisi 24 saatlik deney sonucu gözlemlenmiştir. **Şekil 95** ve **Şekil 96**'te elde edilen sonuçların % canlılık grafikleri belirtilmiştir. Kontrole kıyasla H2, H3 ve H5 hidrojel formülasyonları anlamlı ölçüde hücre canlılığında artış sağlamıştır ($p<0,05$).

Tablo 28. PVA/Kitozan hidrojellerin NIH-3T3 hücre hattındaki sitotoksosite sonuçları.

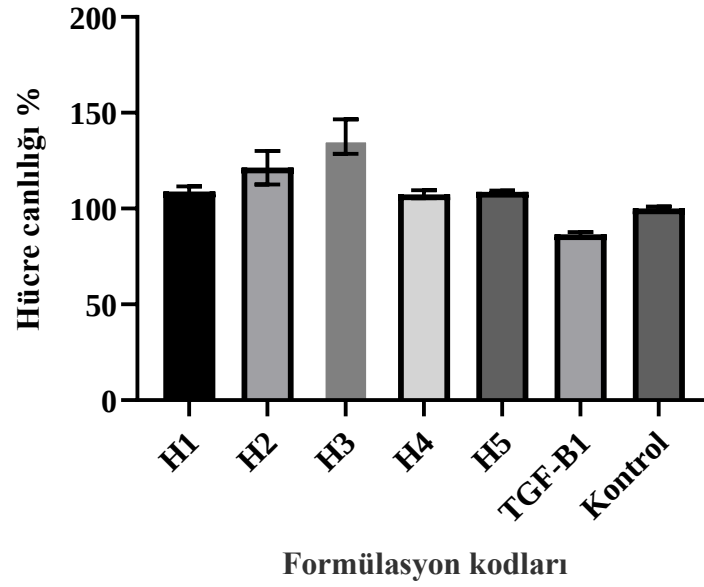
Formülasyon kodları	I	II	III	% Canlılık Ort.±SD
H1	84,65	93,98	90,79	89,81±4,74
H2	111,22	108,62	112,51	110,8±1,98
H3	122,08	140,73	125,5	129,4±9,92
H4	97,17	99,41	104,49	100,4±3,75
H5	145,57	135,18	133,88	138,2±6,40
TGF-β1	103,66	106,26	104,13	104,7±1,38
Kontrol	99,53	99,65	100,83	100,0±0,71



Şekil 95. NIH-3T3 fibroblast hücre hattında PVA/Kitozan hidrojenlerin sitotoksosite % grafiği.

Tablo 29. PVA/Kitozan hidrojenlerin HaCaT hücre hattındaki sitotoksosite sonuçları.

Formülasyon kodları	I	II	III	% Canlılık Ort.±SD
H1	108,764	106,213	111,576	108,9±2,68
H2	111,576	128,646	123,806	121,3±8,79
H3	147,94	132,701	132,178	137,6±8,95
H4	106,736	105,821	109,876	107,5±2,12
H5	109,494	108,518	108,341	108,8±0,62
TGF-β1	86,789	87,574	85,219	86,53±1,19
Kontrol	98,757	100,981	100,327	100,0±1,14



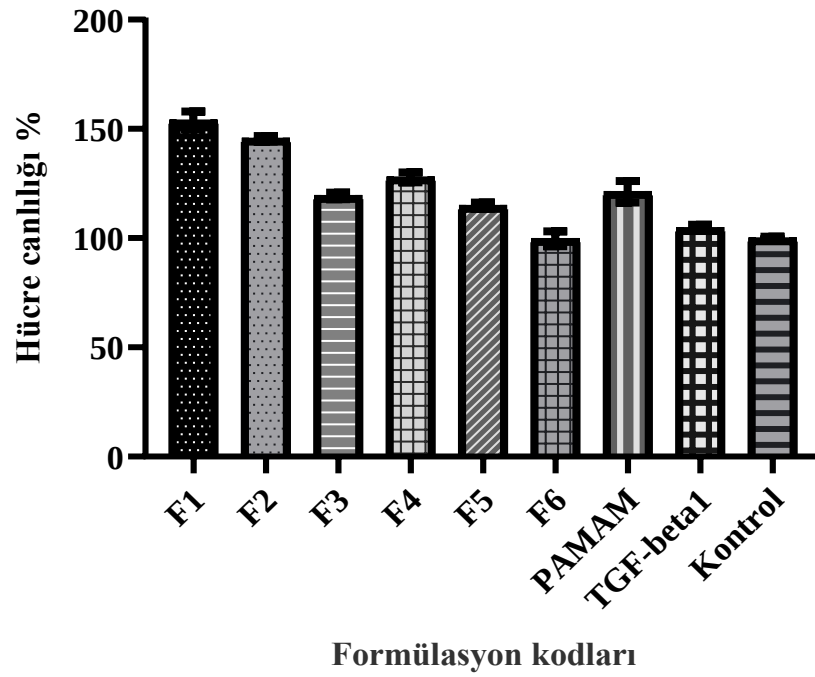
Şekil 96. HaCaT keratinosit hücre hattında PVA/Kitozan hidrojellerin sitotoksosite % grafiği.

6.6.1.3. PAMAM/PVA hidrojellerin hücre canlılığı deneyine ait bulgular

PAMAM/PVA hidrojellerin her iki hücre hattı üzerine sitotoksosite değerlendirilmesi için MTT deneyi yapılmıştır. Hem rhTGF-β1 içeren hemde içermeyen hidrojellerin hücre canlılığı üzerine etkisi 24 saatlik deney sonucu gözlemlenmiştir. **Tablo 30** ve **Tablo 31**'de sırasıyla fibroblast ve keratinosit hücre hatları üzerinde PAMAM/PVA hidrojeller üç tekrarlı çalışılmış ve yüzde sonuçları ortalama ve standart sapmaları ile birlikte verilmiştir. **Şekil 97** ve **Şekil 98**'de elde edilen sonuçların % canlılık grafikleri belirtilmiştir. Ayrıca bu grafiklere sadece PAMAM polimeri ve rhTGF-β1 protein de eklenerek verilerin kıyaslaması yapılmıştır.

Tablo 30. PAMAM/PVA hidrojenlerin NIH-3T3 hücre hattındaki sitotoksikite sonuçları.

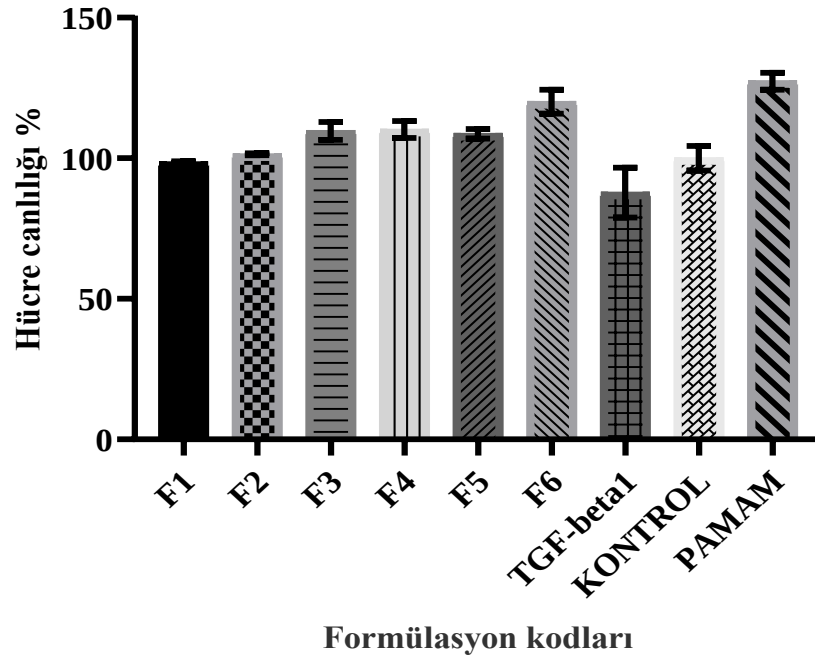
Formülasyon kodları	I	II	III	% Canlılık Ort.±SD
F1	155,253	149,232	157,142	153,9±4,13
F2	146,989	144,982	144,392	145,5±1,36
F3	118,772	121,015	118,063	119,3±1,54
F4	125,501	129,988	127,863	127,8±2,24
F5	115,702	113,223	115,584	114,8±1,39
F6	96,340	99,409	103,187	99,65±3,43
PAMAM	115,820	125,619	122,196	121,2±4,97
TGF-β1	103,66	106,26	104,13	104,7±1,38
Kontrol	99,527	99,645	100,826	100,0±0,71



Şekil 97. NIH-3T3 fibroblast hücre hattında PAMAM/PVA hidrojenlerin sitotoksikite % grafiği.

Tablo 31. PAMAM/PVA hidrojellerin HaCaT hücre hattındaki sitotoksosite sonuçları.

Formülasyon kodları	I	II	III	% Canlılık Ort.±SD
F1	98,225	98,669	98,935	98,61±0,3587
F2	101,508	101,686	101,065	101,4±0,3198
F3	110,559	106,211	112,422	109,7±3,187
F4	108,429	108,518	113,665	110,2±2,998
F5	108,696	110,382	106,921	108,7±1,731
F6	118,811	124,845	116,681	120,1±4,235
PAMAM	130,79	125,2	126,176	127,4±2,986
TGF-β1	79,68057	97,33807	86,3354	87,78±8,918
Kontrol	103,017	102,041	95,031	100,0±4,356



Şekil 98. HaCaT keratinosit hücre hattında PAMAM/PVA hidrojellerin sitotoksosite % grafiği.

6.6.2. BrdU hücre proliferasyon deneyine ait bulgular

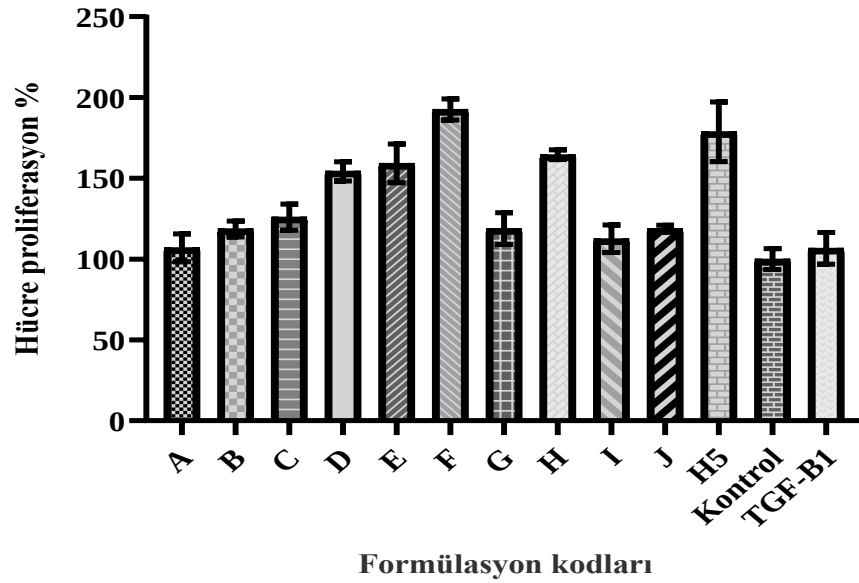
5.2.8.2’de belirtilen yönteme göre 96 kuyucuklu plakalarda çalışma gerçekleştirilmiştir. Hazırlanan tüm farmasötik formlar BrdU çalışmasında; yara iyileşmesinde in vitro etkinlik açısından yaygın olarak kullanılan NIH-3T3 fibroblast ve HaCaT keratinosit hücre hatları üzerinde değerlendirilmiştir. Bu deneyde hazırlanan formülasyonların hücre proliferasyonu üzerinde etkinliklerinin belirlenmesinde rol oynamıştır. Deneyde yer alan kontrol gruplarını içeren kuyular sadece DMEM besiyeri ve ilgili hücreyi içermektedir. PAMAM/PVA hidrojellerde kullanılan PAMAM dendrimerin formülasyonlarda içerdiği miktar olan %10 (a/h) konsantrasyonunda kuyu başına 25 l eklenmiştir ve hücre proliferasyon etkisi incelenmiştir. rhTGF- 1 proteini de kuyu başına 2.5ng/25 l olacak şekilde eklenerek etkinliği değerlendirilmiştir.

6.6.2.1. PLGA Nanopartiküllerin BrdU hücre proliferasyon deneyin ait bulgular

PLGA nanopartiküllerin her iki hücre hattı üzerinde proliferasyon etkisi değerlendirilmiştir. Hem rhTGF- 1 içeren hemde içermeyen PLGA nanopartiküllerin proliferasyon etkinliği 24 saatlik deney sonucu gözlemlenmiştir. **Tablo 32** ve **Tablo 33**’de sırasıyla fibroblast ve keratinosit hücre hatları üzerinde PLGA nanopartiküller üç tekrarlı çalışılmış ve yüzde sonuçları ortalama ve standart sapmaları ile birlikte verilmiştir. **şekil 99** ve **şekil 100**’de elde edilen sonuçların % proliferasyon grafikleri belirtilmiştir. Ayrıca bu grafiklere nanopartikül içeren H5 PVA/Kitozan hidrojeli de eklenerek verilerin kıyaslaması yapılmıştır.

Tablo 32. PLGA nanopartiküllerin NIH-3T3 hücre hattındaki hücre proliferasyon sonuçları.

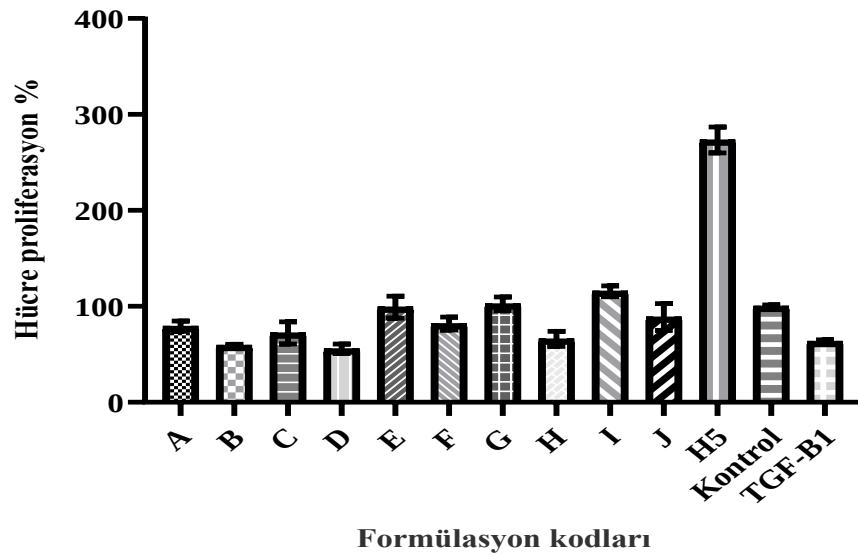
Formülasyon kodları	I	II	III	% Proliferasyon Ort.±SD
A	113,143	110,857	97,143	107,0±8,65
B	122,286	113,143	120,571	118,7±4,86
C	127,429	133,143	117,143	125,9±8,10
D	157,714	147,429	157,714	154,3±5,93
E	160	146,857	170,857	159,2±12,02
F	200	190,286	187,429	192,6±6,59
G	109,714	117,714	129,143	118,9±9,76
H	163,429	168	162,286	164,6±3,02
I	118,857	116	102,857	112,6±8,53
J	121,143	118,286	117,143	118,9±2,06
TGF-β1	117,714	103,429	98,857	106,7±9,83
Kontrol	104	103,429	92,571	100,0±6,44



Şekil 99. NIH-3T3 fibroblast hücre hattında PLGA nanopartiküllerin hücre proliferasyon % grafiği.

Tablo 33. PLGA nanopartiküllerin HaCaT hücre hattındaki hücre proliferasyon sonuçları.

Formülasyon kodları	I	II	III	% Proliferasyon Ort.±SS
A	82,616	82,1	73,15	79,29±5,322
B	58,864	60,585	59,036	59,50±0,947
C	59,208	80,379	77,453	72,35±11,47
D	53,528	61,618	52,324	55,82±5,054
E	112,22	90,878	94,492	99,20±11,42
F	89,329	76,076	80,551	81,99±6,742
G	95,888	102,056	109,985	102,6±7,067
H	58,176	74,01	66,093	66,09±7,917
I	110,327	115,318	121,515	115,7±5,605
J	103,614	87,263	75,731	88,87±14,01
TGF-β1	65,232	63,511	61,79	63,51±1,721
Kontrol	101,205	100,344	98,451	100,0±1,409



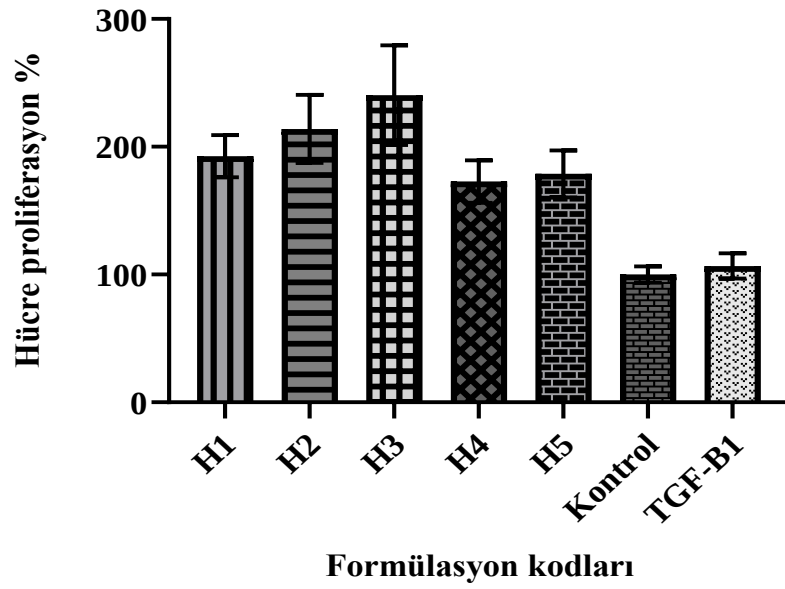
Şekil 100. HaCaT keratinosit hücre hattında PLGA nanopartiküllerin hücre proliferasyon % grafiği.

6.6.2.2. PVA/Kitozan hidrojenlerin BrdU hücre proliferasyon deneyine ait bulgular

PVA/Kitozan hidrojenler, nanopartiküllerin topikal uygulanmasını kolaylaştırmak ve yara tedavisine taşıyıcı sistem etkinliğini ve katkısını açısından geliştirilmiştir. Her iki hücre hattı üzerinde hücre proliferasyon etkinliği incelenmiştir. **Tablo 34**'de ve **Tablo 35**'de sırasıyla fibroblast ve keratinosit hücre hatları üzerinde hidrojenlerin üç tekrarlı çalışılmış ve yüzde sonuçları ortalama ve standart sapmaları ile birlikte verilmiştir. **Şekil 101** ve **Şekil 102**'de elde edilen sonuçların % proliferasyon grafikleri belirtilmiştir. Ayrıca bu grafiklere F kodlu nanopartikül içeren H5 PVA/Kitozan hidrojel formülasyonu da eklenerek hücre proliferasyonu üzerine 24 saatlik etkisi gözlemlenmiştir.

Tablo 34. PVA/Kitozan hidrojenlerin NIH-3T3 hücre hattındaki hücre proliferasyon sonuçları.

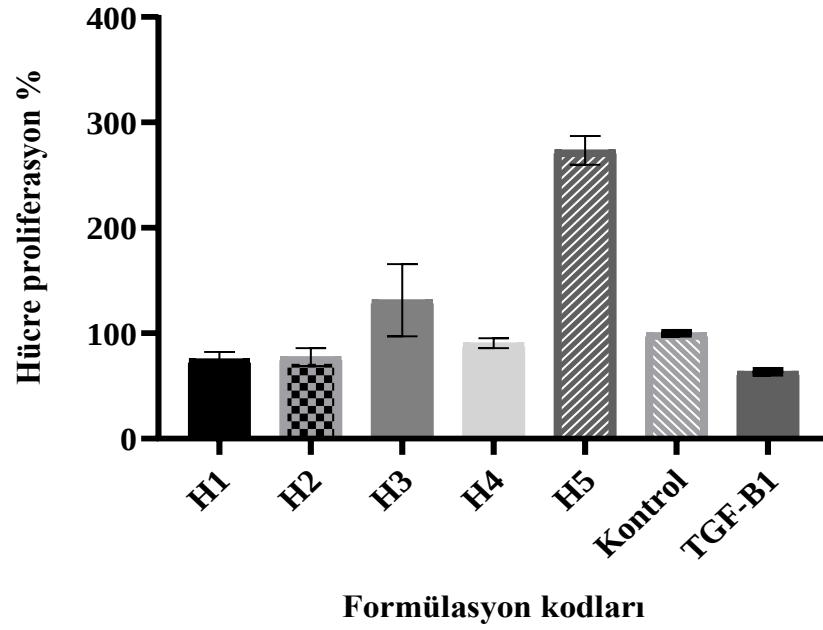
Formülasyon kodları	I	II	III	% Proliferasyon Ort.±SD
H1	180,571	211,428	185,714	192,6±16,53
H2	232,571	225,714	183,428	213,9±26,61
H3	226,285	284,571	210,285	240,4±39,10
H4	188,571	174,285	155,428	172,8±16,62
H5	190,541	188,288	157,658	178,8±18,37
TGF-β1	117,714	103,429	98,857	106,7±9,83
Kontrol	104	103,429	92,571	100,0±6,44



Şekil 101. NIH-3T3 fibroblast hücre hattında PVA/Kitozan hidrojelilerin hücre proliferasyon % grafiği.

Tablo 35. PVA/Kitozan hidrojelilerin HaCaT hücre hattındaki hücre proliferasyon sonuçları.

Formülasyon kodları	I	II	III	% Proliferasyon Ort.±SD
H1	76,936	67,469	81,067	75,16±6,971
H2	76,248	69,363	86,231	77,28±8,481
H3	114,114	170,912	109,122	131,4±34,32
H4	85,198	94,492	92,083	90,59±4,82
H5	277,969	284,165	258,175	273,4±13,57
TGF-β1	65,232	63,511	61,79	63,51±1,72
Kontrol	101,205	100,344	98,451	100,0±1,40



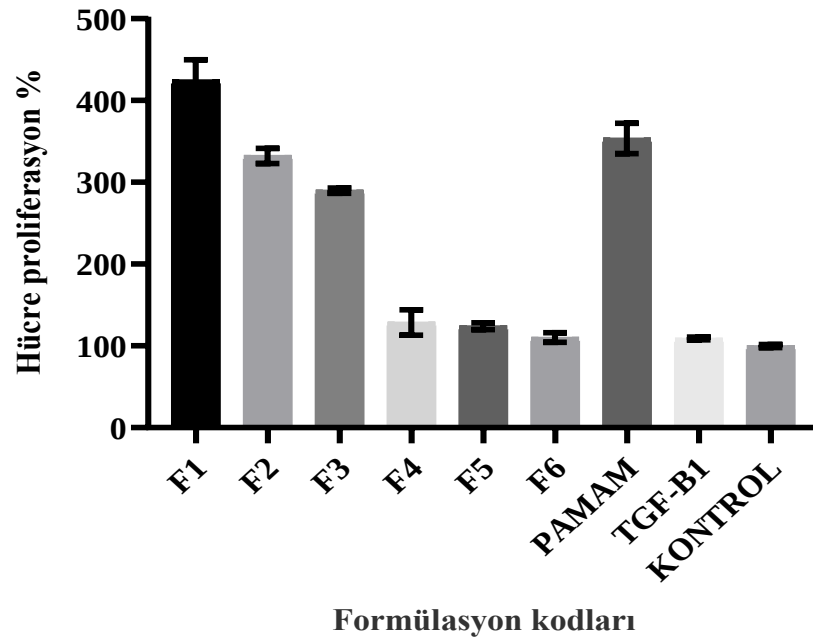
Şekil 102. HaCaT keratinosit hücre hattında PVA/Kitozan hidrojenlerin hücre proliferasyon % grafiği.

6.6.2.3. PAMAM/PVA hidrojenlerin BrdU hücre proliferasyon deneyine ait bulgular

PAMAM/PVA hidrojenlerin her iki hücre hattı üzerinde hücre proliferasyon etkinliği yapılmıştır. Hem rhTGF- β 1 içeren hemde içermeyen hidrojenlerin proliferasyon üzerine etkisi 24 saatlik deney sonucu ile gözlemlenmiştir. **Tablo 36** ve **Tablo 37**'de sırasıyla fibroblast ve keratinosit hücre hatları üzerinde PAMAM/PVA hidrojenler üç tekrarlı çalışılmış ve yüzde sonuçları ortalama ve standart sapmaları ile birlikte verilmiştir. **Şekil 103** ve **Şekil 104**'de elde edilen sonuçların % proliferasyon grafikleri belirtilmiştir. Ayrıca bu grafiklere sadece PAMAM polimeri ve rhTGF- β 1 protein de eklenerek verilerin kıyaslaması yapılmıştır. Elde edilen sonuçlara göre PAMAM/PVA hidrojenlerin tek başına protein uygulanan kuyucuklardaki proliferasyona kıyasla anlamlı artış sağladığı gösterilmiştir ($p < 0,05$).

Tablo 36. PAMAM/PVA hidrojellerin NIH-3T3 hücre hattındaki hücre proliferasyon sonuçları.

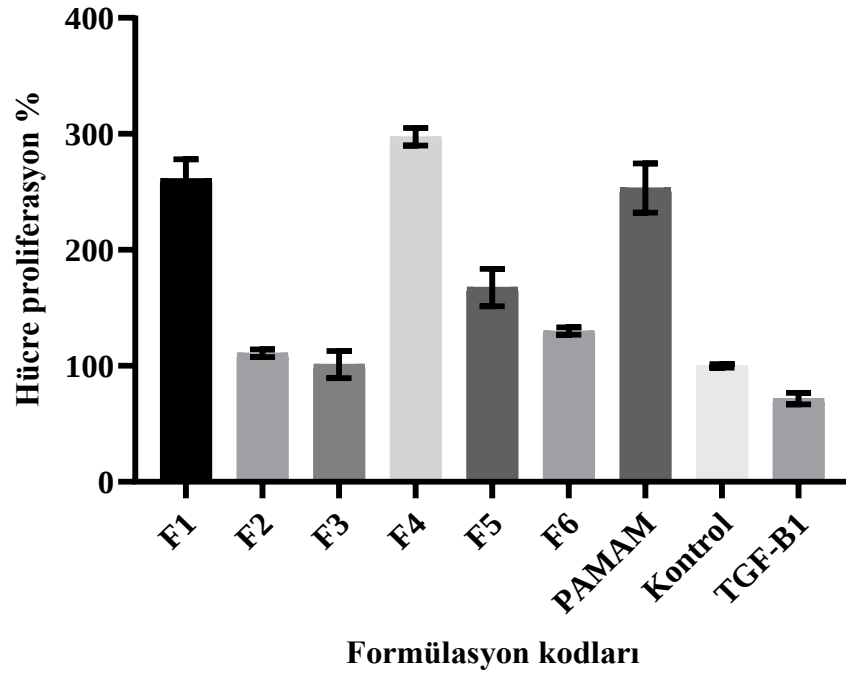
Formülasyon kodları	I	II	III	% Proliferasyon Ort.±SD
F1	444,595	433,333	396,847	424,9±24,96
F2	340,991	333,333	322,523	332,3±9,27
F3	291,892	291,441	286,036	289,8±3,25
F4	146,396	120,721	118,468	128,5±15,51
F5	125,225	127,477	119,369	124,0±4,18
F6	103,603	113,513	113,513	110,2±5,72
PAMAM	338,739	347,748	374,324	353,6±18,50
TGF-β1	107,658	110,811	108,559	109,0±1,62
Kontrol	101,802	98,198	99,55	99,85±1,82



Şekil 103. NIH-3T3 fibroblast hücre hattında PAMAM/PVA hidrojellerin hücre proliferasyon % grafiği.

Tablo 37. PAMAM/PVA hidrojelilerin HaCaT hücre hattındaki hücre proliferasyon sonuçları.

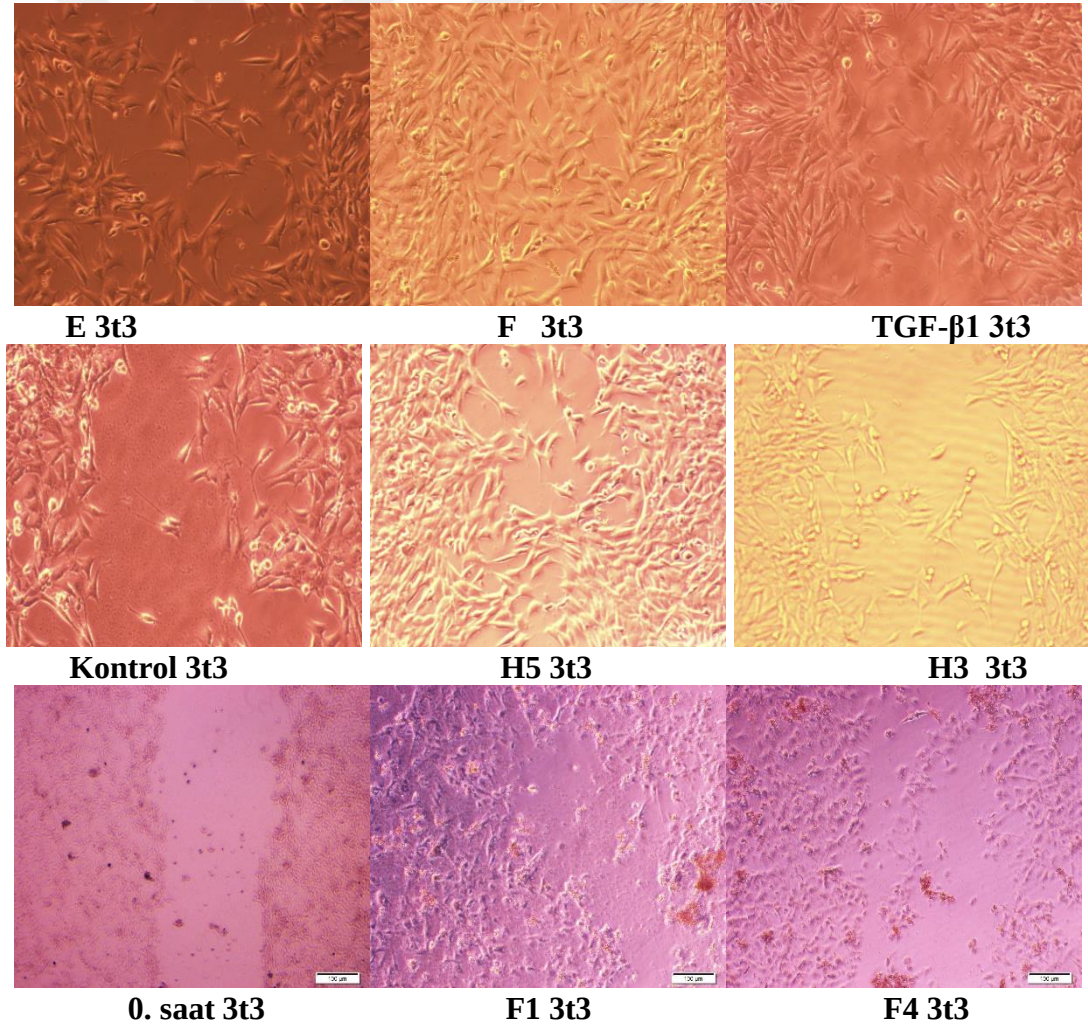
Formülasyon kodları	I	II	III	% Proliferasyon Ort.±SS
F1	274,182	267,47	241,824	261,2±17,08
F2	108,95	109,122	114,802	111,0±3,33
F3	112,392	88,985	102,065	101,1±11,73
F4	299,139	303,959	289,157	297,4±7,55
F5	149,914	181,239	171,429	167,5±16,02
F6	126,334	132,53	130,981	129,9±3,22
PAMAM	230,809	255,766	272,978	253,2±21,20
TGF-β1	66,437	72,289	76,248	100,0±1,40
Kontrol	100,344	98,451	101,205	71,66±4,93



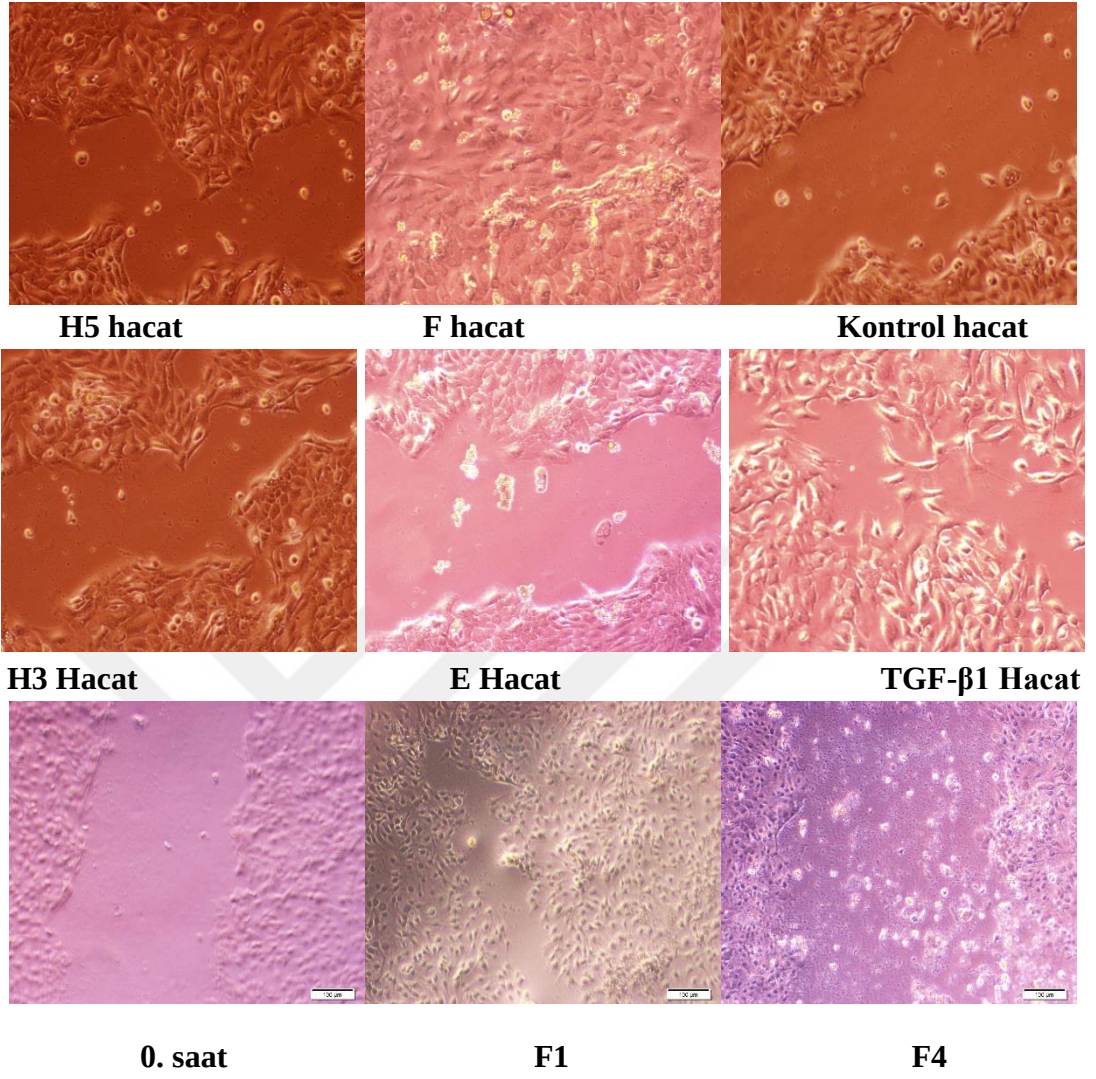
Şekil 104. HaCaT keratinosit hücre hattında PAMAM/PVA hidrojelilerin hücre proliferasyon % grafiği.

6.6.3. *In vitro* yara iyileştirme deneyine (Scratch deneyi) ait bulgular

5.2.8.3'te belirtilen yöntemeye uygun şekilde strach testi kullanılarak protein içeren ve içermeyen PLGA nanopartiküllerin, PVA/Kitozan hidrojellerin ve PAMAM/PVA hidrojellerin ilaç taşıyıcı sistemler olarak tek başına ve rhTGF- β 1 ile kombine etkilerini hücre migrasyonu temel alınarak incelenmiştir. Tek hücreli ve yapay olarak hasar almış bir yaranın kapanmasını hızlandırma yeteneğinin araştırılması amaçlanmıştır. Karakterizasyon çalışmaları sonucunda E ve F kodlu nanopartikül, H3 ve H5 kodlu hidrojeller ve F1 ile F4 PAMAM/PVA hidrojel formülasyonları seçilmiştir. Sıfırıncı saatte ve 37 °C'de %5 CO₂ 'de 48 saatlik bir onarım süresinden sonra kuyuların resimleri çekilmiştir. Bu deney hem keratinosit hem de fibroblast hücre hatlarına uygulanmıştır. Deney her hücre hattı için (n=3) kuyu şeklinde ve üç kez tekrarlanmıştır.



Resim 7. NIH-3T3 fibroblast hücre migrasyon görüntüleri.



Resim 8. HaCaT keratinosit hücre migrasyon görüntüleri.

7. TARTIŞMA VE SONUÇ

Tez çalışması kapsamında geçmişten günümüze kadar devam eden, yara iyileşme prosesinde yer alan rhTGF- β 1 proteinin etkinliğine ve farklı taşıyıcı sistemler ile bu etkinin farklı hücre hatlarındaki davranışı ve etkinliği değerlendirilmiştir. rhTGF- β 1 proteinin yara iyileşme sürecinde hücre canlılığı, hücre proliferasyonunda ve migrasyonundaki rolü bilinmekle beraber farklı taşıyıcı sistemler aracılığı ile protein stabilitesi sağlanması ve taşıyıcı sistem katkılı kombinasyonlu etki incelenmiştir.

Yara tedavisi, dünyadaki en yaygın ve ekonomik olarak maliyetli sağlık sorunlarından biri olmaya devam etmektedir. Mevcut tedavi seçenekleri sınırlıdır ve karşılanamayan klinik ihtiyaçları karşılamak için yeni terapötiklerin geliştirilmesine ihtiyaç duyulmaktadır. Birçok yara iyileştirici ajanın keşfedilmesiyle beraber bunların çoğu *in vitro* ve *in vivo* koşullarda hassas moleküller olup stabilite sorunları yaşanabilmektedir. Bu yüzden etkin moleküllerin yanısıra ilaç taşıyıcı sistemlerde bu alanda oldukça önemlidir (Dorantes ve Ayala, 2019). Yara tedavisinde birçok büyüme faktörü ve ilaç taşıyıcı sistemler denenmiştir. Bunlar arasında nanosistemler ve özellikle PLGA nanopartiküller sıkça tercih edilmektedir. Biyouyumlu, FDA onaylı sitotoksik olmayan bu polimer yara iyileşme mekanizmasında ayrıca polimerin yapısal avantajına da sahiptir. PLGA; laktik ve glikolik asitin belli oranlarda karışımıyla oluşan bir kopolimerdir, Bu polimer hidrolize uğradığında ortaya çıkan laktik asit laktat indüksiyonu sağlamaktadır ki bu da yaralı alanda anjiyogenezi artırarak iyileşmeyi pozitif yönlü ivmelendirmektedir (Saghazadeh ve ark., 2018; Naves ve ark., 2017).

rhTGF- β 1 proteini uygulama protokülüne göre alikotlanıp -80° C’de yapılacak çalışmalar için saklanmıştır. Proteinde yapılan SDS-PAGE kontrolü **Resim 2**’de gösterilmiştir. Alikotlanma sırasında stabilizan olarak içerisine eklenen BSA miktarı da fragmentlerini içerecek şekilde kontroldeki BSA (66 kDa) kuyularıyla kıyaslanmış ve rh TGF- β 1’ya ait 25 kDa büyüklüğündeki bant jelde gösterilmiştir.

rhTGF- β 1 proteini için yapılan diğer bir kontrol ise biyoaktivite testidir. Jaclenec ve arkadaşlarının çalışmasında belirttiği yöntemle rekonstitüe rhTGF- β 1 proteinin IL-4 indüksiyonlu HT-2 hücre inhibisyonu ile biyolojik aktivitesi tespit edilmiştir ve proteinin doza bağımlı aktivitesi **Şekil 28**'deki hücre canlılığı grafiği ile gösterilmiştir (Jaclenec ve ark., 2008). IL-2 bağımlı T lenfosit hücresi olan HT-2, IL-4 varlığında hücre proliferasyonunu indüklemektedir (Kupper ve ark., 1987). **Şekil 28**'deki grafik sonuçlarına göre IL-4 ekli grup kontrol grubuna kıyasla hücre canlılığında %19,1 ile anlamlı bir artış sağlamıştır ($p < 0,05$). rhTGF- β 1'in biyolojik aktivitesi IL-4 varlığındaki HT-2 hücre inhibisyonuna dayanmaktadır. 5 ng ile 50 ng arasındaki belirtilen dozların hepsi kontrole kıyasla inhibisyon sağlamıştır ve istatistiksel olarak anlamlıdır ($p < 0,05$). TGF- β 1'in doza bağımlı inhibisyon etkisi 5-30 ng aralığında korelasyon göstermesede 30 ng'dan sonraki dozlarda, doza bağımlı inhibisyon görülmüştür.

TGF- β 1 proteinin hidrofilik yapısı nedeniyle nanopartiküllerin hazırlanması için ikili emülsiyon çözücü buharlaştırma yöntemi seçilmiştir (Defail ve ark., 2006). Birçok parametre nanopartiküllerin fizikokimyasal özelliklerini etkilemektedir. Bunlar arasında polimer konsantrasyonu, dış fazdaki PVA konsantrasyonu, ilaç konsantrasyonu, nanopartikül boyutu, zeta potansiyeli, polidispersite indeksi, enkapsülasyon etkinliği, polimer için kullanılan organik çözücü ve karıştırma hızı başlıca yer almaktadır (Huang ve Zhang, 2018).

Poli(D,L-laktik-ko-glikolik) (PLGA) polimeri olarak Resomer® RG 503 H asit terminalli formu tercih edilmiştir. Tercih edilme sebebi laktik asit(LA) : glikolik asit (GA) 50:50 formu kolay hidrolize olup daha hızlı salım yapabilmesidir. Genellikle, peptit-protein yapısındaki büyüme faktörlerinin stabilitesini sağlamak için BSA proteini kullanılmaktadır ve çalışmamızda % 0,1 BSA içinde rhTGF- β 1 hazırlanmıştır. PLGA zincirinin karboksilik asit bölgesi proteinle etkileşimi artırır ve proteinin nanopartiküle daha iyi enkapsüle olmasını sağlamaktadır. Sonuç olarak yüksek enkapsülasyon etkinliği sağladığı belirtilmektedir (Jaclenec ve ark., 2008 Nisan; Jaclenec ve ark., 2008 Ocak).

% 1, % 2, % 3, % 4 ve % 5 PLGA konsantrasyonlarını içeren formülasyonlarda, protein içeren nanopartiküller boyut olarak boş olanlardan daha büyüktür ve istatistiksel olarak anlamlılık göstermiştir ($p < 0,05$).

Huang ve Zhang yaptıkları PLGA nanopartikül çalışmasında artan PLGA polimer konsantrasyonunun partikül boyutunda artış sağladığını bildirmişlerdir (Huang ve Zhang, 2018). Bizim çalışmamızda artan polimer konsantrasyonuna karşı nanopartikül boyutunda doğrusal bir artış gözlenmemiştir. Bunun nedeni nanopartikül hazırlama yönteminin farklılığı ve PLGA'nın çözündüğü organik solvanın farklılığı olabilmektedir (Astete ve Sabliov, 2006). 20-200 nm aralığındaki nanopartiküller, dendritik hücreler tarafından endositoz veya pinositoz yoluyla etkili bir şekilde hücreye alınırlar. Zolnik ve arkadaşlarının yaptıkları bir çalışmada yaklaşık 25 nm boyutundaki polimerik nanopartiküllerin lenf nodlarındaki dendritik hücrelerde daha çok biriktiğini ve immün yanıtı uyardıklarını belirtmişlerdir (Zolnik ve ark., 2010). 0,5-5 µm'lik partiküller ise fagositoz veya makropinositoz ve humoral yanıtı uyatabilmektedirler (Silva ve ark., 2016). Bu verilere göre 200-500 nm, bağışıklık sistemi açısından en uygun boyut olarak değerlendirilmektedir. Çalışmamızdaki nanopartiküllerin boyut aralığı da bu veriler ile uyumlu bulunmuştur.

PLGA nanopartiküllerin dış fazında yer alan PVA, non-iyonik sürfaktan gibi rol alarak nanopartiküle negatif bir yüzey yükü sağlamaktadır. Bu yüzden nanopartiküllerin negatif zeta potansiyeline sahip olması beklenen bir durumdur (Davda ve Labhasetwar, 2005). Protein içeren ve içermeyen nanopartikül formülasyonlarının zeta potansiyeli (**Tablo 11**) açısından aralarında istatistiksel bir anlamlılık yoktur ($p > 0,05$). Nanopartiküllerin zeta potansiyeli değerleri $-29,6 \pm 2,1$ ve $-26,8 \pm 0,9$ arasındadır. Farklı PLGA polimer konsantrasyonu da zeta potansiyeli üzerinde istatistiksel olarak anlamlı bir farklılık göstermemiştir ($p > 0,05$).

PLGA nanopartiküllerin enkapsülasyon etkinliği $\% 98,8 \pm 0,2$ ile $\% 99,8 \pm 0,04$ arasındadır, bu da oldukça yüksek bir orandır (**Tablo 13**). Artan polimer konsantrasyonu ile enkapsülasyon etkinliğinde genellikle artış beklenmektedir (Chaisri ve ark., 2009). Yapılan başka bir çalışmada Barisitinib molekülü için PLGA konsantrasyonu arttıkça enkapsülasyon oranında artış olduğu belirtilmiştir (Ansari ve Alshahrani, 2019). Yaptığımız çalışmada formülasyon B, istatistiksel olarak en düşük enkapsülasyon etkinliğine sahiptir ($p < 0,05$). Diğer formülasyonlar ise enkapsülasyon etkinliği birbirine yakın olduğu için istatistiksel olarak anlamlı değildir ($p > 0,05$). Tüm formülasyonlar yüksek oranda protein enkapsülasyonu

sağlamıştır. Vaidya ve arkadaşları % 25-50 aralığında enkapsülasyon etkinliğine sahip mikro ve nanopartikülleri belirtmişlerdir. Çalışmamızda elde ettiğimiz enkapsülasyon etkinliği bu çalışmalar ile kıyaslandığında oldukça yüksek bir sonuç sağlamıştır (Vaidya, 2012; Lu ve ark., 2000; Jhunjhunwala ve ark., 2012).

Polidispers indeks, bir kümülatif analiz kullanılarak korelasyon fonksiyonundan elde edilir. Özellikle koloidal sistemler (nanopartiküller, mikropartiküller, süspansiyonlar vs.) için oldukça önemli bir parametredir. Formülasyonun boyut dağılımı, homojenite ve agregasyon hakkında bilgi vermektedir. PDI değeri 0,7'den büyük ise geniş boyut dağılımına sahip olduğu bilinmektedir. PDI değeri olarak 0,05-0,7 aralığı kabul görmekle beraber düşük PDI değerleri partikül büyüklüğünün homojen olduğunu göstermektedir. 0,05-0,3 PDI aralığı yaygın olarak kabul görmektedir (Brito ve ark., 2019; Danaei ve ark., 2018). Tez kapsamında hazırlanan nanopartiküllerin PDI değerleri 0,281-0,346 aralığındadır. Bu değerler boyut dağılımı açısından uygun bulunmuştur (**Şekil 30**). SEM fotoğraflarında (**Resim 3 ve Resim 4**) heterojen boyutlarda nanopartiküller yer alsa da elde ettiğimiz PDI değerleri boyut dağılımının homojen olarak değerlendirilebileceğini göstermektedir.

PLGA nanopartiküllerin hazırlanması sonucu % verimleri **Tablo 12**'de belirtildiği gibidir. En yüksek verim F kodlu nanopartikülde, en düşük verim D kodlu nanopartiküle aittir. Nanopartiküllerin hazırlanması sırasında santrifüjleme ve liyofilizasyon aşamaları verimin düşmesine neden olabileceği düşünülmektedir.

Hazırladığımız nanopartiküllerin FT-IR analizleri **Şekil 31, 32, 33 ve 34**'de gösterilen kimyasal yapılara ait pikler ayrıntılı şekilde bölüm 6.3.4'de belirtilmiştir. Bu analiz sonucunda rhTGF- β 1 proteini PLGA nanopartikül içerisine enkapsüle edildiği gösterilmiştir (Javadzadeh ve ark., 2010).

PLGA nanopartiküllerin morfolojik analizi SEM görüntülemesi ile yapılmıştır. Nanopartiküller düz ve küresel bir yüzeye sahiptir. Boyut açısından da Malvern Zetasizer ölçümleri ile uyumlu bulunmuştur.

DSC analizinde PLGA polimerin, protein içeren ve içermeyen nanopartiküllerin geçimlilik ve termal stabiliteleri değerlendirilmiştir. **Şekil 34**'de 52 °C 'de endotermik tepe PLGA'nın erime noktasıdır, Bu pik hem protein içermeyen hem de içeren nanopartiküllerde gözlemlenmiştir. TGF- β 1 içeren nanopartikül

formülasyonların fiziksel özelliklerinde bir değişiklik olmamıştır. Bunun doğrultusunda, TGF- β 1 proteini ve PLGA polimeri geçimli bulunmuştur (Yang ve ark., 2019).

PLGA nanopartiküllerden (B, D, F, H, J) rhTGF- β 1 proteinin salım davranışı iki fazlı bir sistem olarak gerçekleşmiştir. Başlangıçta bir patlama etkisi, ardından daha yavaş ve sürekli salım ile karakterizedir.

İlaç salım miktarları PLGA konsantrasyonuna bağlı olarak değişiklik göstermiştir. PLGA konsantrasyonu arttıkça, patlama etkisi azalmış ve daha yavaş bir salım meydana gelmiştir. Bu veriler *in vitro* salım çalışması açısından istatistiksel olarak anlamlılık göstermiştir ($p < 0,05$). B, D, F, H ve J formülasyonlarının ilaç salımı, **Şekil 35**'te gösterildiği gibi 30 gün sonunda sırasıyla % 35.1, % 25.2, % 24.3, % 19.06 olarak görülmüştür. En düşük (% 8.72) patlama etkisi % 5 PLGA konsantrasyonu, en yüksek oran ise (% 20.88) % 1 konsantrasyonda gözlenmiştir. Astete ve Sabliov'un çalışmasında da PLGA konsantrasyonu arttıkça salımdaki ilk patlama etkisinin azaldığı ve salım süresinin uzadığı bildirilmiştir (Astet ve Sabliov, 2006). İlk patlama etkisi, nanopartiküllerin yüzeyine bağlanan proteinlerin salınmasından kaynaklabilmektedir. Ayrıca, PLGA polimerinin ucundaki karboksilik asit grubunun varlığı, protein stabilizasyonu sağlayan BSA ile daha iyi etkileşime izin vererek; artan enkapsülasyon ve düşük patlama etkisi ile kontrollü bir salım elde edilmiştir (Jaclenec ve ark., 2008 Ocak).

Farklı PLGA konsantrasyonları içeren nanopartikül formülasyonları arasında biyoadeziv özellikler açısından anlamlı bir farklılık yoktur ($p > 0,05$). Tüm nanopartiküllerin *in vitro* biyoadezyon analiz grafikleri **Şekil 37, 38, 39, 40, 41, 42, 43, 44, 45, 46, 47, 48, 49, 50 ve 51**'de verilmiştir. Sezer ve arkadaşlarının fukoküreler ile yaptıkları çalışmada kitozanın 3 kat artışı, fukokürelerin biyoadezyon değerlerinde 2.5 kat artış sağlamıştır, 0,081'den 0,191 mJ / cm²'ye yükselmiştir (Sezer ve ark., 2008). Kitozanın doğal bir polimer olarak adeziv özelliği bilinmekle birlikte bizim çalışmamızda PLGA nanopartiküllerin biyoadezyon değerleri kitozan olmadan benzer bir aralıkta bulunmuştur. Bu nedenle, PLGA nanopartiküllerin göz ardı edilemeyecek bir biyoadezivlik sergilediği düşünülmektedir. Bu da; yaralı bölgeye uygulamada avantaj sağlamaktadır (Kockisch ve ark., 2003; Sezer ve ark., 2008).

Hazırladığımız PLGA nanopartiküllerin yara tedavisinde kullanım kolaylığı ve biyoadeziv özelliğinin artırılması açısından, topikal uygulamalarda yaygın olarak kullanılan hidrojel formülasyonu tercih edilmiştir. Geleneksel transdermal taşıyıcı sistemler arasında plasterler, yağlı sıvağa sahip pomadlar uzun dönem kullanım sonucu kontaminasyona, alerjik ve kısa yanıt süresine neden olabilmektedir. Bu da hidrojellerin tercih sebeplerinden biridir. Hidrojeller büyük miktarlarda suyu çözünmeden tutabilen çapraz bağlı hidrofilik polimerlerden oluşmaktadır. Seçilen polimerler hidrojel formülasyonlarında tercih edilen kitozan ve PVA polimeridir. Kitozan; katyonik, toksik olmayan, biyouyumlu, biyolojik olarak parçalanabilir, antimikrobiyal ve biyoadeziv özelliktedir. Kitozan bazlı hidrojeller genellikle diğer polimerlerle kombinasyon halinde üretilmektedir (Kamoun ve ark., 2017; Rafique ve ark., 2016).

PVA diğer polimerlerle karıştırılmaya uygun esneklik ve yüksek hidrofiliklik özelliklerinden dolayı tercih edilmiştir. Düşük toksisite ve kontrollü salım için uygun görülmüştür (Zu ve ark., 2012). Ayrıca yara tedavisinde kontaminasyon ciddi ve istenmeyen bir sorundur. PVA/Ktozan hidrojellerin Gram (-) ve Gram (+) bakterilere karşı etkili olması tercih edilme sebepleri arasındadır (Abdel-Mohsen ve ark., 2011).

PVA/Kitozan hidrojeller toksisiteye neden olabilecek çapraz bağlayıcı bir ajana gerek olmadan fiziksel bir yöntem olan dondurma-çözündürme metodu ile hazırlanmıştır (Hassan ve Peppas, 2000; Abdel-Mohsen ve ark., 2011; Lotfipour ve ark., 2019). PVA'nın ve kitozan çözeltisinin tekrarlanan dondurma-çözündürme döngüleri sulu çözeltide, çapraz bağlanma yerleri olarak işlev gören kristal yapıların oluşmasını sağlayarak çapraz bağlı ve yüksek bir şişme kapasitesine sahip bir hidrojel üretilmesini sağlamıştır. (Cascone ve ark., 1999).

Tez çalışmamızda hazırlanan PVA/Kitozan hidrojellerde dondur-çöz döngüsü iki siklus şeklinde yapılmıştır. Çünkü artan döngü sayıları çapraz bağlanmayı artırmakla beraber hidrojelin su tutma kapasitesinde azalmaya neden olmaktadır. Hosseini ve arkadaşları ve PVA/Kitozan hidrojellerde yaptıkları çalışmada da döngü sayısının su tutma kapasitesini etkilediğini ve dondur-çöz sikluslarının artışının çapraz bağlanmayı artırdığını ve sonuç olarak hidrojejin su tutma kapasitesini azalttığını belirtmişlerdir (Hosseini ve ark., 2012). Hazırladığımız hidrojel

formülasyonlarında kitozan konsantrasyonu sabit tutularak kitozanın adeziv ve antimikrobiyal özelliklerini alırken sınırlı su tutma kapasitesi ve mekanik gücünü artırmak için farklı PVA konsantrasyonları ile hidrojel formülasyonları oluşturulmuştur (**Tablo 8**) (Rinehart ve ark., 2016).

PVA/Kitozan hidrojellerin karakterizasyonu için FT-IR analizi yapılmıştır. Kitozan, PVA polimerleri ve PVA/Kitozan hidrojellerinden H3 ve H5 kodlu formülasyonların yapılarındaki kimyasal gruplar **Şekil 51, 52 ve 53**'de belirtilmiştir. H1, H2, H3 ve H4 kodlu hidrojellerin su tutma kapasitesi, mekanik özellikleri ve hücre kültürü çalışmaları sonuçlarına göre H3 formülasyonu seçilmiştir ve içerisine optimize edilmiş F kodlu nanopartikül eklenerek H5 kodlu hidrojel oluşturulmuştur. Sonuç olarak sentezlenen hidrojellerde kitozan ve PVA polimeri arasındaki etkileşim ve uyumluluk gösterilmiştir. $3450-3225\text{ cm}^{-1}$ de kitozan ve PVA polimerleri arasında (OH / NH₂) gerilmesine neden olan hidrojen bağlarının varlığını gösteren bir tepe noktası saptanmıştır (Agnihotri ve ark., 2012).

Örneğin $1707, 1638\text{ ve }1475-1415\text{ cm}^{-1}$ gibi diğer pikler; PVA/Kitozan polimerik zincirlerinde sırasıyla mevcut karbonil grubu gerilimini, (NHCOCH₃) gruplarını ve (C-H) bağlarını göstermiştir. PLGA nanopartikülünü içeren H5 formülasyonunda PVA/Kitozan hidrojel yapısının korunması FT-IR spektrumu ile gösterilmiştir. Absorbsiyon pikleri, sırasıyla PVA/Kitozan hidrojeli ve kitozan zincirlerinin (-CH₂) asimetrik gerimini ve (C – H) bağından kaynaklanan hem H3 hem de H5 kodlu hidrojellerde $2975-2845\text{ ve }2870-2840\text{ cm}^{-1}$ de gözlemlenmiştir (Escobar-Sierra ve Perea-Mesa, 2017; Ullah ve ark., 2019). Ayrıca, H5 PVA/Kitozan hidrojelinde PLGA nanopartikülü karakteristik piki $1720-1695\text{ cm}^{-1}$ de (C = O) yapısına ait bağın bulunduğu da ortaya koyulmuştur (Moura ve ark., 2014).

PVA/Kitozan hidrojellerin morfolojik analizi SEM ile değerlendirilmiştir. **Resim 5 ve 6**'da verilen sem görüntüleri hidrojelde çapraz bağların oluşturduğu ağı yapı da gösterilmiştir (Santos ve ark., 2018; Figueroa-Pizano ve ark., 2018).

PVA/Kitozan hidrojelleri, PVA'nın polimer konsantrasyonuna bağlı olarak su tutma kapasitelerinde farklılık göstermiştir. Kitozandan daha hidrofilik olan PVA polimerinin ilavesi, su tutma kapasitesini artırarak hidrojellerin şişme oranını da artırmıştır ($p<0,05$) (**Şekil 55**) (**Tablo 13**). PVA %2,5'tan %5'e çıktığında %5 artış gözlenirken %2,5'ten %10'a çıktığında %10 artış gözlenmiştir. PVA konsantrasyonu

%2,5 ve %5 olan formülasyonlardaki şişme oranı tek başına kitozan ile hazırlanan H4 kodlu hidrojel ile kıyaslandığında anlamlı bir farklılık gözlenmemiştir ($p>0,05$). %10 'luk PVA konsantrasyonu ise diğer tüm hidrojellere kıyasla su tutma kapasitesinde anlamlı bir artış sağlamıştır ($p<0,05$). Rinehart ve arkadaşlarının yapmış olduğu çalışmada, PVA/Kitozan hidrojellerde PVA oranı arttıkça hidrojinin şişme oranının arttığı belirtilmiştir. Yaptığımız çalışmamızda da benzer sonuçlar elde edilmiştir (Rinehart ve ark., 2016). Karboksimetil kitozan ve PVA ile hazırlanan başka bir hidrojel çalışmasında hem kitozan hemde PVA konsantrasyonun artışı hidrojinin şişme özelliğinde artış sağladığını belirtmiştir. PVA konsantrasyonundaki artış, (-OH) gruplarında da artış sağlar ve bu da polimerik ağıın hidrofilikliğini arttırarak şişme oranını artırır (Ullah ve ark., 2019). Diğer bir çalışmada ise PVA/Kitozan hidrojellerde PVA konsantrasyonunun arttığı formülasyonların daha az su tutma kapasitesine sahip olduğunu belirtmiştir. Bunun nedeni ise PVA'nın kristallik derecesi, dondur-çöz siklusu önemli parametrelerdir. PVA konsantrasyonundaki artış kristallik derecesini artırmaktadır bu da çapraz bağlanma bölgelerini artırarak su tutma kapasitelerini azaltmaktadır. Ayrıca dondurma-çözündürme sikluslarındaki artış yine hidrojelde çapraz bağlanma sayısını artırdığı için su tutma kapasitesinde azalmaya neden olabilmektedir (Kim ve ark., 2003).

PLGA nanopartikülünü içeren H5 hidrojel formülasyonları, içermeyen formülasyon H3'e kıyasla daha az su tutma kapasitesine sahiptir. İlk olarak H5, hidrojele yerleşen ve çapraz bağlama aralığını genişleten nanopartiküllere bağlı olarak daha hızlı bir şişme oranı göstermiştir. Fakat sonrasında hidrojinin su penetrasyon kabiliyetini sınırlayan ve genel şişme davranışını azaltan polimerik zincirlerde bulunan, PLGA nanopartiküller ile elektronca zengin O ve N atomları arasındaki ek çapraz bağlantılar ile açıklanmaktadır (Vimala ve ark. 2011; Baghaie ve ark., 2017). Tez çalışmasında nanopartikül içermeyen hidrojele kıyasla nanopartikül içeren hidrojinin su tutma kapasitesi % 42'den % 20' ye düştüğü saptanmıştır.

F kodlu PLGA nanopartikülün *in vitro* salım testinde patlama etkisi % 18 iken H5 kodlu PVA/Kitozan hidrojinin patlama etkisi %10,71 olarak elde edilmiştir. PLGA nanopartikülün hidrojel içerisinde verilmesi rhTGF- β 1'in patlama etkisinde anlamlı bir azalma ($p<0,05$) ve uzun süreli kontrollü bir salım sağlamıştır. **Şekil**

55'te belirtilen grafikteki gibi salım, hidrojel içine gömülü nanopartiküllerden hazırlanan diğer nanopartiküllere kıyasla gecikmeli olmuştur. Baghaei ve arkadaşlarının çalışmasında PLGA nanopartiküller ve poli-N-izopropil akriamid hidrojel ile formülize ettikleri nanopartiküllerin salım çalışmasındaki veriler tez çalışmamızla paralellik göstermiştir (Baghaei ve ark., 2014). İnsülin ile yapılan başka bir çalışmada da insülin içeren PLGA nanopartiküllerin ve bu nanopartiküllerin PVA hidrojel ile formülize formunun *in vitro* salım çalışmasında patlama etkisinin azalarak ve uzatılmış salım profili gösterdiği belirtilmiştir (Liu ve ark., 2007).

Hidrojellerin biyoadezif özellikte olması yara tedavisi için birçok avantaj sağlamaktadır. Uygulama bölgesinde kalış süresinin artmasını sağlayarak hedef bölgede ilaç konsantrasyonunu artırması ve böylece daha uzun etki süresi ve azaltılmış doz sıklığı sağlaması avantajlar arasındadır. Kitozanın doğal bir polimer olarak tek başına biyoadezif özellik gösterdiği bilinmektedir (Chopra ve ark., 2020). Kitozan ile karışabilen farklı polimerler bu biyoadezifliği artırmaktadır. Bu tez çalışmasında farklı PVA konsantrasyonları ile hazırlanan PVA/Kitozan hidrojellerin biyoadezif özelliklerini incelenmiştir. PVA konsantrasyonundaki doğrusal artış ile biyoadeziflik anlamlı olarak artmıştır (Mongia ve ark., 1996). Tek başına kitozan dan oluşan H4 kodlu hidrojel H1 ve H2 'ye kıyasla yüksek biyoadeziflik gösterse de % 10' luk PVA oranı anlamlı bir oranda artış sağlamıştır ($p<0,05$). Bunun nedeni ise Mongia ve arkadaşlarının hidrojel formülasyonlarında %10'dan daha fazla PVA konsantrasyonunu içeren hidrojellerde biyoadezifliğin arttığını desteklemiştir (Mongia ve ark., 1996). Nanopartiküllerin tek başına biyoadezif etkileri uygulanabilir değer aralıklarında olduğu nanopartiküllerin biyoadezyon değerlendirilmesinde belirtilmiştir. Nanopartikülün PVA/Kitozan hidrojel içerisinde verilmesi yara dokusu üzerinde biyoadezifliği anlamlı ölçüde artırmıştır ($p<0,05$). Yara bölgesinde yer alan negatif yüklü doku proteinleriyle kitozan sayesinde pozitif yük kazanan PVA/Kitozan hidrojel etkileşmekte ve biyoadezif özellikte artış sağlanmaktadır (Sezer ve ark., 2008).

Yara tedavisinde hidrojellerin ilaç taşıyıcı sistem olarak kullanımı oldukça yaygındır. Hidrojellerin uygulama açısından değerlendirilirken sertlik, adeziflik, elastisite, koheziflik ve dirençlilik gibi mekanik özellikleri de incelenmektedir. Tez

kapsamında geliştirilen PVA/Kitozan hidrojellerin mekanik özellikleri Texture cihazı kullanılarak belirlenmiştir (**Resim 1**).

Hidrojellerde deformasyon oluşturmak için gerekli kuvveti ölçmek sertlik değerini belirlemektedir. Düşük jel sertliği, jellerin bulunduğu materyalden çıkarılması ve istenen bölgeye uygulanabilirlik için minimum çalışmanın gerekli olmasını sağlamaktadır. Diğer yandan; yüksek sertlik değeri, jel formülasyonunun yara üzerinde tutulma süresini azaltmaktadır. Bundan dolayı, bir hidrojel formülasyonu, yaraların etkili tedavisi için uygun bir sertlik değerine sahip olmalıdır. PVA/Kitozan hidrojellerin sertlik değerleri **Tablo 16**'da ayrıntılı bir şekilde belirtilmiştir. Hidrojel içeriğinde PVA oranı arttıkça sertlik değerinde artış gözlenmiştir (Cha ve ark., 1996). H1 ile H2 arasındaki sertlik değeri anlamlı bulunmamıştır ($p>0,05$). Bunu nedeni hidrojel formülasyonlarında PVA'nın yüksek konsantrasyonlarda etkisini arttırdığı ileri sürülmektedir (Mongia ve ark., 1996). Sadece kitozan ile hazırlanan hidrojel H4 ile H1 ve H2 arasında da anlamlı bir farklılık oluşmamıştır ($p>0,05$). Çünkü tek başına kitozan ile hazırlanan hidrojellerin mekanik özellikler ve esneklik açısından sınırlı olduğu belirtilmiştir (Figuerola-Pizano ve ark., 2018). %10'luk PVA oranı ile H3; $0,455 \pm 0,077$ N değeri ile en yüksek sertlik değerine sahiptir ve diğer tüm hidrojellere kıyasla anlamlı bir sonuç elde edilmiştir ($p<0,05$). Nanopartikül içeren H5 ($0,207 \pm 0,037$ N) kodlu jelde sertlik H3 formülasyonuna kıyasla anlamlı ölçüde azalsa da ($p<0,05$) H1, H2 ve H4 formülasyonlarına karşı anlamlı artış sağlamıştır ($p<0,05$). Nanopartikül içeren H5 hidrojel formülasyonunda içerdiği nanopartiküller jeldeki çapraz bağlanma bölgelerinde bulunduğu için çapraz bağlanmayı azaltarak sertlik değerinde azalmaya neden olduğu düşünülmektedir (Vimala ve ark. 2011; Baghaie ve ark., 2017). PVA ve DMSO ile yapılan bir hidrojel çalışmasında da PVA oranı arttıkça jelin sertlik değerinde artış olduğu belirtilmiştir (Trieu ve Qutubuddin, 1995).

Tedavi süresini kısaltmak ve hasta uyumunu sağlamak için jeller uygulama bölgesinde optimum süre boyunca tutulmalıdır. Bu da jelin adeziflik özelliği ile ilgilidir. Kitozanın konsantrasyonu ve moleküler ağırlığı jelin adezifliğini etkilemektedir (Sezer ve ark., 2008). Hazırlanan PVA/Kitozan hidrojellerinde orta moleküler ağırlıklı kitozan (400 kDa) tercih edilmiştir. Hazırlanan hidrojellerde PVA oranı arttıkça adezifliğin arttığı görülmüştür (**Tablo 18**). %10'luk en yüksek

PVA oranına sahip H3 ($0,315 \pm 0,026$ N.mm) kodlu jel en adeziv olan formdur. PVA konsantrasyonunun % 2,5'ten % 5'e çıkması jelin adezivliğini etkilemediği görülmüştür ($p>0,05$). Bu da hidrojel formülasyonunda PVA'nın yüksek konsantrasyonlarda daha etkili olduğundan düşünülmektedir (Mongia ve ark., 1996). Tek başına kitozan kullanılarak hazırlanan H4 kodlu jel, H1 ve H2 formülasyonlarından daha adeziv olduğu görülmüştür ($p<0,05$). Nanopartikül içeren hidrojin (H5) adezivliği, içermeyen formuna göre azalsa da terapötik açıdan etkili bir adezivlik değerine ($0,243 \pm 0,013$ N.mm) sahiptir (Sezer ve ark., 2008). Mongia ve arkadaşlarının belirttiği gibi PVA hidrojeller veya PVA karışumlu hidrojeller PVA'nın kristallik derecesine göre yüksek adeziv özellik göstermiştir (Mongia ve ark., 1996). Yapılan çalışmada elde edilen sonuçlar bunu desteklemektedir.

Hidrojellerde değerlendirilen diğer bir özellik elastisitedir. Elastisite, deformasyona uğrayan jelin belirli bir sürede yeniden eski formunu kazanması olarak tanımlanmaktadır. Texture profil analizinde elde edilen sayısal esneklik değerindeki artış, jelin elastikiyetindeki azalmayı göstermektedir. Biyoadezyon mekanizması, polimer zincirlerinin esnekliği ile ilgilidir, bu şekilde polimer ve mukozal yüzey arasında güçlü biyoadezyon için yüksek elastikiyet gereklidir (Cevher ve ark., 2008). Hazırlanan PVA/Kitozan hidrojellerde PVA konsantrasyonu arttıkça elastisite değerinde sayısal bir azalma görülmüştür (**Tablo 19**). H3 kodlu jel diğerlerine kıyasla en düşük sayısal elastisite değerine ($0,918 \pm 0,017$) sahipken en yüksek esnekliği göstermiştir. % 2,5 PVA içeriği ile en yüksek elastisite (en düşük esneklik) değeri ($0,957 \pm 0,010$) H1 kodlu hidrojelde görülmüştür ($p<0,05$). Nanopartikül içeren hidrojin (H5) içermeyen formuna kıyasla esnekliğinde artış olsa da istatistiksel olarak anlamlı değildir ($p>0,05$). PVA/Kitozan hidrojellerde PVA varlığı esneklik açısından pozitif etki sağlarken (Sung ve ark., 2010) elde ettiğimiz sonuçlar biyoadezyon açısından da uyumlu bulunmuştur. PVA hidrojellerde elastisite değeri PVA'nın kristalitesine bağlıdır. PVA konsantrasyonu arttıkça kristalite artar ve bu da esneklikte artış göstermiştir (Yokoyama ve ark., 1986).

Hidrojellerin kohezivlik değerleri **Tablo 20'** da verilmiştir. Kohezivlik, hidrojellerin topical uygulanması için önemli parametreler arasındadır. Jel içindeki moleküllerin birbirini çekme kuvveti olarak değerlendirilir bu da adezivliği etkilemektedir (Cheaburu-Yilmaz ve ark., 2019). Hidrojellerdeki PVA konsantrasyon

oranı arttıkça koheziflik değeri azalmıştır. Maksimum kohezif etki sadece kitozan ile hazırlanan hidrojel formunda (H4; $0,665 \pm 0,014$) görülmüştür. Nanopartikül içeren jelin (H5; $0,503 \pm 0,070$) koheziflik değeri içermeyene kıyasla (H3; $0,453 \pm 0,043$) artsa da istatistiksel olarak anlamlı bulunmamıştır ($p>0,05$). Sezer ve arkadaşları kitozan konsantrasyonu arttıkça hidrojelde koheziflikte artış gözlendiğini ileri sürmektedir. Hazırlanan hidrojel formülasyonlarında kitozan hacmi ve PVA içermemesi en yüksek kohezif özelliğe sahip H4 formülasyonunu açıklamaktadır (Sezer ve ark., 2008).

Ayrıca PVA/Kitozan hidrojellerin dirençlilik (resilience) değerlendirilmesi **Tablo 20** 'de belirtilmiştir. PVA içermeyen H4 hidrojel en yüksek değere ($0,256 \pm 0,042$) sahiptir. PVA içeren diğer hidrojel formülasyonları arasında doğrusal bir artış veya azalma gözlenmemiştir.

PVA/Kitozan hidrojellerde, sabit kitozan oranına bağlı olarak artan PVA konsantrasyonuna karşı viskozite doğrusal bir artış göstermiştir. Sadece % 2,5 konsantrasyonlu kitozan ile hazırlanan H4 kodlu hidrojel formülasyonu % 2,5 ve % 5 PVA içeren H1 ve H2 hidrojel formülasyonlarına kıyasla daha yüksek viskozite değerine sahiptir ($p<0,05$). %10'luk PVA içeren H3 kodlu hidrojel formülasyonu ise H4 kodlu hidrojele karşı istatistiksel olarak daha viskoz bulunmuştur ($p<0,05$). Nanopartikül içeren hidrojel formülasyonu H5'de ise, H3 formuna kıyasla viskozitede azalma gözlemlenmiştir fakat bu azalma anlamlı değildir ($p>0,05$). Kitozan miktarındaki artış jel yoğunluğunu artırarak viskozitede artış sağlamıştır. Yüksek PVA içeriğinin de viskoziteyi arttırdığı bilinmektedir. PVA'nın viskozite artırma mekanizması içerdiği polimerle hidrojen-bağlanma etkileşimleri ile ilgilidir. Bu artış, kitozandaki zincir içi hidrofobik bağlardaki artıştan ve PVA/Kitozan molekülleri arasındaki moleküller arası etkileşimlerden kaynaklanmıştır (Amri ve ark., 2019).

Tez kapsamında hazırlanan bir diğer farmasötik form PAMAM/PVA hidrojelleridir. PAMAM/PVA hidrojellerin karakterizasyon çalışması için FT-IR analizi yapılmıştır. PAMAM G5 dendrimer (**Şekil 87**), PVA polimer (**Şekil 53**), PAMAM/PVA hidrojellerin (**Şekil 88, 89**) ve sadece PVA hidrojellerin FT-IR analiz sonuçları bölüm 6.6.1'de ayrıntılı şekilde verilmiştir. Analiz sonuçlarına göre PAMAM/PVA hidrojellerin yapılarındaki spesifik gruplar ile jel yapısının oluştuğu

ve rhTGF- β 1 proteinin enkapsüle olduğu belirtilen pikler ile saptanmıştır (Wu ve ark, 2004).

Geliştirilen PAMAM/PVA hidrojellerin % su tutma kapasiteleri **Şekil 91'** de belirtilmiştir. F1, F2 ve F3 hidrojellerde jel içeriğindeki PAMAM G5 hacim oranı arttıkça jellerin su tutma kapasitesi artmıştır. F1(1:2 (h/h) PAMAM:PVA); F2 (1:3, (h/h) PAMAM:PVA) ve F3 (sadece PVA) sırasıyla $33,867 \pm 0,008$; $28,867 \pm 0,005$ ve $23,433 \pm 0,006$ oranlarında şişme göstermiştir. En yüksek PAMAM içeriğine sahip F1 hidrojel formülasyonu; F2 ve F3 ile kıyaslandığında anlamlı ölçüde en yüksek su tutma kapasitesine sahip olduğu gözlemlenmiştir ($p < 0,05$). PAMAM içermeyen hidrojel (F3) formülasyonuna kıyasla, F2 kodlu jel daha fazla şişme özelliği göstermiştir ($p < 0,05$). Wu ve arkadaşları da PAMAM/PVA hidrojellerde PAMAM oranı arttıkça su tutma kapasitesinin arttığını belirtmişlerdir. Yaptığımız çalışma da bu çalışmayı desteklemektedir. PAMAM/Kitozan hidrojeller ile yapılan diğer bir çalışmada da jel içerisindeki PAMAM dendrimer miktarı arttıkça hidrojin şişme profilinde artış olduğu gözlemlenmiştir. Bunun nedeni ise hidrojellerdeki PAMAM içeriğinin çapraz bağlanma derecesini direkt etkilemesi olarak bildirilmiştir (Guanghua ve ark., 2018).

PAMAM/PVA hidrojellerin 15 günlük *in vitro* salım çalışması sonucunda F1 (71,524 $\pm$ 0,9) kodlu hidrojel formülasyonu, F2 (83,143 $\pm$ 3,1) ve F3 (82,571 $\pm$ 6,9) kodlu formülasyonlara kıyasla salım çalışmasında anlamlı farklılık oluşturmuştur ($p < 0,05$) (**Şekil 92**). F2 ve F3 hidrojel formülasyonları arasında *in vitro* salım açısından anlamlı farklılık gözlenmemiştir ($p > 0,05$). F1 hidrojin diğer formülasyonlara göre uzatılmış salım sağlaması jel içeriğindeki PAMAM oranının fazla olması ve buna bağlı olarak PVA polimeri ile çapraz bağ sayısındaki artış ile açıklanmıştır (Kaga ve ark., 2016). F1, F2 ve F3 hidrojel formülasyonlarından 24 saatlik salımda görülen patlama etkisi (sırasıyla % 30,429 $\pm$ 1,8; % 26,238 $\pm$ 3,9; % 21,19 $\pm$ 23,6) jel içine enkapsüle olmayan fonksiyonel gruplar aracılığı ile dış yüzeye adsorbe olan proteinlerden kaynaklandığı düşünülmektedir. Buwalda ve arkadaşlarının yaptığı PAMAM/PEG hidrojel çalışmasında da amid bağı içeren hidrojellerin salım analizinde gözlemlenen patlama etkisi çalışmamızla uyumlu bulunmuştur (Buwalda ve ark., 2019).

Tez kapsamında hazırlanan tüm farmasötik fomlar, yara tedavisinde literatür çalışmalarında yer alan NIH-3T3 ve HaCaT hücre hatları sitotoksosite ve hücre proliferasyon açısından çalışılmıştır. rhTGF- β 1 proteinin fibroblast hücreleri için proliferatif etki keratinositler için inhibisyon etkisi gösterdiği bilinmektedir (Beanes ve ark., 2003; Faler ve ark., 2006).

Fibroblast hücre hattında yapılan sitotoksosite çalışmasında, geliştirilen formülasyonlardan hiçbiri sitotoksik bulunmamıştır (**Tablo 26, 28, 30**). PVA-kitozan hidrojel formülasyonları için PVA oranı arttıkça, hidrojellerin hücre canlılığını arttırdığı görülmüştür. İstatistiksel olarak, hidrojeller arasında H3 formülasyonu; kontrole (%29,4) ve diğer formülasyonlara kıyasla hücre canlılığında anlamlı bir artış göstermiştir ($p<0,05$). Nanopartikül içeren H5 kodlu hidrojel formülasyonu içermeyen formu olan H3 formülasyonuna göre canlılıkta artış sağlasa da istatistiksel olarak anlamlı değildir ($p>0,05$). H5 hidrojel formülasyonu; kontrole göre (%38,2) ve tek başına rhTGF- β 1 proteine (%33,5) kıyasla anlamlı bir artış sağlamıştır ($p<0,05$). Bu sonuçlar doğrultusunda taşıyıcı sistem olarak proteine stabilite sağladığı gözlemlenmiştir. Proteinlerin hassas üç boyutlu yapısı, proteolitik ve kimyasal bozunmanın yanı sıra katlanma bölgelerinin açılması ve agregasyon nedeniyle farmasötik proteinlerin kullanımında sınırlamalar vardır. Bu sınırlamalar aktivite kaybına yol açmakta ve sıklıkla immün yanıt tepkisine yol açmaktadır. Peptid protein yapılı etken maddelerin hücresel alımında enzimsel lize uğramasının önüne geçilerek stabiliteye katkı sağladığı belirtilmiştir (Vermonden ve ark., 2012). Don ve arkadaşlarının PVA/Kitozan hidrojeller ile yapmış oldukları çalışmada hidrojellerin oldukça biyouyumlu olduğu ve buna ek olarak antimikrobiyal özellik gösterdiği belirtilmiştir (Don ve ark., 2006). Tez çalışmasındaki sonuçlarla yukarıda belirtilen nedenlerden dolayı literatür verileriyle uyumluluk göstermiştir.

Fibroblast hücrelerinde hem protein içeren hem de içermeyen nanopartiküllerin sitotoksik olmadığı ve hücre canlılığında önemli artışlar sağladığı gösterilmiştir. Tüm nanopartiküller, hem kontrol hem de TGF- β 1 ile karşılaştırıldığında hücre canlılığında anlamlı ölçüde artış sağlamıştır ($p<0,05$). PLGA konsantrasyonundaki artışla birlikte hücre canlılığında doğrusal bir artış olmamasına rağmen, özellikle protein içermeyen nanopartiküllerden E (% 3), G (%)

4) ve protein içerenlerde ise F (% 3), H (% 4) diğerlerine kıyasla en iyi canlılık artışını göstermiştir. F kodlu nanopartikül preparatları, fibroblast hücre hattında % 196,81 oranında hücre canlılığında maksimum artış sağlamıştır. Nanopartiküllerde bu artış PLGA'nın neden olduğu laktik asit indüksiyonundan kaynaklanabilmektedir. Chereddy ve arkadaşlarının bildirdiği gibi, protein içeren nanopartiküllerdeki yüksek hücre canlılığı, rhTGF- β 1'in ve laktik asit indüksiyonunun kombine etkisinden kaynaklanmaktadır. Yaptığımız çalışmada elde ettiğimiz bulgular Chereddy'nin çalışmasını desteklemektedir (Chereddy ve ark., 2015). PLGA nanopartikül formülasyonlarında % 3 PLGA konsantrasyonundan sonraki nanopartiküllerin (H, J) hücre canlılığında diğerlerine kıyasla azalma meydana getirdiği gözlenmiştir ($p<0,05$). Bunun nedeni artan PLGA konsantrasyonundan kaynaklı biyorozyon sırasında oluşturduğu asidik mikroçevrenin hücreler üzerine inhibisyon etkisi ve asidik çevrenin protein degradasyonu ve agregasyonuna neden olması düşünülmüştür (Shenderova ve ark., 1999; Fu ve ark., 2000; Vermonden ve ark., 2012). Genel olarak, formülasyonların rhTGF- β 1 proteinine kıyasla hücre canlılığındaki artış formülasyonların protein stabilitesi sağladığını göstermiştir. Taşıyıcı sistemin proteini hücre ortamında proteazlara ve nükleaza karşı koruduğu ve stabilitesini sağladığı belirtilmektedir (Son ve ark, 2009). Çalışmamız bunu desteklemektedir.

PAMAM/PVA hidrojellerin hiçbirisi fibroblast hücreleri için sitotoksik değildir. rhTGF- β 1 proteinini içeren hidrojeller (F1, F2, F3) içermeyenlere kıyasla (F4, F5, F6) hücre canlılığında anlamlı artış sağlamıştır ($p<0,05$). Maksimum hücre canlılığında artış F1 kodlu hidrojelde (%53,9) gözlemlenmiştir. rhTGF- β 1'in kontrole göre %4'lük canlılık artışı anlamlı bulunmamıştır ($p>0,05$). Bunun sebebi öncesinde de belirtilen protein stabilitesi ile ilişkilendirilmektedir. Formülasyonlarda kullanılan %10 luk PAMAM G5 dendrimerin sitotoksikite değerlendirilmesi de çalışılmıştır. % 10 luk 25 μ l PAMAM polimeri sitotoksik bulunmamıştır. Bu sonuç PAMAM dendrimerlerin sitotoksikite parametresi yüksek jenerasyon ve doza bağımlı olduğu ile ilişkilendirilmektedir (Winnicka ve ark., 2015).

HaCaT keratinosit hücre hattında da yapılan MTT sitotoksikite çalışmaları sonucunda tez çalışması çerçevesinde hazırlanan formülasyonların hiçbirisi sitotoksik değildir. Bu bulgular **Tablo 27, 29 ve 31**'de ayrıntılı şekilde verilmiştir. Keratinositler üzerinde yapılan toksisite çalışmasında rhTGF- β 1 proteini en düşük

hücre canlılığına sahiptir (%86,53±1,199-%87,78±8,918). Bunun sebebi ise TGF- β 1'in keratinosit inhibisyonuna sebep olmasından kaynaklanmaktadır (Faler ve ark., 2006).

HaCaT hücre hattı için MTT çalışmasında, PVA oranı hidrojel arasında arttıkça, hücre canlılığında istatistiksel olarak anlamlı bir artış gözlenmiştir ($p < 0,05$). H4 hidrojel formülasyonu PVA içerenlere göre daha düşük hücre canlılığına sahiptir (Mongia ve ark., 1996). PVA oranı arttıkça, hidrojellerin mekanik özelliklerinin değerlendirilmesinde doğrusal bir artış gözlenmiştir. *In vitro* çalışma da bunu desteklemektedir. Kontrole kıyasla H2 ve H3 hidrojel formülasyonları anlamlı olarak hücre canlılığında artış sağlamıştır ($p < 0,05$). Bunun nedeni yüksek konsantrasyonlardaki PVA polimerin hidrofiliği ve yüksek su tutma kapasitesi ile açıklanabilmektedir (Fahmy ve ark., 2015). H4 ve H5 kodlu hidrojel kontrole karşı anlamlı bir artış göstermemiştir ($p > 0,05$).

Keratinositlerin sitotoksikite çalışmasında, protein içermeyen PLGA nanopartiküller protein içerenlere göre istatistiksel olarak daha yüksek hücre canlılığına sahip olduğu saptanmıştır ($p < 0,05$). Bunun sebebi öncesinde belirttiğimiz nanopartiküllerden salınan rhTGF- β 1'in inhibisyon etkisi ile açıklanmaktadır (Le ve ark., 2012). Elde ettiğimiz bu sonuç BrdU hücre proliferasyon çalışması ile uyumluluk göstermiştir. Yapılan başka bir çalışmada rhTGF- β 1'in yara iyileşmesinde keratinositlerin proliferasyonunu azalttığı bildirilmiştir (Beanes ve ark., 2003). Çalışmamızın sonucu da benzerlik göstermiştir. Çalışmada, PLGA konsantrasyonuna bağlı olarak nanopartiküller arasında anlamlı bir farklılık gözlenmemiştir ($p > 0,05$). Geliştirilen nanopartikül formülasyonları arasında F kodlu nanopartikülün , yara iyileşme sürecinde yer alan keratinositlerin inhibisyonunu azaltarak canlılığı arttırdığı gösterilmiştir ($p < 0,05$) (Puolakkainen ve ark., 1995).

Sitotoksikite çalışmasında, PAMAM/PVA hidrojellerden F1 formülasyonu, kontrol grubuna kıyasla anlamlı bir farklılık göstermemiştir ($p > 0,05$). rhTGF- β 1'e kıyasla ise canlılıkta anlamlı artış görülmüştür ($p < 0,05$). Bu, ilaç taşıyıcı sistemin protein stabilitesini sağlayarak lizise uğramasını engellemesi ile açıklanabilmektedir. %10'luk PAMAM G5 dendrimer de HaCaT hücre hattı için sitotoksik bulunmamıştır. Yüksek jenerasyonlu PAMAM dendrimerlerin yüzeyinde sahip olduğu amin gruplarından dolayı pozitif yüklenmektedir. Katyonik dendrimerlerin

hücre membranı ile etkileşerek sitotoksositeye neden olduğu bilinmekle beraber bu etkinin jenerasyon ve doza bağlı olduğu bildirilmiştir. Ayrıca PAMAM dendrimerlerin antimikrobiyal etkisinin jenerasyon artışıyla doğrusallık gösterdiği bildirilmiştir (Tong ve ark., 2015, Janaszewska ve ark., 2019).

Fibroblastlar ile yapılan hücre proliferasyon (BrdU) çalışmasında, tüm PVA/Kitozan hidrojel formülasyonları kontrole ve rhTGF- β 1 grubuna kıyasla hücre proliferasyonunda anlamlı artış sağlamıştır ($p<0,05$) (**Tablo 31**). Bu proliferasyon etkisi, hem kitozanın *in vitro* serum faktörlerine bağlanarak proteinlerin degradasyonunu azaltması ile hücre proliferasyonunu stimülasyonu hem de PVA/Kitozan hidrojellerin hücre adezyonunu artırarak rhTGF- β 1'in etkinliğini artırmasına yardımcı olduğu ile açıklanabilmektedir (Howling ve ark., 2001; Engin-Vrana ve ark., 2008). rhTGF- β 1 proteini ise kontrole kıyasla anlamlı olmayan ($p>0,05$) %6,7'lik bir artış göstermiştir. Hidrojel formülasyonları arasında PVA oranı arttıkça hücre proliferasyonunda artış görülse de istatistiksel olarak doğrusal bir anlamlılık yoktur ($p> 0.05$). H3 formülasyonu H1, H4 ve H5'e karşı anlamlılık göstermiştir ($p<0,05$). Bu da en yüksek PVA konsantrasyonu ile ilişkilendirilmiştir (Mongia ve ark., 1996). Nanopartikül içeren H5 kodlu hidrojel formülasyonu kontrol ve rhTGF- β 1 proteinine karşı hücre proliferasyonunda sırasıyla % 78,8 ve % 72,1 oranında anlamlı bir artış sağlamıştır ($p<0,05$). Elde edilen veriler öncesinde bahsettiğimiz protein stabilitesini sağlama ve taşıyıcı sistemin kombine etkisi ile desteklenmektedir. Kontrol grubuyla karşılaştırıldığında F nanopartikülünü içeren H5 hidrojel %78,8; F nanopartikül ise % 92,6 oranında proliferatif etki göstermiştir. Bu da *in vitro* salım çalışmasındaki H5 hidrojinin uzatılmış salım etkisini desteklemektedir. Kitozanın hücre çoğalmasını indüklediği bilinmekle beraber yüksek konsantrasyonlarda sitotoksik olduğu da belirtilmektedir (Kocemba ve Mucha, 2017). PVA ile karıştırılarak hidrojel oluşturulması yukarıda tartışarak belirttiğimiz birçok parametre arasından topikal uygulama için tercih edilebileceğini göstermektedir (Baghaie ve ark., 2017).

BrdU çalışmasında fibroblast hücre hattına tüm nanopartiküller uygulanmıştır. Protein içeren ve içermeyen nanopartiküller arasındaki istatistiksel olarak anlamlı formülasyonlar % 2 (C-D), % 3 (E-F), % 4 (G-H) bulunmuştur ($p<0,05$). C, D, E, F, H kodlu nanopartikül formülasyonları, kontrole kıyasla hücre

proliferasyonunu arttırırken; rhTGF- β 1 protein ile kıyaslandığında D, E, F, H kodlu nanopartiküller hücre proliferasyonunu istatistiksel olarak arttırmıştır ($p < 0,05$) (**Tablo 34**). Bu artış PLGA nanopartikül kaynaklı laktat indüksiyonu ve rhTGF- β 1 proteinin fibroblastlar üzerindeki proliferatif etkisinden kaynaklanmaktadır (Barrientos ve ark., 2008, Chereddy ve ark., 2015). *In vitro* çalışmada, en yüksek proliferasyon etkisi, % 92.5' lik bir artışla fibroblast hücreleri için % 3 konsantrasyonlu "F" kodlu nanopartikülde gözlenmiştir. rhTGF- β 1 proteini fibroblast proliferasyonunu kontrole kıyasla % 7 arttırırsa da, istatistiksel olarak anlamlı değildir ($p > 0,05$). Geliştirilen formülasyonlar, hücreye taşıyıcı sistem olmadan verilen rhTGF- β 1 proteininden daha fazla proliferasyon sağlamıştır. Bu da taşıyıcı sistemin etkili protein stabilitesi sağladığını göstermektedir (Vermonden ve ark., 2012).

Çalışmamızda; artan PLGA konsantrasyonu nedeniyle, konsantrasyonları % 3'ten fazla olan formülasyonlar, MTT çalışması tarafından desteklendiği gibi fibroblast hücre proliferasyonunda da bir azalma göstermiştir (**Şekil 99**).

PAMAM/PVA hidrojellerin fibroblast hücre hattında proliferasyon çalışmasına ait sonuçlar **Tablo 36**'de verilmiştir. PAMAM G5 dendrimerlerin biyoyoumlu ve fonksiyonel PVA ile karıştırılması, PAMAM dendrimerin terminaldeki amin gruplarından kaynaklı yüksek katyonik etkisiyle oluşturabileceği hemolitik etkiyi azaltmıştır. Hem PAMAM dendrimer kaynaklı pozitif yüzey yükü kazanılmış hem de toksik etki azaltılarak hücreye adezyonu artırılmıştır (Tong ve ark., 2015, Janaszewska ve ark., 2019). rhTGF- β 1 proteini içeren ve içermeyen tüm PAMAM/PVA hidrojelleri kontrol ve TGF- β 1 protein gruplarına kıyasla yüksek değerler ile proliferasyonda artış sağlamıştır ($p < 0,05$). Hidrojel içerisindeki PAMAM miktarı yüksek oldukça proliferatif etki o kadar yüksek elde edilmiştir. F1 hidrojel % $324,9 \pm 24,96$ ile maksimum etkiye ait formülasyondur. Maji ve arkadaşlarının yapmış olduğu PAMAM G4/Jelatin kafes yapılarının yara iyileşmesindeki fibroblast ve keratinosit hücrelerinde yüksek proliferasyon etki gösterdiği belirtilmiştir (Maji ve ark., 2017). Bizim hazırladığımız hidrojellerde de benzer sonuçlar elde edilmiştir.

Şekil 100'de, rhTGF- β 1 içeren nanopartiküller, proteinin keratinosit inhibisyon etkisine bağlı olarak protein içermeyenlere kıyasla daha düşük proliferatif bir etki gösterdiği belirlenmiştir ($p < 0,05$). Formülasyon F, H ve J'nin, rhTGF- β 1'in hücre proliferatif inhibisyon etkisini azaltarak keratinositlerin proliferasyonunu

desteklediği düşünülmektedir (Barrientos ve ark., 2008). F nanopartiküllü içeren H5 hidrojel formülasyonunun proliferatif etkisi tüm nanopartiküllere kıyasla anlamlı bulunmuştur ($p<0,05$). Bu artış ($\% 191,4 \pm 13,57$) PVA/Kitozan hidrojellerin kombine proliferatif etkisi ile açıklanabilmektedir (Minoura ve ark., 1998, Baghaie ve ark., 2017). HaCaT hücre hattı için MTT çalışmamızda, hücre proliferasyon çalışmasını desteklemektedir. Özellikle F ($\% 3$) kodlu nanopartiküller her iki çalışmanın da ortak etkili formülasyonu olarak belirlenmiştir.

HaCaT hücre hattı ile yapılan hücre proliferasyon çalışmasında PVA/Kitozan hidrojellerden H3 formülasyonu, hidrojel formülasyonları arasında istatistiksel olarak anlamlı bir artış göstermiştir ($p<0,05$). $\% 31.3$ artış ile en yüksek proliferatif etkiye sahiptir. Bunun sebebi rhTGF- $\beta 1$ proteini içermediği için inhibisyon etki görülmemektedir (Beanes ve ark., 2003). Faler ve arkadaşlarının çalışmasında da rhTGF- $\beta 1$ proteinin keratinositler üzerine inhibitör etkisini ve bu hücreler üzerinde migrasyon sağladığını belirtmişlerdir (Faler ve ark., 2006). Nanopartikül içeren H5 hidrojel formülasyonu ise diğer tüm PVA/Kitozan hidrojellere ve kontrol grubuna kıyasla anlamlı ($p<0,05$) ve yüksek proliferatif etki ($\% 173,4 \pm 13,57$) göstermiştir. Buda önceden açıklanan taşıyıcı sistemlerin etkinlik artışına katkı sağladığını ortaya koymuştur (Cherddy ve ark., 2015). PVA/Kitozan hidrojellerde yapılan analizler sonucunda (mekanik özellikler, biyoadheziflik su tutma kapasitesi *in vitro* salım ve viskozite gibi) H3 hidrojel formülasyonu F kodlu nanopartikülün kolay topikal uygulaması için tercih edilen PVA/Kitozan hidrojel olmuştur.

Tablo 37'de PAMAM/PVA hidrojellerin keratinosit hücrelerindeki proliferasyon değerleri verilmiştir. Fibroblast hücreleri ile kıyaslandığında daha az proliferatif olması içerdiği rhTGF- $\beta 1$ proteinin inhibisyon etkisinden kaynaklandığı düşünülmektedir (Beanes ve ark., 2003, Faler ve ark., 2006). Proteinin hücre hattındaki inhibisyon etkisine rağmen F1, F2 ve F3 kodlu hidrojel formülasyonları protein inhibitör etkisini azaltarak proliferasyonu artırmıştır ($p<0,05$). Bu da, PAMAM/PVA hidrojellerin olabilecek tek başına PAMAM kullanımı kaynaklı toksisiteyi azaltarak proliferatif etkiye katkı sağlaması ile açıklanabilmektedir (Winnicka ve ark., 2015). Protein içeren ve içermeyen hidrojeller arasında anlamlı bir artış gözlemlenmiştir. Protein içeren hidrojellerden kontrol grubuna kıyasla

anlamlı, tek ve en yüksek proliferatif etki gösteren (%161,2±17,08) F1 kodlu hidrojel formülasyonudur (p<0,05).

Tez çalışmasında hazırlanan farmasötik şekillerde yapılan çalışmalar sonucunda optimize formülasyon F kodlu nanopartikül olarak belirlenmiştir. PVA/Kitozan hidrojeller arasından tercih edilen H3 kodlu hidrojel formülasyonu ile F nanopartikül kullanılarak H5 kodlu jel elde edilmiştir. Son olarak diğer polimerlerin aksine üç boyutlu, fonksiyonel bir yapıya sahip dendrimerler ile hidrojel çalışması yapılmıştır ve geliştirilen formülasyonlar arasında daha etkin bulunan F1 kodlu PAMAM/PVA hidrojel seçilmiştir. Belirtilen tüm formülasyonların, çalışmadaki etkin madde olan rhTGF-β1 proteinini içermeyen formları da kullanılarak yara iyileşmesinde ilaç taşıyıcı sistemlerin etkinliği açısından *in vitro* yara iyileşme (scratch) deneyi ile karşılaştırılmıştır ve çalışma sonucunda elde edilen görüntüler **Resim 7** ve **Resim 8**'de verilmiştir.

In vitro yara iyileşme testinin amacı yapay olarak bir kesik ile hasar oluşturulan hücrelerde hasarlı alanı onarmak için hücre migrasyonunu sağlayabilmektir (Cherreddy ve ark., 2015). Tez kapsamında hazırladığımız protein içeren ve içermeyen PLGA nanopartiküllerin, PVA/Kitozan hidrojellerin ve PAMAM/PVA hidrojellerin ilaç taşıyıcı sistemler olarak kombine etkisini, tek hücreli ve yapay olarak yaralanmış bir yaranın kapanmasını hızlandırma yeteneği ile analiz edebilmek için ilgili formülasyonlar seçilmiştir. 37 °C'de 48 saatlik bir onarım süresinden sonra HaCaT ve NIH-3T3 hücreleri, sadece besiyeri ve hücre içeren kontrol grubuna ve rhTGF-β1 içeren gruba kıyasla geliştirilen formülasyonların bulunduğu kuyular morfolojik olarak daha etkili bulunmuştur. NIH-3T3'te fibroblast hücre çizgisindeki kapanma, protein içermeyen E kodlu nanopartikülün laktat indüksiyonu ile proliferatif etki göstererek migrasyonu artırdığı düşünülmektedir (Cherreddy ve ark., 2015). Protein içeren nanopartikül F, beklenen migrasyon etkisini göstererek en iyi yara kapanma etkisine sahip olduğu görülmüştür. Bu, protein ve ilaç taşıyıcı sistemin kombine etkisi ile sağlandığını göstermiştir (Beanes ve ark., 2003, Faler ve ark., 2006, Cherreddy ve ark., 2015).

H3 hidrojel formülasyonunun içerdiği kitozan nedeniyle, hücre popülasyonunda kontrole kıyasla artış görülmüştür (Nie ve ark., 2015). H5 formülasyonu F kodlu nanopartikülü içermektedir. H5 formülasyonu, F kodlu

nanopartikül ile karşılaştırıldığında uzatılmış salımdan dolayı aynı sürede daha az proliferatif etki göstermiş ve migrasyon sağlamıştır (Baghaei ve ark., 2014).

F1 hidrojel formülasyonu, yüksek proliferasyon değerlerine sahip olsa da hücre göçünde F nanopartikül kadar etkili gözükmemektedir. Laktat indüksiyonunun migrasyona katkısı ile açıklanabilmektedir (Cherreddy ve ark., 2015). Buna rağmen kontrol ve rhTGF- β 1 içeren kuyulara kıyasla hem F1 hem F4 formülasyonları hücre migrasyonu sağlamıştır.

HaCaT hücre hattında, E kodlu nanopartikül formülasyonu keratinositler üzerinde proliferatif etki göstermemiştir. Ayrıca rhTGF- β 1 içermediği için hücre göçüne katkıda bulunmadığı düşünülmektedir. Çünkü TGF- β 1 proteinin keratinositler etkili migrasyon etkisi bulunmaktadır (Nadine ve ark., 2009). F kodlu nanopartikül formülasyonlarının maksimum hücre göçü sağladığı gözlemlenmiştir (Cherreddy ve ark., 2015). Bu da yapılan diğer hücre çalışmalarıyla uyumlu bulunmuştur. PLGA nanopartikül içeren ve içermeyen (H5-H3) hidrojeller, kontrole kıyasla hasarlı bölgede çok az göç ve yara kapanma etkinliği göstermiştir. H3 ve H5 hidrojellerin F nanopartikül kadar etkili olmaması H3 'ün proteini içermemesi ve H5'in ise gecikmeli protein salımından kaynaklı olduğu düşünülmektedir (Hulkower ve Herber, 2011; Baghaei ve ark., 2014). rhTGF- β 1 proteini içeren (F1) içermeyen formuna (F4) kıyasla daha fazla hücre migrasyonuna katkı sağladığı görülmüştür ama F kodlu nanopartikül kadar etkili bulunmamıştır. Her iki hücre hattında da rhTGF- β 1 proteini tek başına etkinlik gösterse de, F kodlu nanopartikül ile kıyaslandığında daha az migrasyon sağladığı görülmüştür. Bu sonuç geliştirilen taşıyıcı sistemin protein stabilitesine katkıda bulunduğu ile ilişkilendirilmektedir (Son ve ark, 2009; Vermonden ve ark., 2012).

Sonuç olarak, yara tedavisinde istenilen hızlı ve etkili iyileşmeye hazırladığımız farklı farmasötik formlar ile katkı sağlanmıştır. Geliştirilen PLGA nanopartiküller, PVA/Kitozan hidrojeller ve PAMAM/PVA hidrojeller yara tedavisinde etkili bir protein olan rhTGF- β 1'in stabilitesine anlamlı ölçüde katkı sağlamıştır. Bu taşıyıcı sistemler ile bir yandan yara tedavisinde hızlı, konforlu, kontaminasyondan uzak bir iyileşme sağlanırken diğer yandan kronik yaraların tedavisi için gereksinim duyulan kontrollü uzatılmış salım sağlanmıştır.

Hazırlanan formülasyonlardan PLGA nanopartiküllerin laktat indüksiyonu ile yara iyileşmeye katkı sağlaması polimerlere terapötik etkileri açısından farklı bir bakış kazandırmıştır. Farklı hidrojel formülasyonlarının protein içeren ve içermeyen formları kıyaslanarak taşıyıcı sistemlerin yara tedavisinde *in vitro* etkinlikleri değerlendirilmiştir. *In vitro* çalışmalarda hazırlanan tüm farmasötik formlar hem proliferatif etki göstermiştir hem de hücre canlılığına katkı sağlamıştır.

Optimize edilen F kodlu nanopartikül, H5 kodlu PVA/Kitozan hidrojel ve F1 kodlu PAMAM/PVA hidrojel formülasyonları rhTGF- β 1 proteini ile birlikte yara tedavisinde umut verici ve daha kapsamlı çalışmalara temel oluşturacağı düşünülmektedir.



8. KAYNAKLAR

Abbasi E, Aval SF, Akbarzadeh A, et al. Dendrimers: synthesis, applications, and properties. *Nanoscale Res Lett*. 2014;9(1):247.

Abdel-Mohsen AM, Aly AS, Hrdina R, Montaser AS, Hebeish A. Eco-synthesis of PVA/chitosan hydrogels for biomedical application. *J. Polym. Environ*. 2011;19:1005–1012.

Abdel-Mottaleb MMA, Lamprecht A. Polymeric Nano (and Micro) Particles as Carriers for Enhanced Skin Penetration. In: Dragicevic N, Maibach HI. *Percutaneous Penetration Enhancers Chemical Methods in Penetration Enhancement Nanocarriers*. Springer-Verlag, Berlin Heidelberg, 2016; 187-199.

Abdo JM, Sopko NA, Milner SM. The applied anatomy of human skin: A model for regeneration. *Wound Medicine*. 2020; 28, 100179.

Agnihotri S, Mukherji S, Mukherji S. Antimicrobial chitosan–PVA hydrogel as a nanoreactor and immobilizing matrix for silver nanoparticles. *Appl Nanosci*. 2012; 2:179–188.

Ahmed EM. Hydrogel: Preparation, characterization, and applications: A review. *J Adv Res*. 2015;6(2):105-121.

Allemann E, Gurny R, Doekler E. Drug-loaded nanoparticles preparation methods and drug targeting issues. *Eur J Pharm Biopharm*. 1993; 39:173-91.

Alsaab H, Alzhrani RM, Boddu SH. Evaluation of the percutaneous absorption of chlorpromazine from PLO gels across porcine ear and human abdominal skin. *Drug Dev Ind Pharm*. 2016;42(8):1258-1266.

Amin MA, Abdel-Raheem IT. Accelerated wound healing and anti-inflammatory effects of physically cross linked polyvinyl alcohol-chitosan hydrogel containing honey bee venom in diabetic rats. *Archives of Pharmacal Research*. 2014;37(8):1016-1031.

Amri N, Ghemati D, Bouguettaya N, Aliouche D. Swelling Kinetics and Rheological Behavior of Chitosan-PVA / Montmorillonite Hybrid Polymers. *Period Polytech Chem Eng.* 2018; 63, 179-189.

Ansari MJ, Alshahrani SM. Nano-encapsulation and characterization of baricitinib using poly-lactidglycolic acid co-polymer. *Saudi Pharmaceutical Journal* Volume. 2019; 27(4): 491-501.

Arora N, Singh K, Garg T. Areas of nanomedicine applications. *Int J Univ Pharm Life Sci.* 2012; 2:216–27.

Astete CE, Sabliov CM. Synthesis and characterization of PLGA nanoparticles, *Journal of Biomaterials Science, Polymer Edition.* 2006;17:3, 247-289.

Baghaei B, Jafari SH, Khonakdar HA, Wagenknecht U, Heinrich G. Novel thermosensitive hydrogel composites based on poly(d,l-lactide-co-glycolide) nanoparticles embedded in poly(n-isopropyl acrylamide) with sustained drug-release behavior. *J. Appl. Polym. Sci.* 2014;131, 40625.

Baghaie S, Khorasani MT, Zarrabi A, Moshtaghian J. Wound healing properties of PVA/starch/chitosan hydrogel membranes with nano Zinc oxide as antibacterial wound dressing material. *Journal of Biomaterials science. Polymer Edition.* 2017;(18):2220-2241.

Bai S, Thomas C, Ahsan F. Dendrimers as a carrier for pulmonary delivery of enoxaparin, a low molecular weight heparin, *J. Pharm.Sci.* 96 (2007) 2090–2106.

Baig, T.A., Nayak, J.N. A Review about Dendrimers: Synthesis, Types, Characterization and Applications, *IJAPBC – Vol, 4(1),* 2015.

Balasubramanian V, Onaca O, Enea R, Hughes DW, Palivan CG. Protein delivery: from conventional drug delivery carriers to polymeric nanoreactors. *Expert Opin Drug Deliv.* 2010;7(1):63-78.

Bano I, Arshad MS, Yasin T, Ghauri MA. Preparation, characterization and evaluation of glycerol plasticized chitosan/PVA blends for burn wounds. *International journal of biological macromolecules*. 2019; 124:155-162.

Barrientos S, Stojadinovic O, Golinko MS, Brem H, Tomic-Canic M. Growth factors and cytokines in wound healing. *Wound Rep Reg*. 2008;16(5):585-601.

Beanes SR, Dang C, Soo C, Ting K. Skin repair and scar formation: the central role of TGF-beta. *Expert Rev Mol Med*. 2003;5(8):1-22.

Beckert S, Farrahi F, Aslam RS, et al. Lactate stimulates endothelial cell migration. *Wound Repair Regen*. 2006;14(3):321-324.

Bektaş A, Cevher E, Güngör S, Özsoy Y. Design and evaluation of polysaccharide-based transdermal films for the controlled delivery of nifedipine. *Chem Pharm Bull (Tokyo)*. 2014;62(2):144-152.

Ben Halima N. Poly(vinyl alcohol): review of its promising applications and insights into biodegradation. *RSC Adv*. 2016; 6, 39823-39832.

Boas U, Christensen JB, Heegaard PMH. Dendrimers: design, synthesis and chemical properties. *J. Mater. Chem*. 2006; 16, 3785–3798.

Bouwstra JA, Ponc M. The skin barrier in healthy and diseased state. *Biochim Biophys Acta*. 2006;1758(12):2080-2095.

Brito AEM, Pessoa A Jr, Converti A, et al. Poly (lactic-co-glycolic acid) nanospheres allow for high l-asparaginase encapsulation yield and activity. *Materials Science & engineering. C, Materials for Biological Applications*. 2019;98:524-534.

Brown GL, Curtsinger LJ, White M, et al. Acceleration of tensile strength of incisions treated with EGF and TGF-beta. *Ann Surg*. 1988;208(6):788-794.

Buwalda SJ, Bethry A, Hunger S, Kandoussi S, Coudane J, Nottelet B. Ultrafast in situ forming poly(ethylene glycol)-poly(amido amine) hydrogels with tunable drug

release properties via controllable degradation rates. *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics*. 2019; 139, 232–239.

Cabrera Pino, J. C., Cambier, P., van Cutsem, P. Drug encapsulation in pectin hydrogel beads- a systematic study of simulated digestion media. *Int J Pharm Pharm Sci*, 2011; 3: 292-299.

Cañedo-Dorantes L, Cañedo-Ayala M. Skin Acute Wound Healing: A Comprehensive Review. *International Journal of Inflammation Volume*. 2019; Article ID 3706315, 15 p.

Cha W, Hyon SH, Oka M, Ikada Y. Mechanical and wear properties of poly(vinyl alcohol) hydrogels. *Macromol. Symp*. 1996;109, 115-126.

Chaisri W, Hennink WE, Okonogi S. Preparation and characterization of cephalexin loaded PLGA microspheres. *Curr Drug Deliv*. 2009;6(1):69-75.

Cascone MG, Maltinti S, Barbani N, Laus M. Effect of chitosan and dextran on the properties of poly(vinyl alcohol) hydrogels. *Journal of Materials Science: Materials in Medicine*. 1999; 10(7):431–435.

Cevher E, Sensoy D, Taha MA, Araman A. Effect of Thiolated Polymers to Textural and Mucoadhesive Properties of Vaginal Gel Formulations Prepared with Polycarbophil and Chitosan. *AAPS PharmSciTech*. 2008; 9(3):953-965.

Cevher E, Taha MA, Orlu M, Araman A. Evaluation of mechanical and mucoadhesive properties of clomiphene citrate gel formulations containing carbomers and their thiolated derivatives. *Drug Deliv*. 2008;15(1):57-67.

Cheaburu-Yilmaz CN, Yilmaz O, Aydin Kose F, Bibire N. Chitosan-Graft-Poly(N-Isopropylacrylamide)/PVA Cryogels as Carriers for Mucosal Delivery of Voriconazole. *Polymers*. 2019; 11(9), 1432.

Cheng Y, Xu Z, Ma M, Xu T. Dendrimers as drug carriers: applications in different routes of drug administration. *J Pharm Sci*. 2008;97(1):123-143.

Cherreddy KK, Lopes A, Koussoroplis S, Payen V, Moia C, Zhu H, et al. Combined effects of PLGA and vascular endothelial growth factor promote the healing of non-diabetic and diabetic wounds. *Nanomedicine*. 2015; 11(8): 1975-1984.

Cherreddy KK, Vandermeulen G, Pr  at V. PLGA based drug delivery systems: Promising carriers for wound healing activity. *Wound Repair Regen*. 2016;24(2):223-236.

Cho CY, Lo JS. Dressing the part. *Dermatol Clin*. 1998;16(1):25-47.

Choi BM, Kwak HJ, Jun CD, Park SD, Kim KY, Kim HR, Chung HT., Control of scarring in adult wounds using antisense transforming growth factor-beta 1 oligodeoxynucleotides. *Immunol Cell Biol* 1996; 74: 144–150.

Chu DH. Development and structure of skin, In: Goldsmith LA, Katz SI, Gilchrest BA, Paller AS, Leffell DJ, Wolff K. *Fitzpatrick's Dermatology in General Medicine*, 8th ed. USA; 2012.

Clark R. Wound repair, overview and general considerations. In: Clark R. *The Molecular and Cellular Biology of Wound Repair* (2nd ed.), New York: Plenum Press. 1996; p: 3–50.

Clark RA. Regulation of fibroplasia in cutaneous wound repair. *Am J Med Sci*. 1993;306(1):42-48.

Coffey RJ Jr, Bascom CC, Sipes NJ, Graves-Deal R, Weissman BE, Moses HL. Selective inhibition of growth-related gene expression in murine keratinocytes by transforming growth factor beta. *Mol Cell Biol*. 1988;8(8):3088-3093.

Constant JS, Feng JJ, Zabel DD, Yuan H, Suh DY, Scheuenstuhl H, et al. Lactate elicits vascular endothelial growth factor from macrophages: a possible alternative to hypoxia. *Wound Repair Regen*. 2000; 8: 353–60.

Cox DA. Transforming growth factor-beta 3, *Cell Biol Int* 1995; 19: 357– 371.

Cromack DT, Sporn MB, Roberts AB, Merino MJ, Dart LL, Norton JA. Transforming growth factor beta levels in rat wound chambers. *J Surg Res.* 1987;42(6):622-628.

Cross M, Dexter TM. Growth factors in development, transformation, and tumorigenesis. *Cell.* 1991; 64(2):271-280.

Csizmazia E, Berkó S, Maroda M, Szabóné RP, Csányi E. Modelling of pecutaneous drug permeation and investigation of penetration enhancer effect. *Acta Pharm Hung.* 2012;82(1):15-22.

Çırpanlı Y. Kamptotesin İçeren Polimerik Ve Oligosakkarit Bazlı Nanopartiküler Formülasyonların Geliştirilmesi Ve İn Vitro-İn Vivo Değerlendirilmesi. Hacettepe Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü, Doktora Tezi, 2009, Ankara (Danışman Doç. Dr. Erem Bilensoy ; Prof. Dr. Sema Çalış).

Dai C, Wang B, Zhao H. Microencapsulation peptide and protein drugs delivery system, *Colloid Surface B: Biointerfaces*, 2005;41:117–20.

Danaei M, Dehghankhold M, Ataei S, et al. Impact of Particle Size and Polydispersity Index on the Clinical Applications of Lipidic Nanocarrier Systems. *Pharmaceutics.* 2018;10(2):57.

Das S, Subuddhi U. Controlled delivery of ibuprofen from poly(vinyl alcohol)–poly(ethylene glycol) interpenetrating polymeric network hydrogels. *Journal of Pharmaceutical Analysis.* 2019; 9, 108 - 116.

Davda J, Labhasetwar V. Sustained Proangiogenic Activity of Vascular Endothelial Growth Factor Following Encapsulation in Nanoparticles. *J Biomed Nanotechnol.* 2005;1:74-82.

De Moraes Profirio D, Benedito Teixeira Pessine F. Formulation of functionalized PLGA nanoparticles with folic acid-conjugated chitosan for carboplatin encapsulation. *European Polymer Journal.* 2018;108: 311-321.

DeFail AJ, Chu CR, Izzo N, Marra KG. Controlled release of bioactive TGF-beta 1 from microspheres embedded within biodegradable hydrogels. *Biomaterials*. 2006;27(8):1579-1585.

Degim, Z. Use of Microparticulate Systems to Accelerate Skin Wound Healing. *J Drug Target* 2008; 16, 6: 437-48.

Değim T, Modern Farmasötik Teknoloji, Bölüm 18, ‘‘Deriden Emilim ve Deriye Uygulanan Yarı Katı Preparatlar’’, (2009).

Demidova-Rice T.N., Hamblin M.R., Herman I.M., Acute and impaired wound healing: pathophysiology and current methods for drug delivery, part 1: normal and chronic wounds: biology, causes, and approaches to care. *Adv Skin Wound Care*. 2012;25(7):304-314.

Deshpande DS, Bajpai R, Bajpai AK, Synthesis and characterization of polyvinyl alcohol-based semi interpenetrating polymeric networks *J Polym Res*. 2012; 19(8): 9938.

Dhote V, Bhatnagar P, Mishra PK, et al. Iontophoresis: a potential emergence of a transdermal drug delivery system. *Sci Pharm*. 2012; 80:1–28.

Don TM, King CF, Chiu CF, Peng CA. Preparation and characterization of chitosan-g-poly(vinyl alcohol)/poly(vinyl alcohol) blends used for the evaluation of blood-contacting compatibility. *Carbohydr. Polym*. 2006;63, 331-339.

Donnelly RF, Morrow DI, McCrudden MT, et al. Hydrogel-forming and dissolving microneedles for enhanced delivery of photosensitizers and precursors. *Photochem Photobiol*. 2014;90(3):641-647.

Duan D, Moeckly C, Gysbers J, et al. Enhanced delivery of topically-applied formulations following skin pre-treatment with a hand-applied, plastic microneedle array. *Curr Drug Deliv*. 2011;8(5):557-565.

Erdal MS, Peköz AY, Aksu B, Araman A. Impacts of chemical enhancers on skin permeation and deposition of terbinafine. *Pharm Dev Technol.* 2014;19(5):565-570.

Eriksson F, Tötterman T, Maltais AK, Pisa P, Yachnin J. DNA vaccine coding for the rhesus prostate specific antigen delivered by intradermal electroporation in patients with relapsed prostate cancer. *Vaccine.* 2013;31(37):3843-3848.

Escobar-Sierra DM, Perea-Mesa YP. Manufacturing and evaluation of Chitosan, PVA and Aloe Vera hydrogels for skin applications. *DYNA.* 2017;84(203):134-142.

Eskild-Jensen A, Koff J, Kjölseth D, et al. Endogenous TGF-beta 1 and TGF-beta 2 are not essential for epithelialization and neovascularization in the hairless mouse ear wound model. *Ann Chir Gynaecol.* 1997;86(3):248-254.

Fahmy A, Kamoun EA, El-Eisawya R, El-Fakharany EM, Tahad TH, El-Damhougya BK, Abdelha F. Poly(vinyl alcohol)-hyaluronic Acid Membranes for Wound Dressing Applications: Synthesis and in vitro Bio-Evaluations. *J. Braz. Chem. Soc.* 2015;26(7):1466-1477.

Faler, B. J., Macsata, R. A., Plummer, D., Mishra, L., & Sidawy, A. N. Transforming Growth Factor- β and Wound Healing. *Perspectives in Vascular Surgery and Endovascular Therapy.* 2006;18(1), 55–62.

Fiala S, Jones SA, Brown MB. A fundamental investigation into the effects of eutectic formation on transmembrane transport. *Int J Pharm.* 2010;393(1-2):68-73.

Figuerola-Pizano MD, Vélaz I, Peñas FJ, et al. Effect of freeze-thawing conditions for preparation of chitosan-poly (vinyl alcohol) hydrogels and drug release studies. *Carbohydr Polym.* 2018;195:476-485.

Flynn G. Cutaneous and transdermal delivery: processes and systems of delivery. *Drug Pharm. Sci* 1996; 72: 239-298.

Flynn GL, Stewart B. Percutaneous drug penetration: choosing candidates for transdermal development. *Drug Dev. Res.* 1988; 13:169-185.

Frank S, Madlener M, Werner S. Transforming growth factors beta1, beta2, and beta3 and their receptors are differentially regulated during normal and impaired wound healing. *J Biol Chem.* 1996;271(17):10188-10193.

Frechet JMJ. Dendrimers and supramolecular chemistry. *PNAS.* 2002;99(8)4782-4787.

Fredenberg S, Wahlgren M, Reslow M, Axelsson A. The mechanisms of drug release in poly(lactic-co-glycolic acid)-based drug delivery systems--a review. *Int J Pharm.* 2011;415(1-2):34-52.

Fu K, Pack DW, Klibanov AM, Langer R. Visual evidence of acidic environment within degrading poly(lactic-co-glycolic acid) (PLGA) microspheres. *Pharm Res.* 2000;17(1):100-106.

Gao W, Lai JC, Leung SW. Functional enhancement of chitosan and nanoparticles in cell culture, tissue engineering, and pharmaceutical applications. *Front Physiol.* 2012;3:321.

Garg T, Goyal AK. Iontophoresis: drug delivery system by applying an electrical potential across the skin. *Drug Deliv Lett.* 2012; 2:270–80.

Garg T, Goyal AK. Medicated Chewing Gum: Patient Compliance Oral Drug Delivery System. *Drug Delivery Letters.* 2014; 4: 72.

Garg T, Rath G, Goyal AK. Comprehensive review on additives of topical dosage forms for drug delivery. *Drug Deliv.* 2015;22(8):969-987.

Garg T, Singh O, Arora S, Murthy R. Dendrimer – a novel scaffold for drug delivery, *Int J Pharm Sci Rev Res.* 2011; 7:211–20.

Garg T, Singh O, Arora S, Murthy R. Patented microencapsulation techniques and its application, *J Pharm Res* 2011; 4:2097–102.

Garg T, Singh O, Arora S, Murthy R. Scaffold: a novel carrier for cell and drug delivery. *Crit Rev Ther Drug Carrier Syst.* 2012;29(1):1-63.

Garg T, Singh S, Goyal AK. Stimuli-sensitive hydrogels: an excellent carrier for drug and cell delivery. *Crit Rev Ther Drug Carrier Syst.* 2013;30(5):369-409.

Gombotz WR, Pankey SC, Bouchard LS, Phan DH, MacKenzie AP. Stability, Characterization, Formulation, and Delivery System Development for Transforming Growth Factor-Beta 1. In: Pearlman R, Wang YJ. *Formulation, Characterization, and Stability of Protein Drugs: Case Histories.* 2002; p: 219-245.

Gomez I, Szabo A, Pap Jr L, et al. In vivo calcium and phosphate iontophoresis for the topical treatment of osteoporosis. *Phys Ther.* 2012; 92: 289–97.

Goyal AK, Rath G, Garg T. Nanotechnological Approaches for Genetic Immunization. *DNA and RNA Nanobiotechnologies in Medicine: Diagnosis and Treatment of Diseases.* 2013; 67–120.

Goyal G, Garg T, Malik B, Chauhan G, Rath G, Goyal AK. Development and characterization of niosomal gel for topical delivery of benzoyl peroxide. *Drug Deliv.* 2015;22(8):1027-1042.

Guirguis O, Moselhey M. Thermal and structural studies of poly (vinyl alcohol) and hydroxypropyl cellulose blends. *Natural Science.* 2012; 4, 57-67.

Gupta P, Vermani K, Garg S. Hydrogels: from controlled release to pH-responsive drug delivery. *Drug Discov Today.* 2002;7(10):569-579.

Gupta U, Perumal O. Dendrimers and Its Biomedical Applications. Kumbar SG, Laurencin CT, Deng M. *Natural and Synthetic Biomedical Polymers.* Elsevier, 2014; p:243–257.

Guterres SS, Alves MP, Pohlmann AR. Polymeric nanoparticles, nanospheres and nanocapsules, for cutaneous applications. *Drug Target Insights.* 2007;2:147-157.

Habif TP, (1996) Dermatologic surgical procedures, *Clinic Dermatology: A Color Guide to Diagnosis and Therapy*, 3rd ed., 809-810.

Haftak M, Teillon MH, Schmitt D. Stratum corneum, corneodesmosomes and ex vivo percutaneous penetration. *Microsc Res Tech.* 1998;43(3):242-249.

Hardwicke J., Schmaljohann D., Boyce D., Thomas D. Epidermal growth factor therapy and wound healing--past, present and future perspectives. *Surgeon.* 2008;6(3):172-177.

Hashim II, Motoyama K, Abd-Elgawad AE, et al. Potential use of iontophoresis for transdermal delivery of NF-kappaB decoy oligonucleotides. *Int J Pharm.* 2010; 393:127–34,

Hassan C.M., Peppas N.A. (2000) pp, 37-65. Structure and Applications of Poly(vinyl alcohol) Hydrogels Produced by Conventional Crosslinking or by Freezing/Thawing Methods. In: *Biopolymers · PVA Hydrogels, Anionic Polymerisation Nanocomposites.* Adv Polym Sci. vol 153. Springer, Berlin, Heidelberg.

Hassan CM, Peppas NA. Structure and Morphology of Freeze / Thawed PVA Hydrogels. *Macromolecules* 2000; 33(7):2472–2479.

He G, Kong Y, Zheng H. et al. Preparation and Properties of Poly(amidoamine) Dendrimer/Quaternary Ammonium Chitosan Hydrogels. *J. Wuhan Univ. Technol.-Mat. Sci. Edit.* 2018; 33, 736–743.

Hinchliff, S.M, (1996) Innate defences, In: Hinchliff S.M., Montague S.E., Watson R., 2nd (ed.) *Physiology for Nursing Practice*, London: Baillière Tindall.

Hoffman AS. Hydrogels for biomedical applications. *Adv Drug Deliv Rev.* 2002;54(1):3-12.

Howling GI, Dettmar PW, Goddard PA, Hampson FC, Dornish M, Wood EJ. The effect of chitin and chitosan on the proliferation of human skin fibroblasts and keratinocytes in vitro. *Biomaterials.* 2001;22, 2959-2966.

Hu F, Liu W, Yan L, Kong F, Wei K. Optimization and characterization of poly(lactic-co-glycolic acid) nanoparticles loaded with astaxanthin and evaluation of antiphotodamage effect in vitro. *R. Soc. open sci.* 2019;6:191184.

Huang JS, Wang YH, Ling TY, Chuang SS, Johnson FE, Huang SS. Synthetic TGF-beta antagonist accelerates wound healing and reduces scarring. *FASEB J.* 2002;16(10):1269-1270.

Huang W, Zhang C. Tuning the Size of Poly(lactic-co-glycolic Acid) (PLGA) Nanoparticles Fabricated by Nanoprecipitation. *Biotechnol J.* 2018;13(1):10. 1002/biot.201700203.

Hulkower KI, Herber RL. Cell migration and invasion assays as tools for drug discovery. *Pharmaceutics.* 2011; 3: 107-24.

Imae T. Physicochemical Properties of Dendrimers and Dendrimer Complexes. In: Cheng Y. *Dendrimer-Based Drug Delivery Systems: From Theory to Practice*, John Wiley & Sons Inc, 2012; p:55-92.

Imanishi J, Kamiyama K, Iguchi I, Kita M, Sotozono C, Kinoshita S. Growth factors: importance in wound healing and maintenance of transparency of the cornea. *Prog Retin Eye Res.* 2000;19(1):113-129.

Ingale AG, Chaudhari AN. Biogenic synthesis of nanoparticles and potential applications: an eco-friendly approach. *J Nanomed Nanotechnol.* 2013; 4(165):1–7.

Jain K., Kesharwani P., Gupta U., Jain N.K., Dendrimer toxicity: Let's meet the challenge *International Journal of Pharmaceutics* 394 (2010) 122–142.

Jain RA. The manufacturing techniques of various drug loaded biodegradable poly(lactide-co-glycolide) (PLGA) devices. *Biomaterials.* 2000;21(23):2475-2490.

Jaklenec A, Hinckfuss A, Bilgen B, Ciombor DM, Aaron R, Mathiowitz E. Sequential release of bioactive IGF-I and TGF-beta 1 from PLGA microsphere-based scaffolds. *Biomaterials.* 2008;29(10):1518-1525.

Jaklenec A, Wan E, Murray ME, Mathiowitz E. Novel scaffolds fabricated from protein-loaded microspheres for tissue engineering. *Biomaterials*. 2008; 29(2): 185-192.

Janaszewska A, Lazniewska J, Trzepinski P, Marcinkowska M, Klajnert-Maculewicz B. Cytotoxicity of Dendrimers. *Biomolecules*. 2019; 9, 330.

Javadzadeh Y, Ahadi F, Davaran S, Mohammadi G, Sabzevari A, Adibkia K. Preparation and physicochemical characterization of naproxen–PLGA nanoparticles. *Colloids Surf B Biointerfaces*. 2010;81(2):498-502.

Jhunjhunwala S, Balmert SC, Raimondi G, Dons E, Nichols EE, Thomson AW, et al. Controlled release formulations of IL-2, TGF- β 1 and rapamycin for the induction of regulatory T cells. *J Control Release*. 2012; 159(1): 78-84.

Kaga S, Arslan M, Sanyal R, Sanyal A. Dendrimers and Dendrons as Versatile Building Blocks for the Fabrication of Functional Hydrogels. *Molecules*. 2016; 21, 497.

Kamoun EA, Kenawy ES, Chen X. A review on polymeric hydrogel membranes for wound dressing applications: PVA-based hydrogel dressings. *J Adv Res*. 2017;8(3):217-233.

Karal-Yılmaz O., Serhatlı M., Baysal K., Baysal B. M. (2011). Preparation and in vitro characterization of vascular endothelial growth factor (VEGF)-loaded poly(D,L-lactic-co-glycolic acid) microspheres using a double emulsion/solvent evaporation technique. *Journal of Microencapsulation*, 28(1), 46-54.

Kataria K., Sharma A., Garg T., Goyal A.K., Rath G. Novel Technology to Improve Drug Loading in Polymeric Nanofibers, *Drug Delivery Letters* (2014) 4: 79.

Kaur M, Garg T, Rath G, Goyal AK. Current nanotechnological strategies for effective delivery of bioactive drug molecules in the treatment of tuberculosis. *Crit Rev Ther Drug Carrier Syst*. 2014;31(1):49-88.

Kean T, Thanou M. Biodegradation, biodistribution and toxicity of chitosan. *Adv Drug Deliv Rev.* 2010;62(1):3-11.

Khan I., Khalid S., Khan I., "Nanoparticles: Properties, Applications and Toxicities." *Arabian Journal of Chemistry* 12 (7); 2019: 908-31.

Khan S, Ranjha NM. Effect of degree of cross-linking on swelling and on drug release of low viscous chitosan/poly(vinyl alcohol) hydrogels. *Polym. Bull.* 2014; 71, 2133–2158.

Kielhorn J., Melching Kollmus S., Mangelsdorf I., *Environmental Health Criteria* 235: Dermal Absorption, World Health Organization, Stuttgart, Germany, 2006.

Kim SJ, Park SJ, Kim SI. Swelling behavior of interpenetrating polymer network hydrogels composed of poly(vinyl alcohol) and chitosan. *Reactive and Functional Polymers.* 2003 Feb 1;55(1):53-59.

Kockisch S, Rees GD, Young SA, Tsibouklis J, Smart JD, *Polymeric Microspheres for Drug Delivery to the Oral Cavity: An In Vitro Evaluation of Mucoadhesive Potential*, *J Pharm Sci*, 2003; 92(8): 1614-1623.

Kumari B. A Review On Nanoparticles: Their Preparation Method And Applications, *Indian Research Journal of Pharmacy and Science.* Indian Research Journal of Pharmacy and Science. 2018; 17, 1420-1426.

Kupper T, Flood P, Coleman D, Horowitz M. Growth of an interleukin 2/interleukin 4-dependent T cell line induced by granulocyte-macrophage colony-stimulating factor (GM-CSF). *J Immunol.* 1987;138(12):4288-4292.

Kutlu C. Çift Etkili Doku İskelesi - Nanopartikül Sistemlerinin Geliştirilmesi Ve Beyin Tümörlerinin Tedavisinde Kullanımı. Hacettepe Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü, Yüksek Lisans Tezi, 2008, Ankara (Prof. Dr. Mehmet Ali Onur, Prof. Dr. Menemşe Gümüşderelioğlu).

Le M, Naridze R, Morrison J, et al. Transforming growth factor Beta 3 is required for excisional wound repair in vivo. *PLoS One*. 2012;7(10):e48040.

Lee K, Silva EA, Mooney DJ. Growth factor delivery-based tissue engineering: general approaches and a review of recent developments. *J R Soc Interface*. 2011;8(55):153-170.

Lee S, Kollias N, McAuliffe DJ, Flotte TJ, Doukas AG. Topical drug delivery in humans with a single photomechanical wave. *Pharm Res*. 1999;16(11):1717-1721.

Li J, Cai C, Li J, Li J, Li J, Sun T, Wang L, Wu H, Yu G. Chitosan-Based Nanomaterials for Drug Delivery. *Molecules* 2018; 23(10), 2661.

Li J, Chen J, Kirsner R. Pathophysiology of acute wound healing. *Clin Dermatol*. 2007;25(1):9-18.

Li Y, Zhang J, Yue J, Gou X, Wu X. Epidermal Stem Cells in Skin Wound Healing. *Adv Wound Care (New Rochelle)*. 2017;6(9):297-307.

Lim J, Yeap SP, Che HX, Low SC. Characterization of magnetic nanoparticle by dynamic light scattering. *Nanoscale Res Lett*. 2013;8(1):381.

Lin J, Li Y, Li Y, et al. Drug/Dye-Loaded, Multifunctional PEG-Chitosan-Iron Oxide Nanocomposites for Methotrexate Synergistically Self-Targeted Cancer Therapy and Dual Model Imaging. *ACS Appl Mater Interfaces*. 2015;7(22):11908-11920.

Liu H, Wang C, Li C, Qin Y, Wang Z, Yang F, Li Z, Wang J. A functional chitosan-based hydrogel as a wound dressing and drug delivery system in the treatment of wound healing. *RSC Adv*. 2018;8, 7533-7549.

Liu J, Gray WD, Davis ME, Luo Y. Peptide- and saccharide-conjugated dendrimers for targeted drug delivery: a concise review. *Interface Focus*. 2012;2(3):307-324.

Liu J, Zhang SM, Chen PP, et al. Controlled release of insulin from PLGA nanoparticles embedded within PVA hydrogels. *J Mater Sci Mater Med*. 2007;18(11):2205-2210.

Liu X, Grice JE, Lademann J, et al. Hair follicles contribute significantly to penetration through human skin only at times soon after application as a solvent deposited solid in man. *Br J Clin Pharmacol*. 2011;72(5):768-774.

Lotfipour F, Alami-Milani M, Salatin S, Hadavi A, Jelvehgari M. Freeze-thaw-induced cross-linked PVA/chitosan for oxytetracycline-loaded wound dressing: The experimental design and optimization. *Res Pharma Sci* 2019;14:175-89.

Lu L, Stamatas GN, Mikos AG. Controlled release of transforming growth factor β 1 from biodegradable polymer microparticles. *J Biomed Mater Res*. 2000; 50(3): 440-451.

Maibach H., Honari G., *Applied Dermatotoxicology: Clinical Aspects*, 1st ed., 2014.

Maji S, Agarwal T, Maiti TK. PAMAM (generation 4) incorporated gelatin 3D matrix as an improved dermal substitute for skin tissue engineering. *Colloids Surf B Biointerfaces*. 2017;155:128-134.

Makadia HK, Siegel SJ. Poly Lactic-co-Glycolic Acid (PLGA) as Biodegradable Controlled Drug Delivery Carrier. *Polymers*. 2011;3:1377-97.

Mao S, Sun W, Kissel T. Chitosan-based formulations for delivery of DNA and siRNA. *Adv Drug Deliv Rev*. 2010;62(1):12-27.

Marieb E.N., (2003) *Essentials of Human Anatomy and Physiology* 7th (ed), Upper Saddle River, NJ: Pearson Educational.

Marks J.G., Miller J.J. Lookingbill and Marks' *Principles of Dermatology*, 6th ed. Chapter 2, *Structure and Function of the Skin*, 2019.

Maroof K, Zafar F, Ali H, Naveed S, Tanwir S. Scope of Nanotechnology in Drug Delivery. *Journal of Bioequivalence & Bioavailability*. 2015; 8, 1-5.

Martin P. Wound healing--aiming for perfect skin regeneration. *Science*. 1997; 276 (5309):75-81.

Martini FH, Seiger CM. (ed) *Fundamentals of Anatomy and Physiology*, 2003. Boston, MA: Addison Wesley.

Martín-López E, Nieto-Díaz M, Nieto-Sampedro M. Influence of chitosan concentration on cell viability and proliferation in vitro by changing film topography. *J Appl Biomater Funct Mater*. 2013;11(3):e151-e158.

Marwah H, Garg T, Goyal AK, Rath G. Permeation enhancer strategies in transdermal drug delivery. *Drug Deliv*. 2016;23(2):564-578. Epub 2014 Jul 9.

McCarley KD, Bunge AL. Pharmacokinetic models of dermal absorption. *J Pharm Sci*. 2001;90(11):1699-1719.

McGee GS, Broadley KN, Buckley A, et al. Recombinant transforming growth factor beta accelerates incisional wound healing. *Curr Surg*. 1989;46(2):103-106.

Minoura N, Koyano T, Koshizaki N, Umehara H, Nagura M, Kobayashi K. Preparation, properties, and cell attachment growth behavior of PVArchitosan-blended hydrogels. *Materials Science and Engineering*. 1998; C6, 275–280.

Mironov V, Kasyanov V, Markwald RR. Nanotechnology in vascular tissue engineering: from nanoscaffolding towards rapid vessel biofabrication. *Trends Biotechnol*. 2008;26(6):338-344.

Mishra B, Upadhyay M, Reddy Adena SK, Vasant BG and Muthu MS. *Hydrogels: An Introduction to a Controlled Drug Delivery Device, Synthesis and Application in Drug Delivery and Tissue Engineering*. Austin J Biomed Eng. 2017; 4(1): 1037.

Mittal KL, Bakshi IS, Narang JK. Bioadhesives in Drug Delivery. In: Chopra H, Sandeep Kumar S, Singh I. *Bioadhesive Hydrogels and Their Applications*. Scrivener Publishing 2020; p:147–170.

Mohammadi-Samani S, Taghipour B. PLGA micro and nanoparticles in delivery of peptides and proteins; problems and approaches. *Pharm Dev Technol.* 2015;20(4):385-393.

Mongia NK, Anseth KS, Peppas NA. Mucoadhesive poly(vinyl alcohol) hydrogels produced by freezing/thawing processes: applications in the development of wound healing systems. *J Biomater Sci Polym Ed.* 1996;7(12):1055-1064.

Morrow D, McCarron P, Woolfson A, Donnelly R. Innovative strategies for enhancing topical and transdermal drug delivery. *Open Drug Delivery J.* 2007;1:36-59.

Motiei M, Kashanian S, Lucia LA, Khazaei M. Intrinsic parameters for the synthesis and tuned properties of amphiphilic chitosan drug delivery nanocarriers. *J Control Release.* 2017;260:213-225.

Moura CC, Segundo MA, Neves Jd, Reis S, Sarmiento B. Co-association of methotrexate and SPIONs into anti-CD64 antibody-conjugated PLGA nanoparticles for theranostic application. *Int J Nanomedicine.* 2014;9:4911-4922.

Moura MJ, Faneca H, Lima MP, Gil MH, Figueiredo MM. In situ forming chitosan hydrogels prepared via ionic/covalent co-cross-linking. *Biomacromolecules.* 2011;12(9):3275-3284.

Mustoe TA, Pierce GF, Thomason A, Gramates P, Sporn MB, Deuel TF. Accelerated healing of incisional wounds in rats induced by transforming growth factor-beta. *Science.* 1987;237(4820):1333-1336.

Nacer Khodja A, Mahlous M, Tahtat D, et al. Evaluation of healing activity of PVA/chitosan hydrogels on deep second degree burn: pharmacological and toxicological tests. *Burns.* 2013;39(1):98-104.

Nafisi S, Maibach HI. Skin penetration of nanoparticles. In: Shegokar R, Souto EB, *Emerging Nanotechnologies in Immunology The Design, Applications and*

Toxicology of Nanopharmaceuticals and Nanovaccines Micro and Nano Technologies. Boston: Elsevier; 2018, p:47-88.

Nam SH, Xu YJ, Nam H, et al. Ion pairs of risedronate for transdermal delivery and enhanced permeation rate on hairless mouse skin. *Int J Pharm.* 2011;419(1-2):114-120.

Nanjwade BK, Bechra HM, Derkar GK, Manvi FV, Nanjwade VK. Dendrimers: emerging polymers for drug-delivery systems. *Eur J Pharm Sci.* 2009;38(3):185-196.

Naves L, Dhand C, Almeida L. et al. Poly(lactic-co-glycolic) acid drug delivery systems through transdermal pathway: an overview. *Prog Biomater.* 2017; 6, 1–11.

Nie L, Zhang G, Hou R, Xu H, Li Y, Fu J. Controllable promotion of chondrocyte adhesion and growth on PVA hydrogels by controlled release of TGF- β 1 from porous PLGA microspheres. *Colloids Surf B Biointerfaces.* 2015;125:51-57.

Noriega-Luna, B., Godínez, L. A., Rodríguez, F. J., Rodríguez, A., Zaldívar-Lelo de Larrea, G., Sosa-Ferreya, C. F., . . . Bustos, E. Applications of Dendrimers in Drug Delivery Agents, Diagnosis, Therapy, and Detection. *Journal of Nanomaterials,* 2014, 507273.

Nöth U, Rackwitz L, Steinert AF, Tuan RS. Cell delivery therapeutics for musculoskeletal regeneration. *Adv Drug Deliv Rev.* 2010;62(7-8):765-783.

O'Kane S, Ferguson MW. Transforming growth factor beta s and wound healing. *Int J Biochem Cell Biol.* 1997;29(1):63-78.

Onyekwelu I, Yakkanti R, Protzer L, Pinkston CM, Tucker C, Seligson D. Surgical Wound Classification and Surgical Site Infections in the Orthopaedic Patient. *J Am Acad Orthop Surg Glob Res Rev.* 2017;1(3):e022.

Openstax. (n.d.) Anatomy and physiology (Chapter 5). Retrieved from <https://opentextbc.ca/anatomyandphysiology/chapter/5-1-layers-of-the-skin/>. (Erişim tarihi:10.06.2020)

Paleos GA. What are Hydrogels?, Pittsburgh Plastics Manufacturing, Butler, PA, 2012.

Panyam J, Williams D, Dash A, Leslie-Pelecky D, Labhasetwar V. Solid-state solubility influences encapsulation and release of hydrophobic drugs from PLGA/PLA nanoparticles. *J Pharm Sci.* 2004;93(7):1804-1814.

Parveen S, Sahoo SK. Nanomedicine: clinical applications of polyethylene glycol conjugated proteins and drugs. *Clin Pharmacokinet.* 2006;45(10):965-988.

Pawar KR, Babu RJ. Polymeric and lipid-based materials for topical nanoparticle delivery systems. *Crit Rev Ther Drug Carrier Syst.* 2010;27(5):419-459.

Peppas NA, Bures P, Leobandung W, Ichikawa H. Hydrogels in pharmaceutical formulations. *Eur J Pharm Biopharm.* 2000;50(1):27-46.

Pillai O, Panchagnula R. Polymers in drug delivery. *Curr Opin Chem Biol.* 2001;5(4):447-451.

Poniatowski ŁA, Wojdasiewicz P, Gasik R, Szukiewicz D. Transforming growth factor Beta family: insight into the role of growth factors in regulation of fracture healing biology and potential clinical applications. *Mediators Inflamm.* 2015;2015:137823.

Porporato PE, Payen VL, De Saedeleer CJ, et al. Lactate stimulates angiogenesis and accelerates the healing of superficial and ischemic wounds in mice. *Angiogenesis.* 2012;15(4):581-592.

Prabaharan M. Review paper: chitosan derivatives as promising materials for controlled drug delivery. *J Biomater Appl.* 2008;23(1):5-36.

Puglisi G, Fresta M, Giammona G, Ventura CA. Influence of the preparation conditions on poly(ethylcyanoacrylate) nanocapsule formation. *Int J Pharm.* 1995;125: 283-287.

Puolakkainen PA, Twardzik DR, Ranchalis JE, Pankey SC, Reed MJ, Gombotz WR. The enhancement in wound healing by transforming growth factor-beta 1 (TGF-beta 1) depends on the topical delivery system. *J Surg Res.* 1995;58(3):321-329.

Rafique A, Mahmood Zia K, Zuber M, Tabasum S, Rehman S. Chitosan functionalized poly(vinyl alcohol) for prospects biomedical and industrial applications: A review. *Int J Biol Macromol.* 2016;87:141-154.

Richardson M. Understanding the structure and function of the skin. *NT.* 2003; 99, 31.

Rinehart SJ, Campbell T, Burke KJ, Garcia B, Mlynarski A, et al. Synthesis and Characterization of a Chitosan/PVA Antimicrobial Hydrogel Nanocomposite for Responsive Wound Management Materials. *J Microb Biochem Technol.* 2016;8: 065-070.

Roberts AB, Sporn MB. Transforming growth factor- β . In: *The Molecular and Cellular Biology of Wound Repair* (2nd ed.), edited by Clark RAF. New York: Plenum, 1996, p: 275–308.

Roberts S, Walters KA. Human skin morphology and dermal absorption. In: *Dermal Absorption and Toxicity Assessment*, 2nd Edition. CRC Press, Boca Raton. 2007pp. 1-15.

Saga K. Structure and Function of Human Sweat Glands Studied with Histochemistry and Cytochemistry. *Progress in Histochemistry and Cytochemistry.* 2002;37, 4: 323-86.

Saghazadeh S, Rinoldi C, Schot M, Kashaf SS, Sharifi F, Jalilian E, Nuutila K, Giatsidis G, Mostafalu P, Derakhshandeh H, Yue K, Swieszkowski W, Memic A, Tamayol A, Khademhosseini A. Drug Delivery Systems and Materials for Wound Healing Applications. *Adv Drug Deliv Rev.* 2018; 127: 138–166.

Saltzman WM, Fung LK. Polymeric implants for cancer chemotherapy. *Adv Drug Deliv Rev.* 1997;26(2-3):209-230.

Santos TC, Hernández R, Rescignano N, Boff L, Reginatto FH, Simões CM, Campos AM, Mijangos C. Nanocomposite chitosan hydrogels based on PLGA nanoparticles as potential biomedical materials. *European Polymer Journal*. 2018;99, 456-463.

Schreml S, Szeimies RM, Prantl L, Karrer S, Landthaler M, Babilas P. Oxygen in acute and chronic wound healing. *Br J Dermatol*. 2010; 163: 257–6.

Seeley R.R., Stephens T.D., Tote P.: *Anatomy and Physiology*, 6 th ed. Mc Graw Hill Companies, 2003.

Sellheyer K, Bickenbach JR, Rothnagel JA, et al. Inhibition of skin development by overexpression of transforming growth factor beta 1 in the epidermis of transgenic mice. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1993;90(11):5237-5241.

Senel S, McClure SJ. Potential applications of chitosan in veterinary medicine. *Adv Drug Deliv Rev*. 2004;56(10):1467-1480.

Sezer AD, Cevher E, Hatipoğlu F, et al. Preparation of fucoidan-chitosan hydrogel and its application as burn healing accelerator on rabbits. *Biological & Pharmaceutical Bulletin*. 2008;31(12):2326-2333.

Sezer AD, Cevher E, Hatipoğlu F, Oğurtan Z, Baş AL, Akbuğa J. The use of fucosphere in the treatment of dermal burns in rabbits. *Eur J Pharm Biopharm*. 2008;69(1):189-198.

Sezer AD, Cevher E. Biopolymers as Wound Healing Materials: Challenges and New Strategies In: Pignatello R. *Biomaterials Applications for Nanomedicine*. IntechOpen; 2011, p: 383- 414.

Sezer AD, Hatipoğlu F, Cevher E, Oğurtan Z, Baş AL, Akbuğa J. Chitosan film containing fucoidan as a wound dressing for dermal burn healing: preparation and in vitro/in vivo evaluation. *AAPS PharmSciTech*. 2007;8(2):E94-39.

Shah M, Foreman DM, Ferguson MW. Neutralisation of TGF-beta 1 and TGF-beta 2 or exogenous addition of TGF-beta 3 to cutaneous rat wounds reduces scarring. *J Cell Sci.* 1995;108 (Pt 3):985-1002.

Shah M, Foreman DM, Ferguson MW. Neutralising antibody to TGF-beta 1,2 reduces cutaneous scarring in adult rodents. *J Cell Sci.* 1994;107 (Pt 5):1137-1157.

Shenderova A, Burke TG, Schwendeman SP. The acidic microclimate in poly(lactide-co-glycolide) microspheres stabilizes camptothecins. *Pharm Res.* 1999;16(2):241-248.

Shinde GV, Bangale GS, Umalkar DK, Rathinaraj BS, Yadav CS, Yadav P. Dendrimers. *J Pharm Biomed Sci* 2010; 03(03): 1-8.

Silva AL, Soema PC, Slütter B, Ossendorp F, Jiskoot W. PLGA particulate delivery systems for subunit vaccines: Linking particle properties to immunogenicity. *Hum Vaccin Immunother.* 2016; 12(4): 1056-1069.

Silverthorn, D. U., *Human physiology: An integrated approach*. 2nd ed. Upper Saddle River: Prentice-Hall, 2001.

Singh S. K., Dhyani A., Juyal D., *Hydrogel: Preparation, Characterization and Applications*, *The Pharma Innovation Journal* 2017; 6(6): 25-32.

Skountzou I, Kang SM. Transcutaneous immunization with influenza vaccines. *Curr Top Microbiol Immunol.* 2009;333:347-368.

Son S, Lee WR, Joung YK, Kwon MH, Kim YS, Park KD. Optimized stability retention of a monoclonal antibody in the PLGA nanoparticles. *Int J Pharm.* 2009; 368(1-2): 178-185.

Sorg H, Tilkorn DJ, Hager S, Hauser J, Mirastschijski U. Skin Wound Healing: An Update on the Current Knowledge and Concepts. *Eur Surg Res.* 2017;58(1-2):81-94.

Sporn MB, Roberts AB, Shull JH, Smith JM, Ward JM, Sodek J. Polypeptide transforming growth factors isolated from bovine sources and used for wound healing in vivo. *Science*. 1983;219(4590):1329-1331.

Srivastava AK, Yadav T, Sharma S, Nayak AB, Kumari A, Mishra N. Polymers in Drug Delivery. *Journal of Biosciences and Medicines*. 2016; 04, 69-84.

Stewart SA, Domínguez-Robles J, Donnelly RF, Larrañeta E. Implantable Polymeric Drug Delivery Devices: Classification, Manufacture, Materials, and Clinical Applications. *Polymers (Basel)*. 2018;10(12):1379.

Strodtbeck F: Physiology of wound healing. *Newborn Infant Nurs Rev* 2001;1:43–52.

Sukumar N, Ramachandran T, Kalaierasi H, Sengottuvelu S. Characterization and in vivo evaluation of silk hydrogel with enhancement of dextrin, rhEGF, and alginate beads for diabetic Wistar Albino wounded rats. *J Text Inst*. 2015;106:2, 133–140.

Sun SB, Liu P, Shao FM, Miao QL. Formulation and evaluation of PLGA nanoparticles loaded capecitabine for prostate cancer. *Int J Clin Exp Med*. 2015; 8(10): 19670-19681.

Sung JH, Hwang MR, Kim JO, et al. Gel characterisation and in vivo evaluation of minocycline-loaded wound dressing with enhanced wound healing using polyvinyl alcohol and chitosan. *Int J Pharm*. 2010;392(1-2):232-240.

Tian WD, Ma YQ. Theoretical and computational studies of dendrimers as delivery vectors. *Chemical Society Reviews*. 2013 Jan;42(2):705-727.

Tiwari SB, Pai RM, Udupa N. Influence of ultrasound on the percutaneous absorption of ketorolac tromethamine in vitro across rat skin. *Drug Deliv*. 2004;11(1):47-51.

Tocco I, Zavan B, Bassetto F, & Vindigni V, Nanotechnology-Based Therapies for Skin Wound Regeneration. *Journal of Nanomaterials*, 2012, 714134.

Toll R, Jacobi U, Richter H, Lademann J, Schaefer H, Blume-Peytavi U. Penetration profile of microspheres in follicular targeting of terminal hair follicles. *J Invest Dermatol*. 2004;123(1):168-176.

Tong A, Nguyen TH, Nguyen DH, Nguyen CK, Tran Q. Preparation of the Cationic Dendrimer-Based Hydrogels for Controlled Heparin Release. *Journal of Macromolecular Science, Part A*. 2015;52:10, 830-837.

Trieu HH, Qutubuddin S. Poly(vinyl alcohol) hydrogels: 2. Effects of processing parameters on structure and properties. *Polymer Vol*. 1995; 36 (13):2531 2539.

Tyagi S, Pandey VK. Nanoparticles: An Overview of Preparation. *Res Rev: J Pharm Nanotechnol*. 2016;4(2):1–12.

Ullah K, Sohail M, Murtaza G, Khan SA. Natural and synthetic materials based CMCh/PVA hydrogels for oxaliplatin delivery: Fabrication, characterization, In-Vitro and In-Vivo safety profiling. *International Journal of Biological Macromolecules*. 2019;122:538-548.

Vaidya PK. Master Thesis. Controlled Delivery of TGF- β 1 from PLGA Nanoparticles. Department of Biomedical Engineering, Cleveland State University, Ohio, USA, 2012.

Valenta C, Siman U, Kratzel M, Hadgraft J. The dermal delivery of lignocaine: influence of ion pairing. *Int J Pharm*. 2000;197(1-2):77-85.

Vermonden T, Censi R, Hennink WE. Hydrogels for protein delivery. *Chem Rev*. 2012;112(5):2853-2888.

Vimala K, Mohan YM, Varaprasad K, Redd NN, Ravindra S, Naidu NS, Raju KM. Fabrication of curcumin encapsulated Chitosan–PVA silver nanocomposite films for improved antimicrobial activity. *J Biomater Nanobiotechnol*. 2011;2, 55-64.

Engin Vrana N, Liu Y, McGuinness GB, Cahill PA. Characterization of Poly(vinyl alcohol)/Chitosan Hydrogels as Vascular Tissue Engineering Scaffolds. *Macromol. Symp.* 2008; 269, 106–110.

Wang S, Xu T, Yang Y, Shao Z. Colloidal Stability of Silk Fibroin Nanoparticles Coated with Cationic Polymer for Effective Drug Delivery. *ACS Appl Mater Interfaces.* 2015;7(38):21254-21262.

Werner S, Grose R. Regulation of wound healing by growth factors and cytokines. *Physiol Rev.* 2003;83(3):835-870.

Wichterle, O., Dongwan L., “Hydrophilic Gels for Biological Use.” *Nature* 185 (1960): 117-118.

Winnicka K, Wroblewska M, Sosnowska K, Car H, Kasacka I. Evaluation of cationic polyamidoamine dendrimers' dermal toxicity in the rat skin model. *Drug Des Devel Ther.* 2015;9:1367-1377.

Wolf NB, Kuchler S, Radowski MR, et al. Influences of opioids and nanoparticles on in vitro wound healing models. *Eur J Pharm Biopharm.* 2009;73(1):34-42.

Wu XY, Huang SW, Zhang JT, Zhuo RX, Preparation and characterization of novel physically cross-linked hydrogels composed of poly(vinyl alcohol) and amine-terminated polyamidoamine dendrimer. *Macromol Biosci.* 2004; 20,4(2):71-5.

Yang W, Fortunati E, Bertoglio F, et al. Polyvinyl alcohol/chitosan hydrogels with enhanced antioxidant and antibacterial properties induced by lignin nanoparticles. *Carbohydr Polym.* 2018;181:275-284.

Yang YY, Chung TS, Ng NP. Morphology, drug distribution, and in vitro release profiles of biodegradable polymeric microspheres containing protein fabricated by double-emulsion solvent extraction/evaporation method. *Biomaterials.* 2001;22(3):231-241.

Yang Z, Wang L, Tian L, Zhang X, Huang G. Tadalafil-loaded PLGA microspheres for pulmonary administration: preparation and evaluation. *Braz J Pharm Sci.* 2019; 55.

Yokoyama E, Masada I, Shimamura K, Ikawa T, Monobe K. Morphology and structure of highly elastic poly(vinyl alcohol) hydrogel prepared by repeated freezing-and-melting. *Colloid and Polymer Sci.* 1986; 264(7):595-601.

Yokoyama T. Basic Properties and Measuring Methods of Nanoparticles. In: Naito M, Yokoyama T, Hosokawa K, Nogi K. *Nanoparticle Technology Handbook*, third ed. 2018; p: 3-47.

Zhou T, Li X, Li G, et al. Injectable and thermosensitive TGF- β 1-loaded PCEC hydrogel system for in vivo cartilage repair. *Sci Rep.* 2017; 7, 10553.

Zolnik BS, Gonzalez-Fernandez A, Sadrieh N, Dobrovolskaia MA. Minireview: Nanoparticles and the Immune System *Endocrinology.* 2010; 151(2):458 – 465.

9. EKLER

Ek 1- Tez çalışmasından üretilen yayın



Preparation and characterization of poly(lactic-co-glycolic acid) nanoparticles containing TGF- β 1 and evaluation of in vitro wound healing effect

Aysun ÇELİK SOYSAL ¹, Sevinç ŞAHBAZ ², Timuçin UĞURLU ², Ali Demir SEZER ^{1*}

¹ Department of Pharmaceutical Biotechnology, Faculty of Pharmacy, Marmara University, 34668 Istanbul, Turkey

² Department of Pharmaceutical Technology, Faculty of Pharmacy, Marmara University, 34668 Istanbul, Turkey

* Corresponding author. E-mail: adsezer@marmara.edu.tr; Tel: +90-216-414 29 62.

Received: 31 January 2020 / Revised: 05 March 2020 / Accepted: 06 March 2020

ABSTRACT: Wound healing involves many complex mechanisms, and many growth factors are effective in this process. Growth factors are biologically active polypeptides. They perform activities such as cell growth, differentiation, proliferation and migration with molecular cascades by binding to specific receptors. Transforming growth factor stimulates (TGF- β) different cell types in the wound healing process. Poly(lactic-co-glycolic acid) (PLGA) degradation produces lactate that expedites angiogenesis, activates pro-collagen factors. Therewith, we hypothesized to combine the therapeutic effect of the TGF- β 1 with the positive effect of the drug delivery system including PLGA nanoparticles (TGF- β - PLGA NP). The burst effect decreases as the polymer concentration increases in PLGA nanoparticles. The inhibitory effect of TGF- β 1 on keratinocytes was reduced by the improved nanoparticle formulations. It showed a proliferative effect of up to 92.5 per cent on fibroblast cells involved in wound healing. Although TGF- β 1 has an inhibitory effect on keratinocytes, it induces migration both NIH-3T3 and HaCaT cell lines in the scratch assay.

KEYWORDS: Transforming growth factor; PLGA; nanoparticle; wound healing.

1. INTRODUCTION

From past to present, the treatment of wounds and burns has an important place in health. Rapid recovery of the wound is a desirable condition to prevent both patient welfare and infection risk [1-3]. Dermal wound healing consists of many cellular mechanisms that progress both systematically and step by step. It starts with hemostasis and inflammation, resulting in extracellular matrix accumulation, angiogenesis, remodelling and scar formation[4]. The wounds are classified according to their appearance, the rate of damage of the skin layers, repair process and cause of injury [5]. Many growth factors and receptors also play a key role. Several studies have been carried out with many cytokines and growth factors in wound healing to accelerate this process [1-3].

One of the growth factors involved in this mechanism is Transforming Growth Factor Beta 1 (TGF- β 1) which is released from platelets, activated macrophages, neutrophils, fibroblasts, keratinocytes, T-lymphocytes and endothelial cells. TGF- β 1 is a protein with a molecular weight of about 25 kDa and consisting of 112 amino acids monomeric unit of TGF- β [6-8]. TGF- β 1 affects many cell types in the wound area. Fibroblast production and chemotaxis increase the synthesis of ECM components (collagen). It increases protease inhibitor synthesis while decreasing protease expression. It is involved in the chemotaxis and maturation of macrophages. It is stated that it reduces proliferation while increasing keratinocyte maturation [9].

Biocompatible polymeric delivery systems such as PLGA are developed for the distribution, stability and long-term effectiveness of TGF- β 1[10-12]. Poly (lactic-co-glycolic acid) (PLGA) is a widely used biodegradable polymer approved by the Food and Drug Administration (FDA) and the European Medicines Agency (EMA). PLGA; polylactic acid (PLA) is formed by polymerization of polyglycolic acid (PGA) monomers in different proportions [11, 12]. PLGA; in addition to its biocompatible, biodegradable, long-term release, it also promotes angiogenesis and activation of procollagen factors in the wound healing area due to its lactate content [4].

How to cite this article: Çelik Soysal A, Şahbaz S, Uğurlu T, Sezer AD. Preparation and characterization of poly(lactic-co-glycolic acid) nanoparticles containing TGF- β 1 and evaluation of in vitro wound healing effect. J Res Pharm. 2020; 24(2): 277-289.

© 2020 Marmara University Press
ISSN: 2630-6344

<https://doi.org/10.35933/jrp.2020.144>

Here we report the evaluation of the characteristics of different formulations of PLGA nanoparticles. We aimed to investigate the efficacy of developed formulations in cell viability and cell proliferation in two different cell lines that take a dominant role in wound healing.

2. RESULTS AND DISCUSSION

2.1. Characterization of PLGA nanoparticles

A double-emulsion solvent evaporation method was selected for preparation of the NPS due to the hydrophilic nature of TGF- β 1 protein. Many parameters affect the physicochemical properties of nanoparticles. These include polymer concentration, PVA concentration in the external phase, the concentration of the drug. As the PLGA polymer concentration increases; We tried to examine the size of the nanoparticle, the zeta potential, the polydispersity index, the encapsulation efficiency and the bioadhesive properties.

Five nanoparticle formulations were prepared and indicated in Table 1. The particle size of the filled nanoparticles obtained between 217.4 $\pm$ 3.4 and 289.4 $\pm$ 3.9 nm. Nanoparticles in the 20-200 nm range are effectively taken up by dendritic cells through endocytosis or pinocytosis and can stimulate a cellular immune response, while microparticles of 0.5-5 μ m stimulate the phagocytosis or macropinocytosis and humoral response [20]. According to these data, 200-500 nm can be evaluated optimally in terms of the immune system. The nanoparticle size range in our study was also found to be compatible with these data. In formulations containing 1%, 2%, 3%, 4% and 5% PLGA concentrations, filled nanoparticles were larger at size than empty ones and showed statistical significance ($p < 0.05$). Several studies have reported an increase in nanoparticle size as PLGA polymer concentration increases [21-23]. In addition to these views, it has been suggested that as the PLGA polymer concentration increases, particle size may decrease in the study of Mensah et al. [24]. In our study, no linear increase in nanoparticle size was observed due to polymer concentration.

The zeta potential of the nanoparticles is between -29.6 $\pm$ 2.1 and -26.8 $\pm$ 0.9. There is no statistical significance between the zeta potential of filled nanoparticle formulations (B, D, F, H, J). PLGA concentration did not significantly differ on zeta potential ($p > 0.05$) [25].

Table 1. Formulation of PLGA nanoparticles and characterization analysis including size, zeta potential, polydispersity index, encapsulation efficiency and bioadhesion study.

Formulation Code	PLGA %	PVA %	TGF- β 1	Zeta Potential (mV) $\pm$ SD	Size (nm) $\pm$ SD	Polydispersity index $\pm$ SD	Encapsulation Efficiency (%) $\pm$ SD	Work of Bioadhesion (mJ/cm ² $\pm$ SD)
A	1	1	-	-19.86 $\pm$ 0.40	240.66 $\pm$ 4.88	0.329 $\pm$ 0.03	-	-
B	1	1	+	-26.83 $\pm$ 0.94	289.40 $\pm$ 3.90	0.323 $\pm$ 0.01	98.85 $\pm$ 0.25	0.11 $\pm$ 0.13
C	2	1	-	-26.68 $\pm$ 1.64	195.63 $\pm$ 3.74	0.281 $\pm$ 0.04	-	-
D	2	1	+	-26.98 $\pm$ 1.30	217.43 $\pm$ 3.40	0.286 $\pm$ 0.04	99.54 $\pm$ 0.11	0.19 $\pm$ 0.03
E	3	1	-	-22.85 $\pm$ 3.50	215.83 $\pm$ 2.82	0.328 $\pm$ 0.01	-	-
F	3	1	+	-27.17 $\pm$ 3.25	274.76 $\pm$ 1.50	0.317 $\pm$ 0.01	99.52 $\pm$ 0.12	0.12 $\pm$ 0.08
G	4	1	-	-24.70 $\pm$ 0.63	197.16 $\pm$ 16.31	0.346 $\pm$ 0.02	-	-
H	4	1	+	-29.64 $\pm$ 2.09	236.06 $\pm$ 4.05	0.331 $\pm$ 0.03	99.64 $\pm$ 0.03	0.17 $\pm$ 0.02
I	5	1	-	-28.08 $\pm$ 3.15	163.56 $\pm$ 13.92	0.316 $\pm$ 0.07	-	-
J	5	1	+	-28.52 $\pm$ 4.52	258.00 $\pm$ 16.36	0.296 $\pm$ 0.02	99.88 $\pm$ 0.04	0.12 $\pm$ 0.03

The polydispersity index (PDI) of the nanoparticles is in a narrow range and no significant difference is observed between the formulations. It is in the range of 0.281-0.346. Polydispersity index values showed that the nanoparticles were homogeneous and the method used was reproducible and stable [15].

The encapsulation efficiency of the nanoparticles was determined by calculating the amount of non-encapsulated TGF- β 1 protein in their supernatants by ELISA kit and high rates were obtained (Table 1). All nanoparticles showed high encapsulation efficiency. This may be due to the use of a small amount of TGF- β 1, such as 1 μ g, during the preparation of the nanoparticles. The formulation showing maximum encapsulation efficiency is group J. 99.8% showed a near hundred per cent efficiency. Generally, BSA is used to stabilize growth factors in peptide-protein structure and TGF- β 1 was prepared in 0.1% BSA in our study. PLGA was selected with (L: G / 50: 50) 503H acid terminal. So; The carboxylic acid chain of PLGA enhances the interaction with the protein, allowing the protein to enter the polymer nanoparticle better and as a result is thought to provide high encapsulation efficiency [13, 26]. The encapsulation efficiency of PLGA nanoparticles is between $98.8 \pm 0.2\%$ and $99.8 \pm 0.04\%$, resulting in a relatively high rate (Table 1). Encapsulation efficiency increases with increasing polymer concentration [22]. Formulation B has the statistically lowest encapsulation efficiency ($P < 0.05$). The encapsulation efficiency for other formulations was not statistically significant as it was close to each other. These encapsulation activities are quite high compared to other delivery systems (such as micro / nano particles with 25-50% ratios) [25, 27, 28].

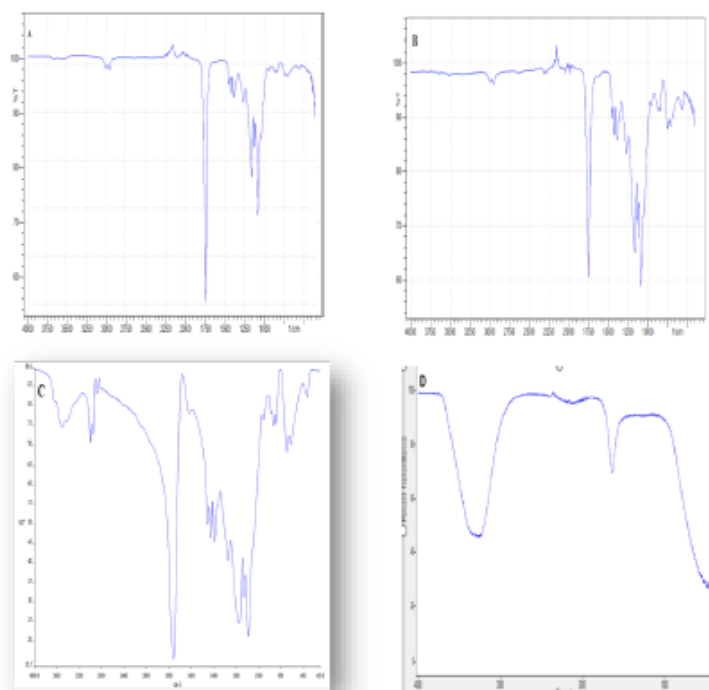


Figure 1. FT-IR. Fourier transform infrared spectra of PLGA 50:50 (A), TGF- β 1-loaded PLGA np (B), Blank np (C), TGF- β 1 protein (D).

FTIR study was carried out to confirm the compatibility between the polymer PLGA and drug (TGF- β 1 protein) and nanoparticle formulation were shown in Figure 1. In Figure 1A, functional groups such as carbonyl $\text{C}=\text{O}$ stretching ($1780\text{--}1720\text{ cm}^{-1}$), $\text{C}-\text{O}$ stretching ($1310\text{--}1160\text{ cm}^{-1}$), $-\text{CH}$ ($2990\text{--}2830\text{ cm}^{-1}$) showed the PLGA polymer structure. In Figure 1B, infrared spectroscopy was used to study the interactions between the drug and the polymers. The PLGA 50:50 nanoparticles showed peaks such as OH stretching ($3560\text{--}3450\text{ cm}^{-1}$), $-\text{CH}$ ($3000\text{--}2855\text{ cm}^{-1}$), carbonyl $\text{C}=\text{O}$ stretching ($1780\text{--}1720\text{ cm}^{-1}$) and $\text{C}-\text{O}$ stretching ($1310\text{--}1160\text{ cm}^{-1}$). The PLGA nanoparticle formulation, which has similar structures to 1A, has been shown to contain specific functional groups. As a result of the study, it is seen that the protein is encapsulated into the nanoparticle. The blank nanoparticles in Figure 1C, observed structure peaks similar to filled nanoparticles, although slight shifts were observed in the peaks. In Figure 1D, in terms of amino acids, which are the basic structure of the protein, the large peak amine-derived $\text{N}-\text{H}$ at 3262 cm^{-1} and the $\text{O}-\text{H}$ peak from the carboxyl group were evaluated. $\text{C}=\text{N}$ vibrations seen in compact structure as a result of weak bond protein folding at 2140 cm^{-1} are included. $\text{C}=\text{O}$ carbonyl stretching can be seen in 1636 cm^{-1} [29].

The morphological properties and the size of the NPs were characterized by SEM. PLGA NPs were found to have a smooth and spherical surface morphology (Figure 2). Although there is a heterogeneous appearance in the particle system as a result of sem imaging analysis, most particles are nano-sized and nanoparticles were found to be compatible with size measurements using Zetasizer.

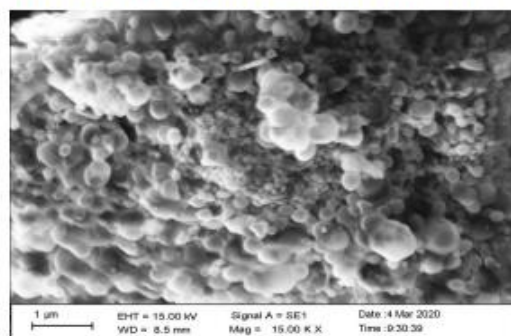


Figure 2. Scanning electron micrograph of TGF- β 1-loaded PLGA NPs.

DSC studies were carried out to determine drug status in developed nanoparticles and drug-polymer interaction during the production of nanoparticles. In Figure 3, shows DSC thermograms of blank PLGA nps and TGF- β 1 loaded nps. The endothermic peak at about 52°C is the melting point of PLGA. This peak was observed in both empty and filled nanoparticles. There was no change in the physical characteristics of TGF- β 1 containing nanoparticles formulation. Accordingly, TGF- β 1 protein is compatible with the polymer [30].

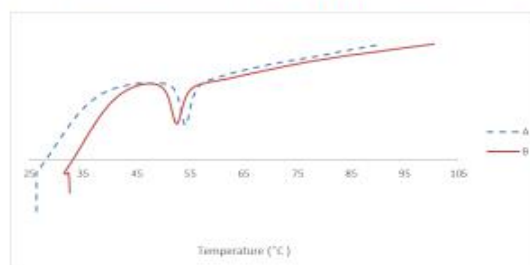


Figure 3. DSC thermograms TGF- β 1- loaded PLGA nanoparticles (A), blank nanoparticles (B).

2.2. *In vitro* release studies of PLGA nanoparticles

The release behaviour of the drug from the polymer matrix was realized as a biphasic system. It was initially characterized by a burst effect, followed by a slower sustained release. The release was determined using ELISA. This method is highly specific and sensitive to identify the protein of interest. Drug release amounts differed according to PLGA concentration. As the PLGA concentration increased, the burst effect decreased and a slower release occurred. Drug release of B, D, F, H and J formulations showed at the end of 30 days 35.1%, 25.2%, 24.3%, 19.06%, respectively as depicted in Figure 4. The lowest (8.72%) burst effect was observed at 5% PLGA concentration and the highest rate (20.88%) was observed at 1% in Figure 4. The initial burst drug release may be due to the presence of the surface drug on the surface area of the NPs. Also, the presence of the carboxylic acid group at the terminus of the PLGA polymer allows for better interaction with the protein and stabilizer BSA. As a result, a controlled release was observed with increased encapsulation and reduced burst effect [26].

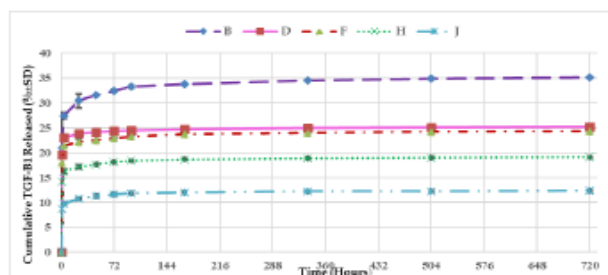


Figure 4. TGF-β1 release profiles from the PLGA nanoparticles. The error bars represent the standard deviations with n=3 for each one. (PBS buffer, pH 7.4, 37°C).

2.3. *In vitro* bioadhesion studies of PLGA nanoparticles

Bioadhesion values of the microspheres varied between 0.113 and 0.198 mJ/cm² (Table 1). There was no significant difference in the bioadhesion properties between nanoparticle formulations containing different PLGA concentrations ($p > 0.05$). The bioadhesion study of all nanoparticles is shown graphically in Figure 5. In the microparticle study carried out by Sezer et al. with chitosan and fucoidan, the triple-level of chitosan increased by 2.5 times in bioadhesion values, from 0.081 to 0.191 mJ/cm² [16]. It is suggested that chitosan has an adhesive structure as a polymer. In our study, the bioadhesion values of PLGA nanoparticles are in a similar range without chitosan. Therefore, PLGA nanoparticles are thought to exhibit a bioadhesiveness that cannot be ignored. This also; it provides an advantage in application to the injured area [16,17].

2.4. Cell culture studies

2.4.1. Cell viability assay (MTT assay)

In the MTT study, NIH-3T3 fibroblast cell line, which is one of the most common cells in wound healing, was used. In Figure 6A, it has been shown that both empty and filled nanoparticles are not cytotoxic and cause significant increases in cell viability. All nanoparticles significantly increased cell viability compared to both control and TGF-β1 ($p < 0.05$). Although there was no linear increase in cell viability with the increase in PLGA concentration, especially the empty nanoparticles E (3%), G (4%) and filled ones F (3%), H (4%) showed the best viability increase. The F-coded nanoparticle achieved a 196.81% maximum cell viability increase in the fibroblast cell line. This increase in NPs may be due to PLGA-induced lactic acid induction. As reported by Chereddy et al., high cell viability increases due to filled nps result from the combined effect of TGF-β1 and lactic acid induction. This delivery system created a combined effect. The findings that we have achieved are supported by Chereddy and his colleagues [4]. Reduction in cell viability was also observed in the forms after 3% Plga concentration in the formulations. In general, the increase in cell viability of the formulations compared to the TGF-β1 protein indicates that the formulations provided protein stability. It is stated that the

carrier system protects the protein against proteases and nuclease in the cell environment and provides its stability. Our study supports this [31].

In MTT assay for HaCaT cell line, none of the PLGA nanoparticle formulations are cytotoxic (Figure 6B). It was observed that the empty nanoparticles had higher cell viability statistically compared to those filled ($p < 0.05$). This result we obtained was in line with the BrdU cell proliferation study. Steven et al. TGF- β 1 is reported to reduce the proliferation of keratinocytes in wound healing [9]. The result of our study is similar. In the study, no difference was observed between nanoparticles due to PLGA concentration. Inhibition effect of TGF- β 1 on keratinocytes is known compared to control. Among the nanoparticle formulations developed, F (with a rate of 98.01%) has been demonstrated *in vitro* to increase the viability by reducing inhibition of keratinocytes involved in the wound healing process ($p < 0.05$) [6-9].

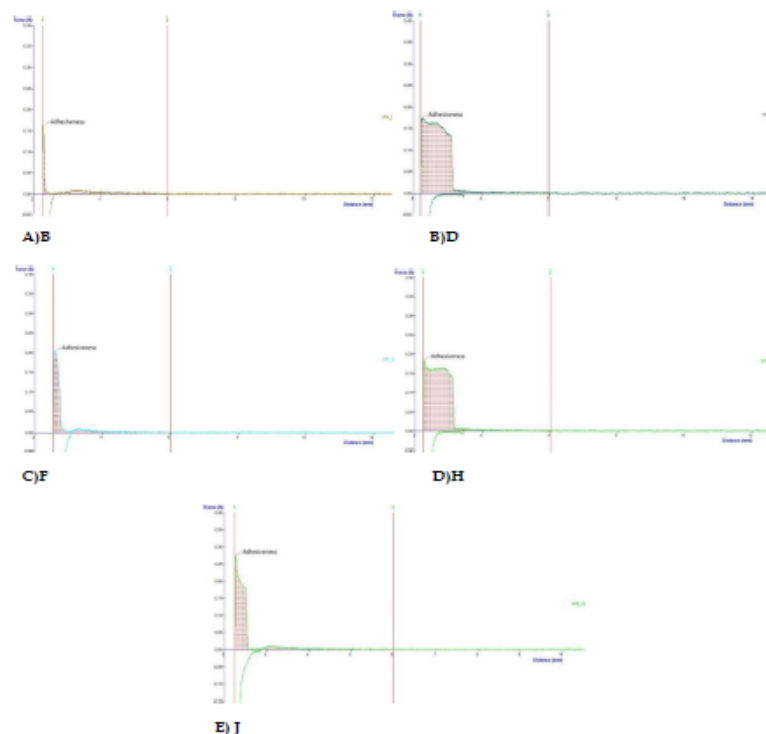


Figure 5. Work of bioadhesion graphs of the nanoparticles with B, D, F, H and J formulation codes. (n=3). Bioadhesion studies were performed on fresh chicken back skin using p10 perspex probe (R:10 mm, contact area: 0.785 cm²). [A)B, B)D, C)F, D)H, E)J].

2.4.2. BrdU cell proliferation assay

In the BrdU assay, the statistically significant formulations between empty and filled nanoparticles were 2% (C-D), 3% (E-F), 4% (G-H) ($p < 0.05$). While C, D, E, F, H-coded nps increase cell proliferation compared to control; compared to TGF- β 1, D, E, F, H coded NPs significantly increased cell proliferation ($p < 0.05$). In the *in vitro* study, the highest proliferation effect was observed in the 3% "F" nanoparticle for fibroblast cells, with

an increase of 92.5%. Although TGF-β1 protein increases fibroblast proliferation by 7% compared to control, it is not statistically significant ($p > 0.05$). The formulations developed provide more proliferation than TGF-β1 protein delivered to the cell alone, indicating that the carrier system provides effective protein stability [31]. In our study; due to the increased PLGA concentration, formulations with concentrations greater than 3% showed a decrease in fibroblast cell proliferation, as supported by the MTT study (Figure 7A).

In Figure 7B, nanoparticles containing TGF-β1 showed a lower proliferative effect compared to empty ones due to the protein's keratinocyte inhibition effect ($p < 0.05$). Formulations F, H and J are thought to support the proliferation of keratinocytes by reducing the cell proliferative inhibition effect of TGF-β1 alone. In our MTT study for HaCaT cell line, it supports the cell proliferation study. Especially the F (3%) coded nanoparticle is the common effective formulation of both studies [6-9].

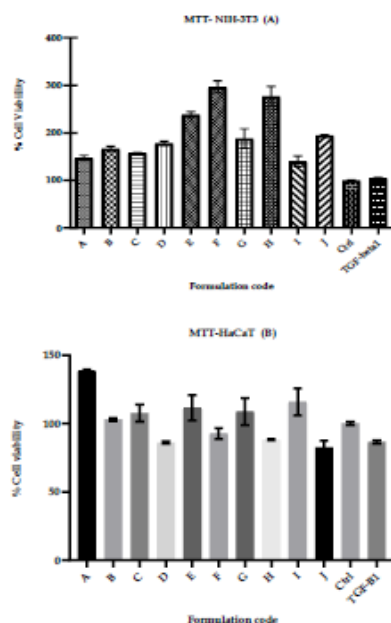


Figure 6. MTT cell viability results of fibroblast (A) and keratinocyte (B) cell lines (n=3). Control groups include DMEM and fibroblast (A)/ DMEM and keratinocyte (B).

2.4.3. In vitro wound-healing assay (Scratch assay)

Using a scratch test, we aimed to investigate the combined effect of empty and filled PLGA nanoparticles as drug delivery systems, the ability to accelerate the closure of a single-celled and artificially injured wound. As a result of the characterization studies, F coded nanoparticle was selected. After a 48-hour repair period at 37°C, HaCaT and NIH-3T3 cells proliferated more effectively and migrated to the damaged area in the presence of improved formulations than media only and medium containing TGF-β1 (Figure 8).

In the NIH-3T3 fibroblast cell line showed a proliferative effect with E-code nanoparticle lactate induction, increasing the cell population in the damaged area. F, the filled nanoparticle, showed the expected combine effect and formed the best wound healing response.

The HaCat cell line had no proliferative effect on E-encoded nanoparticle keratinocytes. In addition, it is thought that it does not contribute to migration since it does not contain TGF-β1. F has been observed to

provide maximum cell migration. Within both cell lines; TGF- β 1 protein alone achieved less migration compared to the F-code nanoparticle [4, 14, 19].

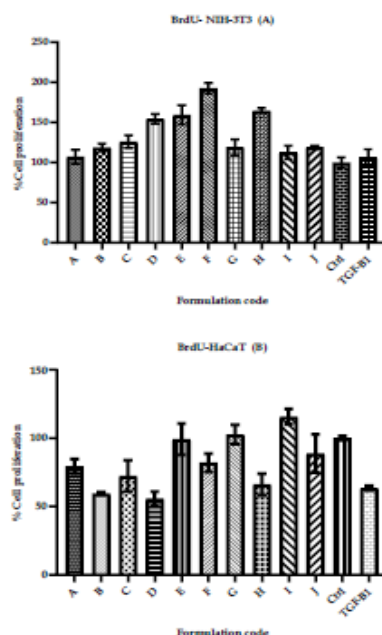


Figure 7. BrdU cell proliferation results of fibroblast (A) and keratinocyte (B) cell lines (n=3). Control groups include DMEM and fibroblast (A)/ DMEM and keratinocyte (B).

3. CONCLUSION

The main cells involved in the wound healing process are fibroblasts and keratinocytes. The combined effect of the PLGA nanoparticles and TGF- β 1 we developed was achieved after results that accelerated wound closure *in vitro*. This effect was mostly observed in F nanoparticles with a concentration of 3% PLGA. In addition, in parallel with *in vitro* studies, our active ingredient protein (TGF- β 1) has been shown to improve stability by increasing stability. It is promising that the drug delivery systems developed are biocompatible for the wound healing process, both alone and in combination with growth factor TGF- β 1.

4. MATERIALS AND METHODS

4.1. Materials

Recombinant human TGF- β 1Peprotech, USA; TGF- β 1 ELISA kit Enzo Life Sciences, USA; Poly(vinyl alcohol) (PVA, 88% hydrolyzed, Mw 25,000) Polysciences Inc, Warrington, PA; Poly (L,D-lactic-co-glycolic acid) (PLGA, RG503H), Boehringer Ingelheim, Germany; dichloromethane (DCM) Merck, Germany; Bovine Serum Albumin (BSA) BioShop, Canada Inc. Were obtained from these companies. 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide (MTT) Roche, Switzerland; BrdU (5-Bromo-2'-deoxyuridine) Cell Proliferation Assay Merck Millipore, USA; NIH 3T3 (ATCC-CRL-1658) and HaCaT (ATCC-PCS 200-011) were used in our studies. All materials used are in analytical grade.

4.2. Preparation of PLGA nanoparticles

PLGA nanoparticles (np) were prepared by a double-emulsion (water-in-oil-in-water) solvent evaporation technique. Different amount of PLGA dissolved in 2ml DCM. 1µg/10µl TGF-β1 with BSA %0.1 was added in it and homogenized (w/o). After that, the mixture was poured into 50 ml PVA 1% and homogenized (w/o/w). The mixture was stirred using a magnetic stirrer to remove the excess amount of DCM [13, 14]. The nanoparticles were separated by centrifugation at 12,000 rpm for 20 min. Then, the NPs were washed three times with deionized water and lyophilized (Lyovac GT 2E, Steris, Germany). PLGA nanoparticles are shown in Table 1.

4.3. Characterization of PLGA nanoparticles

4.3.1. Size, zeta potential and PDI of PLGA nanoparticles

The zeta potential, size and polydispersity index (PDI) measurements of nanoparticles were determined in a deionized water solution, 25 °C by using Zetasizer nano zs (Malvern Instruments, UK). All measurements were performed in triplicates.

4.3.2. Encapsulation efficiency of PLGA nanoparticles

The encapsulation efficiency is determined by calculating the amount of the non-encapsulated protein in the supernatant. Encapsulation efficiency was detected using an enzyme-linked immunoassay kit (TGF-β1 ELISA kit) [15]. The encapsulation efficiency was calculated using the following equation.

$$\text{Encapsulation efficiency (\%)} = \frac{\text{Amount of drug in a definite mass of the prepared particle (mg)} \times 100}{\text{Theoretical amount of drug in the same mass (mg)}} \quad [\text{Eq. 1}]$$

4.3.3. Fourier transform infrared spectroscopy

IR spectrum of TGF-β1 protein, PLGA polymer and PLGA nanoparticles were obtained. All formulations were freeze-dried. FT-IR spectra in the absorbance mode were recorded using FT-IR spectrometer (Thermo). Various peaks in the IR spectrum were interpreted for the presence of different groups.

4.3.4. Scanning electron microscopy

The morphology of the nanoparticles was observed by scanning electron microscopy (SEM) (Carl ZEISS/ EVO 40/Germany). Some nanoparticles were placed on a metallic surface, then coated with a gold-palladium layer. Observations were made at 10 kV.

4.3.5. Differential scanning calorimetric (DSC) analysis of PLGA nanoparticles

Differential Scanning Calorimetry (Setaram 131; Setaram Instrumentation) was performed to characterize the physical state of TGF-β1 in the nanoparticle. About 6 mg of sample was weighed, crimped into an aluminium pan and analyzed at a scanning temperature range from 25 to 100°C at a heating rate of 5°C/min [15].

4.4. In vitro release studies of PLGA nanoparticles

The TGF-β1 release was performed for 30 days in a 37°C water bath. PLGA nanoparticle-containing 10 ng TGF-β1 was weighed and incubated in 1 ml PBS (pH: 7.4) buffer. At the sampling times, the samples were centrifuged at 14000 rpm for 15 minutes, the supernatant was stored at -20°C and fresh PBS was added and maintained until the following time. Amounts of rhTGF-β1 released from nanoparticles were quantified using the ELISA kit (Enzo Life Sciences, USA). All samples were performed 3 times and standard deviations were indicated.

4.5. In vitro bioadhesion studies of PLGA nanoparticles

The bioadhesion of the nanoparticles was measured by described the method in articles 16 and 17. Measurements were determined using TA-XT Plus Texture Analyzer (Stable Micro Systems, UK), with p10 perspex probe (R:10 mm, contact area: 0.785 cm²) and 5 kg load cell. Fresh chicken back skin was cleaned from fat and debris and used as a tissue model (Ethical approval was obtained). The excised chicken skins were kept at 37°C before the test. Each measurement was made with fresh chicken skins [16, 17]. The surface

of the skin placed on the probe was washed with distilled water before starting the test. 5 mg of nanoparticle was weighed and attached to the bottom surface of the probe with double-sided adhesive tape. The nanoparticle-coated lower surface of the probe was applied to the tissue surface with a constant speed of 1 mm/s and 1.0 N constant force. After 2 minutes of contact time, the probe was removed in the vertical direction at the same constant speed. Data collection and calculation were performed by using the Texture Exponent 4.0.4.0 software package of the instrument. The area under the curve (AUC) was calculated from the force-distance plot as the work of bioadhesion using Texture Exponent 4.0.4.0 software package of the instrument [16]. Each measurement was performed in triplicate.

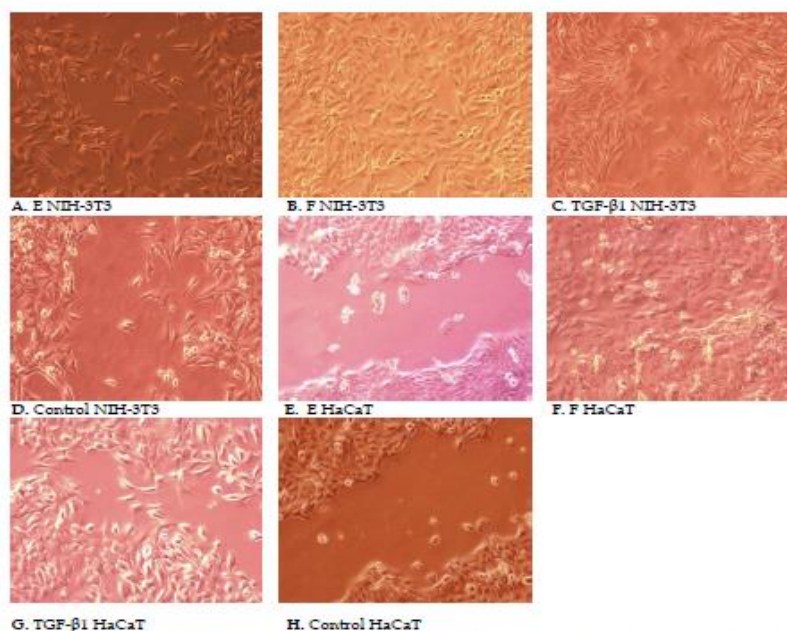


Figure 8. Scratch test. HaCaT and NIH-3T3 cells were seeded in six well plates and reached 70-80% of the cell population. A pipette tip was scratched and a photo was taken immediately. Cells were kept at 37°C for 48 hours, allowing repair of the damage and repeating the photograph. TGF-β1 (2.5 ng / 500 µl) was applied as a positive control. The experiment was repeated twice and similar results were obtained.

4.6. Cell culture studies

4.6.1. Cell viability assay (MTT assay)

Cytotoxicity of nanoparticles was measured by the MTT (3-(4,5-Dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide) assay, using NIH-3T3 (ATCC-CRL-1658) and HaCaT (ATCC-PCS 200-011) cells. Cells were seeded at 1×10^4 cells/well in 96-well plates (TPP, Trasadingen, Germany) with 100 µL complete medium (DMEM containing 10% FBS) and incubated overnight. Nanoparticles were weighed to contain 2.5 ng of TGF-β1 protein and were suspended with DMEM medium. TGF-β1 (2.5 ng / 500 µl) was applied as a positive control. After treatment, the cells were incubated for 24 h. After incubation, 10 µl of MTT solution (5mg/ml) was added to each well and the cells were incubated for 12 h (37°C, 5% CO₂). The formazan crystals, formed by live cells, were incubated for 24 hours to dissolve all. Then it was measured

spectrophotometrically at their absorbance at 550 and 690 nm using a microplate ELISA reader (Epoch Biotech USA 13121287). Cell viability was expressed as percentages compared to control groups [18, 19].

4.6.2. BrdU cell proliferation assay

The proliferation of NIH 3T3 and HaCaT cells was determined using a colourimetric immune assay based on the measurement of BrdU, which was incorporated during DNA synthesis. The BrdU assay was carried out according to the manufacturer's instructions. In the BrdU test, cell seeding, the addition of formulations and incubation period were performed the same as in the MTT test. The more BrdU attaches in place of the Thymine nucleotide in the DNA of proliferating cells, the bluer it is the colour of positive cells as a result of DNA synthesis. The reaction was stopped by pipetting 100 μ L/well of the acid Stop solution provided into each well. The colour of positive wells changed from blue to bright yellow. After then absorbance of plate was calculated by using an ELISA reader (Epoch Biotech 13121287 USA) set at a dual-wavelength of 450/550 nm.

4.6.3. In vitro wound healing assay (Scratch assay)

For the *in vitro* wound healing assay, optimized formulation, F, nanoparticle and its empty form, E, were selected. 40 μ g E and F np were weighed per well. F np contains 2.5 ng of TGF- β 1 at 40 μ g. HaCaT cells and fibroblast cells-NIH 3T3 were seeded in six-well plates (TPP, Switzerland) in a density of 5×10^5 cells/well in a growth medium. Cells were incubated until they had reached 70%-80% density. Then a scratch was made through each well using a sterile 200 μ L pipet tip. Cells were washed twice with PBS (pH 7.4) and the medium was changed. Selected formulations and a positive control TGF- β 1 were added to the medium. At the time of the first scratch on the cells and at the 24th and 48th hours, the images were taken using an inverted microscope with (Olympus CKX 41 Japan) equipped with Olympus D2 SLP phase contrast slider camera system. Cells were kept at 37°C, 5% CO₂ throughout the entire repair procedure. The experiments were repeated twice [19].

4.7. Statistical analysis

All results were expressed as mean $\pm$ standard deviation. The statistical analysis was performed using one-way analysis of variance (ANOVA) followed by Newman-Keuls multiple comparisons test. Differences between the groups were considered to be significant when $p < 0.05$.

Acknowledgements: This study was supported by the Commission of Marmara University Scientific Research Project BAPKO (SAG-C-DRP-090217-0042).

Author contributions: Concept - A.Ç.S., A.D.S.; Design - A.Ç.S., A.D.S.; Supervision - A.Ç.S., A.D.S.; Resource - A.Ç.S., A.D.S., T.U.; Materials - A.Ç.S., A.D.S., T.U.; Data Collection and/or Processing - A.Ç.S., S.Ş.; Analysis and/or Interpretation - A.Ç.S., S.Ş.; Cytotoxicity - A.Ç.S.; Literature Search - A.Ç.S.; Writing - A.Ç.S.; Critical Reviews - A.Ç.S., S.Ş., T.U., A.D.S.

Conflict of interest statement: The authors declare no conflict of interest.

Ethics committee approval: Animal experiments were approved by the ethical committee of Marmara University Animal Experiments Local Ethics Committee (Protocol No: 46.2018.mar, 07.05.2018).

REFERENCES

- [1] Hardwicke J, Schmaljohann D, Boyce D, Thomas D. Epidermal growth factor therapy and wound healing – past, present and future perspectives. *The Surgeon*. 2008; 6(3): 172-177. [\[CrossRef\]](#)
- [2] Martin P. Wound healing—aiming for perfect skin regeneration. *Science*. 1997; 276 (5309): 75-81. [\[CrossRef\]](#)
- [3] Demidova-Rice TN, Hamblin MR, Herman IM. Acute and impaired wound healing: pathophysiology and current methods for drug delivery, part 1: normal and chronic wounds: biology, causes, and approaches to care. *Adv Skin Wound Care*. 2012; 25(7): 304-314. [\[CrossRef\]](#)
- [4] Chereddy KK, Lopes A, Koussoroplis S, Payen V, Moia C, Zhu H, et al. Combined effects of PLGA and vascular endothelial growth factor promote the healing of non-diabetic and diabetic wounds. *Nanomedicine*. 2015; 11(8): 1975-1984. [\[CrossRef\]](#)
- [5] Chereddy KK, Vandermeulen G, Preat V. PLGA based drug delivery systems: Promising carriers for wound healing activity. *Wound Repair Regen*. 2016; 24(2): 223-236. [\[CrossRef\]](#)

- [6] Puolakkainen PA, Twardzik DR, Ranchalis JE, Pankey SC, Reed MJ, Gombots WR. The enhancement in wound healing by transforming growth factor-β1 (TGF-β1) depends on the topical delivery system. *J Surg Res*. 1995; 58(3): 321-329. [\[CrossRef\]](#)
- [7] Le M, Naridze R, Morrison J, Biggs LC, Rhea L, Schutte BC, et al. Transforming growth factor Beta 3 is required for excisional wound repair in vivo. *PloS one*. 2012; 7(10): e48040. [\[CrossRef\]](#)
- [8] O'Kane S, Ferguson MW. Transforming growth factor βs and wound healing. *Int J Biochem Cell Biol*. 1997; 29(1): 63-78. [\[CrossRef\]](#)
- [9] Beanes SR, Dang C, Soo C, Ting K. Skin repair and scar formation: the central role of TGF-beta. *Expert Rev Mol Med*. 2003; 5(8): 1-22. [\[CrossRef\]](#)
- [10] Gainza G, Villullas S, Pedras JL, Hernandez RM, Igarua M. Advances in drug delivery systems (DDSs) to release growth factors for wound healing and skin regeneration. *Nanomedicine*. 2015; 11(6): 1551-1573. [\[CrossRef\]](#)
- [11] Derman S, Kimbly K, Akdeste Z. Polymeric Nanoparticles. *Sigma Journal of Engineering and Natural Sciences*. 2013; 31: 109-122.
- [12] Dai C, Wang B, Zhao H. Microencapsulation peptide and protein drugs delivery system. *Colloids Surf B Biointerfaces*. 2005; 41(2-3): 117-120. [\[CrossRef\]](#)
- [13] Jaklencic A, Hinckfuss A, Bilgen B, Ciombor DM, Aaron R, Mathiowitz E. Sequential release of bioactive IGF-I and TGF-beta 1 from PLGA microsphere-based scaffolds. *Biomaterials*. 2008; 29(10): 1516-1525. [\[CrossRef\]](#)
- [14] Nie L, Zhang G, Hou R, Xu H, Li Y, Fu J. Controllable promotion of chondrocyte adhesion and growth on PVA hydrogels by controlled release of TGF-β1 from porous PLGA microspheres. *Colloids Surf B Biointerfaces*. 2015; 125: 51-57. [\[CrossRef\]](#)
- [15] Sun SB, Liu P, Shao FM, Miao QL. Formulation and evaluation of PLGA nanoparticles loaded capecitabine for prostate cancer. *Int J Clin Exp Med*. 2015; 8(10): 19670-19681.
- [16] Sezer AD, Cevher E, Hatipoğlu F, Oğurtan Z, Baş AL, Akbuğa J. The use of fucosphere in the treatment of dermal burns in rabbits. *Eur J Pharm Biopharm*. 2008; 69(1): 189-196. [\[CrossRef\]](#)
- [17] Kockisch S, Rees GD, Young SA, Tsiboulidis J, Smart JD. Polymeric Microspheres for Drug Delivery to the Oral Cavity: An In Vitro Evaluation of Mucoadhesive Potential. *J Pharm Sci*. 2003; 92(8): 1614-1623. [\[CrossRef\]](#)
- [18] Erdem-Çakmak F, Özbağ-Turan S, Şalva E, Akbuğa J. Comparison of VEGF gene silencing efficiencies of chitosan and protamine complexes containing shRNA. *Cell Biol Int*. 2014; 38(11): 1260-1270. [\[CrossRef\]](#)
- [19] Wolf NB, Küchler S, Radowski MR, Blaschke T, Kramer KD, Weindl G, et al. Influences of opioids and nanoparticles on in vitro wound healing models. *Eur J Pharm Biopharm*. 2009; 73(1): 34-42. [\[CrossRef\]](#)
- [20] Silva AL, Soema PC, Skütter B, Ossendorp F, Jiskoot W. PLGA particulate delivery systems for subunit vaccines: Linking particle properties to immunogenicity. *Hum Vaccin Immunother*. 2016; 12(4): 1056-1069. [\[CrossRef\]](#)
- [21] Mainardes RM, Evangelista RC. PLGA nanoparticles containing praziquantel: effect of formulation variables on size distribution. *Int J Pharm*. 2005; 290(1-2): 137-144. [\[CrossRef\]](#)
- [22] Chaisri W, Hennink WE, Okonogi S. Preparation and characterization of cephalixin loaded PLGA microspheres. *Curr Drug Deliv*. 2009; 6(1): 69-75. [\[CrossRef\]](#)
- [23] Kwon H-Y, Lee J-Y, Choi S-W, Jang Y, Kim J-H. Preparation of PLGA nanoparticles containing estrogen by emulsification-diffusion method. *Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects*. 2001; 182(1-3): 123-130. [\[CrossRef\]](#)
- [24] Xu B, Mensah RA, Kirton SB, Cook MT, Styliari ID, Hutter V, et al. Optimizing poly(lactic-co-glycolic acid) microparticle fabrication using a Taguchi orthogonal array design-of-experiment approach. *PloS One*. 2019; 14(9): e0222858. [\[CrossRef\]](#)
- [25] Vaidya PK. Master Thesis. Controlled Delivery of TGF-β1 from PLGA Nanoparticles. Department of Biomedical Engineering, Cleveland State University, Ohio, USA, 2012.
- [26] Jaklencic A, Wan E, Murray ME, Mathiowitz E. Novel scaffolds fabricated from protein-loaded microspheres for tissue engineering. *Biomaterials*. 2008; 29(2): 185-192. [\[CrossRef\]](#)
- [27] Lu L, Stamatatos GN, Mikos AG. Controlled release of transforming growth factor β1 from biodegradable polymer microparticles. *J Biomed Mater Res*. 2000; 50(3): 440-451. [\[CrossRef\]](#)
- [28] Jhunjhunwala S, Balmert SC, Raimondi G, Dons E, Nichols EE, Thomson AW, et al. Controlled release formulations of IL-2, TGF-β1 and rapamycin for the induction of regulatory T cells. *J Control Release*. 2012; 159(1): 78-84. [\[CrossRef\]](#)

- [29] Javadzadeh Y, Ahadi F, Davaran S, Mohammadi G, Sabzevari A, Adibkia K. Preparation and physicochemical characterization of naproxen-PLGA nanoparticles. *Colloids Surf B Biointerfaces*. 2010; 81(2): 498-502. [\[CrossRef\]](#)
- [30] Yang Z, Wang L, Tian L, Zhang X, Huang G. Tadalafil-loaded PLGA microspheres for pulmonary administration: preparation and evaluation. *Braz J Pharm Sci*. 2019; 55: e17536. [\[CrossRef\]](#)
- [31] Son S, Lee WR, Joung YK, Kwon MH, Kim YS, Park KD. Optimized stability retention of a monoclonal antibody in the PLGA nanoparticles. *Int J Pharm*. 2009; 368(1-2): 176-185. [\[CrossRef\]](#)

This is an open access article which is publicly available on our journal's website under Institutional Repository at <http://dspace.marmara.edu.tr>.

Ek 2- Tez çalışmasından üretilen posterler

Poster 1. 19th International Pharmaceutical Technology Symposium, September 17-19 2018, Antalya

Poster Presentations

P-73
PREPARATION AND CHARACTERIZATION OF PVA/CHITOSAN HYDROGELS EMBEDDED PLGA NANOPARTICLES CONTAINING TRANSFORMING GROWTH FACTOR $\beta 1$ (TGF- $\beta 1$)

Aysun Çelik¹; Ali Demir Sezer¹; Sevinç Şahbaz²; Timuçin Uğurlu²

¹ Marmara University Department of Pharmaceutical Biotechnology, Faculty of Pharmacy, Istanbul, Turkey
² Marmara University Department of Pharmaceutical Technology, Faculty of Pharmacy, Istanbul, Turkey

INTRODUCTION

Wound treatment from the past to the daytime is an important part of health care. Wound healing is a complex process involving many mechanisms. Inflammation, cell proliferation, matrix formation, re-tissue modelling constitute this process. Many growth factors and receptors also play a key role [1]. One of the most important modulators in wound healing is Transforming Growth Factor $\beta 1$ (TGF- $\beta 1$). It increases the number of endothelial cells and induces new granulation tissue formation by the effect of angiogenesis [2]. Poly(lactic-co-glycolic acid) (PLGA) is one of the most successfully developed biodegradable polymer. Poly(vinyl alcohol) (PVA) is a linear polymer [3] used in hydrogel formulations for wound healing [4]. We aimed to prepare different hydrogel formulations containing PLGA nanoparticles and investigate the mechanical properties and therapeutic efficacy [5].

MATERIALS AND METHODS

Materials

TGF- $\beta 1$ human (R), PVA, Chitosan (medium) chitosan (low), PLGA (LA/GA ratio 50:50) S03H, dichloromethane (DCM), Bovine Serum Albumine (BSA) were used in our studies. All materials were in analytical grade.

Methods

PLGA nanoparticles (np) and chitosan (chi) coated PLGA np were prepared by a double-emulsion (water-in-oil-in-water) solvent evaporation/ extraction technique. 60 mg PLGA dissolved in 2 ml DCM, 1 μ g/10 μ l TGF- $\beta 1$ was added in it and homogenized (w/o). After that, the mixture was poured into 50 ml PVA 1% / Chi 0.25% solution and homogenized (w/o/w). The mixture was stirred using a magnetic stirrer to remove excess amount of DCM [3]. The nanoparticles were separated by centrifugation at 10,000 rpm for 20 min. Then, the NPs were washed three times with deionized water. Finally, the sample was lyophilized (Table 1). PVA/Chi hydrogels were prepared by freezing and thawing method. Different concentrations of PVA and 2.5% chi were dissolved in water and blended (PVA: chi, 1:4 volume rate). 3 mg chitosan coated PLGA NPs were embedded in 50 ml hydrogel. Then, one cycle of freezing and thawing were carried out by keeping the samples at -20°C for 12 hours and then keeping them at room temperature (25°C) for 6 hours [4].

Table 1. Formulations of PLGA nanoparticles

FORMULATION CODE	PLGA	PVA	CHI	TGF- $\beta 1$	BSA
F1	%3	%1	-	1MG/ 10 ML	+
F2	%3	%1	-	-	-
F3	%3	%1	%0.25	1MG/ 10 ML	+
F4	%3	%1	%0.25	-	-

Two PLGA np formulations were optimized and used for preparing hydrogels (F3 and F4). The mechanical properties of formulations were determined using TA-XT Plus Texture Analyzer (Stable Micro Systems, UK), with a 5 kg load cell. Viscosity studies were performed using Brookfield DV-E viscometer (spindle 6, 30 rpm)

RESULTS AND DISCUSSION

Table 2. Size and Zeta potential values of PLGA nanoparticles

FORMULATION CODE	Zeta Potential	Size (nm)
F1	-3.63 $\pm$ 0.28	348.1 $\pm$ 55
F2	-10.23 $\pm$ 0.21	221.13 $\pm$ 10.90
F3	20.97 $\pm$ 0.47	547.1 $\pm$ 16.13
F4	24.3 $\pm$ 1.21	446.76 $\pm$ 14.60

Water absorption capacity, adhesiveness, hardness and compressibility values were increased due to the increase of PVA concentration in the formulations (Table 3,4). The incorporation of nanoparticles into hydrogels did not affect the mechanical properties significantly (Table 4).

Table 3. Formulations of hydrogels and results of swelling studies

FORMULATION CODE	PVA%	Chi %	F3 np	F4 np	water abs. capacity (g $\pm$ SD)
H1	2.5	2.5	-	-	0.305 $\pm$ 0.063
H2	5	2.5	-	-	0.359 $\pm$ 0.102
H3	10	2.5	-	-	0.454 $\pm$ 0.086
H4	2.5	2.5	+	-	0.294 $\pm$ 0.034
H5	5	2.5	+	-	0.386 $\pm$ 0.045
H6	10	2.5	+	-	0.474 $\pm$ 0.039
H7	2.5	2.5	-	+	0.300 $\pm$ 0.008
H8	5	2.5	-	+	0.344 $\pm$ 0.009
H9	10	2.5	-	+	0.423 $\pm$ 0.008
H10	-	2.5	-	-	0.334 $\pm$ 0.017

19th International Pharmaceutical Technology Symposium-IPTS 2018

Poster Presentations

Table 4. Mechanical Properties of Hydrogel Formulations

Test ID	Hardness N	Adhesiveness N.scc	Elasticity	Consistency	Compressibility N.scc
H1	0.061	0.015	0.983	0.621	0.272
S.D.	0.012	0.003	0.008	0.010	0.033
H2	0.057	0.024	0.962	0.579	0.284
S.D.	0.010	0.012	0.032	0.055	0.049
H3	0.100	0.079	0.914	0.502	0.490
S.D.	0.016	0.027	0.015	0.018	0.080
H4	0.066	0.032	0.640	0.383	0.292
S.D.	0.035	0.016	0.555	0.332	0.128
H5	0.077	0.034	0.967	0.575	0.359
S.D.	0.031	0.019	0.019	0.073	0.113
H6	0.117	0.043	1.030	0.685	0.442
S.D.	0.104	0.037	0.128	0.215	0.279
H7	0.065	0.012	1.008	0.631	0.295
S.D.	0.023	0.009	0.041	0.133	0.094
H8	0.064	0.053	1.047	0.668	0.307
S.D.	0.033	0.053	0.193	0.230	0.144
H9	0.159	0.063	0.953	0.589	0.609
S.D.	0.136	0.045	0.018	0.083	0.427
H10	0.046	0.039	0.979	0.786	0.263
S.D.	0.027	0.001	0.002	0.031	0.035

Results showed that the increase of PVA concentration in hydrogels improved the viscosity. Zeta potential of chitosan coated PLGA np is more desirable for entering the membrane of the cell compared with non-coated np (Table 2).

CONCLUSION

The increase of PVA concentration in formulations improves water absorption capacity, adhesiveness, compressibility so these formulations could be promising agent for future wound healing studies.

REFERENCES

- Martin P., WoundHealing: Aiming For Perfect Skin Regeneration, Science(1997) vol.276.
- Puolakkainen PA, Twardzik DR, et al, The enhancement in wound healing by transforming growth factor-beta 1 (TGF-beta 1) depends on the topical delivery system. (1995) Journal of Surgeon Res. Mar; 58(3):321-329.
- Nafee N, Teetz S, et al. Chitosan-coated PLGA nanoparticles for DNA/RNA delivery: effect of the formulation parameters on complexation and transfection of antisense oligonucleotides. Nanomedicine. Nanotechnology, Biology, and Medicine (2007) 3: 173-183.
- Mongia N, K, Anseth K, Peppas N, Mucoadhesive poly(vinyl alcohol) hydrogels produced by freezing/thawing processes: Applications in the development of wound healing systems. Journal of Biomaterials Science, Polymer Edition (1996), 7:12: 1055-1064.
- Sezer A.D., Cevher E., Hatipoğlu F., Oğurtan Z., Baş A.L., Akbuğa J. Biological and Pharmaceutical Bulletin (2008). 37(12): 2326-2333.

ACKNOWLEDGMENT

This study was supported by BAPKO (SAG-C-DRP-090217-0042).

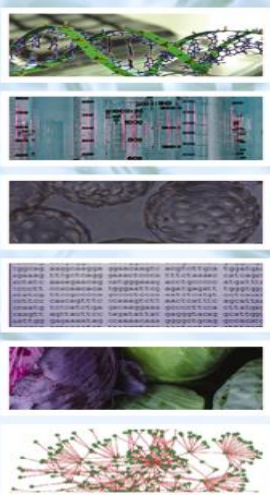
19th International Pharmaceutical Technology Symposium-IPTS 2018



Volume 305S, 15 November 2019

ISSN 0168-1656

Journal of BIOTECHNOLOGY



Supplement Issue
European Biotechnology Congress 2019 held on
April 11-13, 2019 in Valencia, Spain.



Special Issue
Publication of this Abstract Book is supported
by European Biotechnology Thematic Network
Association (EBTNA).

www.elsevier.com/locate/jbiotec

Abstracts / Journal of Biotechnology 305S (2019) S33–S88

S65

Aspergillus nidulans, and *AspsarO*, *Aspergillus oryzae*, inhibited PL by 39% and 36%, respectively. Fractionation of the active extracts using chloroform followed by Diaion HP-20 column eluted with 50% and 100% methanol revealed that 100% methanol fractions of both isolates were the most active ones with IC₅₀ of 5.85 µg/ml and 7.48 µg/ml, respectively compared to orlistat (3.72 µg/ml). Isolating and purification of the bioactive compounds is underway by column chromatography.

<https://doi.org/10.1016/j.jbiotec.2019.05.227>

PP-APR12-053

Preparation and in vitro evaluation of PVA/chitosan hydrogels and PLGA nanoparticles containing TGF-β1 for wound healing

A. Çelik^{1,*}, A. Sezer¹, S. Sahbaz², T. Uğurlu²

¹ Marmara University Department of Pharmaceutical Biotechnology, Faculty of Pharmacy Istanbul, Turkey

² Marmara University Department of Pharmaceutical Technology, Faculty of Pharmacy Istanbul, Turkey

Wound healing process consists of complex and interlocked mechanisms (homeostasis, inflammation, cell proliferation, remodeling). One of the growth factors involved in this mechanism is Transforming Growth Factor Beta-1 (TGF-β1). It is largely released from platelets, but is also produced from activated macrophages, neutrophils, fibroblasts, keratinocytes, T-lymphocytes, and endothelial cells. In this study, it is aimed to develop different formulations in wound healing process. Poly (lactic-co-glycolic acid) (PLGA) nanoparticles (np) were prepared by a double-emulsion (water-in-oil-in-water) solvent evaporation technique. Characterization studies (size, zeta potential, encapsulation efficiency) of np were carried out. Polyvinyl alcohol/Chitosan (PVA/Chi) hydrogels were prepared by freezing and thawing method. Compared to chitosan gel (F4), the increase in PVA concentration in gel formulations (F1-F2-F3) resulted in increased viscosity, bioadhesion, adhesion and hardness, respectively. (6766.7 ± 450.8, 8196.7 ± 57.7, 21300.0 ± 5208.4, 15233.3 ± 1615.0); (0.072 ± 0.007, 0.218 ± 0.011, 0.509 ± 0.032, 0.430 ± 0.045); (0.037 ± 0.007, 0.053 ± 0.009, 0.315 ± 0.026, 0.086 ± 0.020); (0.052 ± 0.002, 0.089 ± 0.003, 0.455 ± 0.077, 0.098 ± 0.019). MTT assay was carried out to measure cell viability. BrdU was used for detection of cell proliferation for HACAT and NIH-3T3 cell line. It was shown that Empty PLGA nps gave lactate-induced proliferation. TGF-β1 including PLGA nps showed increased effect compared to empty nps. Also, it was shown that all developed formulations were non-cytotoxic. In addition, the cell viability increased by more than one hundred percent.

<https://doi.org/10.1016/j.jbiotec.2019.05.228>

PP-APR12-054

Micro-encapsulation of anticancer drug carboplatin in silk fibroin and chitosan nano / micro particles as breast cancer treatment

T. Adali^{1,*}, P. Tulay³, G. Altinoglu²

¹ Department of Biomedical Engineering, Near East University, Nicosia, Cyprus

² Tissue Engineering and Biomaterials Research Centre, Centre of Excellence, Near East University, Nicosia, Cyprus

³ Near East University, Faculty of Medicine, Department of Medical Genetics, Nicosia, Cyprus

Breast cancer is the most common cancer type diagnosed in women. Chemotherapy suffers from inadequate targeting of cancer cells, and a risk of collateral damage to normal cells. Therefore, the use of drug delivery vehicles has been proposed. In this study, carboplatin was encapsulated with naturally occurring biomaterials; chitosan (CHI) and silk fibroin (SF). The CHI and SF micro / nano particles were synthesized by ionotropic gelation technique, loaded with carboplatin and characterized by IX53 Inverted microscope zeta potential and zeta size.

The apoptotic effects of drug-loaded micro-particles were tested on breast cancer cell lines MCF-7. MCF-7 cells were cultured in DMEM supplemented with 10% v/v FBS and 10 µg/ml insulin. Apoptosis of MCF-7 cells were tested using Apostrand Elisa Apoptosis Detection Kit.

The apoptosis of MCF-7 cells with 10 µM–400 µM SF-carboplatin and 10 µM–400 µM CHI-carboplatin micro-particles cultured for 24, 48 and 72 hours were assessed. The absorbance value for both the SF-CP and CHI-CP gradually increased with higher concentration indicating significant cell death. Furthermore, apoptotic effect of CHI-carboplatin was shown to be better compared to SF-carboplatin in MCF-7 cells. In conclusion, the results confirm the direct apoptotic effect of both SF-CP and CHI-CP micro / nano particles MCF-7 cells.

<https://doi.org/10.1016/j.jbiotec.2019.05.229>

PP-APR12-055

Silk fibroin-encapsulated ibuprofen micro-particles: synthesis, characterization and anticancer activity

G. Altinoglu^{1,2,*}, T. Adali^{1,2}, P. Tulay³

¹ Department of Biomedical Engineering, Near East University, Cyprus

² Tissue Engineering and Biomaterials Research Centre, Near East University, Cyprus

³ Near East University, Faculty of Medicine, Department of Medical Genetics, Cyprus

Ek 3- Marmara Üniversitesi Deney Hayvanları Etik Kurul Karar Formu



MARMARA ÜNİVERSİTESİ HAYVAN DENEYLERİ YEREL ETİK KURULU

PROJE ONAY FORMU

BAŞVURU BİLGİLERİ	PROTOKOL KODU	46.2018.mar	ÇALIŞMA: TEZ		
	PROJE ADI	Dönüştürücü Büyüme Faktörü Beta İçeren Farklı Farmasötik Dozaj Formlarının Hazırlanması ve Etkinliklerinin Hücre Kültürü Temelli Olarak Araştırılması			
	SORUMLU ARAŞTIRMACI ÜNVANI/ ADI	Doç. Dr. Ali Demir SEZER			
	ARAŞTIRMA MERKEZİ	DEHAMER			
	DESTEKLEYİCİ				
KARAR BİLGİLERİ	TARİH: 07. 05. 2018 Yukarıda başvuru bilgileri verilen araştırma başvuru dosyası ve ilgili belgeler araştırmanın gerekece, amaç, yaklaşım ve yöntemleri dikkate alınarak incelenmiş ve gerçekleştirilmesinde sakınca bulunmadığı için kurulumuza onaylanmasına oy birliği ile karar verilmiştir. Onay sonrasında yapılacak her türlü proje değişiklikleri (katılımcılar, başlık vb.) veya protokol değişikliklerinin Etik Kurula bildirilerek proje onayının yenilenmesi gerekmektedir.				
ETİK KURUL BİLGİLERİ					
ÇALIŞMA ESASI	Deney hayvanları ile yapılacak olan bilimsel araştırma, test, sağlık hizmetleri uygulamaları ve eğitim-öğretim gibi temel etkinliklerde kullanılan yöntem ve materyaller ile ilgili etik standartları gözetmek, etik ilkeler doğrultusunda görüş bildirmek, araştırma önerilerini incelemek ve sertifikası olmayanların deney hayvanı kullanmalarını engellemektir.				
ÜYELER					
Ünvanı/ Adı/ Soyadı	Uzmanlık Dalı	Kurumu/ Ek Üyeliği	Onaylanan Proje ile İlişkisi	Toplantıya Katılım	İmza
Prof.Dr. Göksel ŞENER	Farmakoloji	M.Ü. Eczacılık Fakültesi ve Hayvan Deneyleri Etik Kurul Başkanı	Var Yok	Evet Hayır	
Prof.Dr. Levent KABASAKAL	Farmakoloji	M.Ü. Eczacılık Fakültesi ve Hayvan Deneyleri Etik Kurul Üyesi	Var Yok	Evet Hayır	
Prof.Dr. Ayşen YARAT	Biyokimya	M.Ü. Diş Hekimliği Fakültesi ve Hayvan Deneyleri Etik Kurul Üyesi	Var Yok	Evet Hayır	
Prof.Dr. Serap ŞİRVANCI	Histoloji Embriyoloji ABD	M.Ü. Tıp Fakültesi ve Hayvan Deneyleri Etik Kurul Üyesi	Var Yok	Evet Hayır	
Prof.Dr. Rezzan GÜLHAN	Farmakoloji	M.Ü. Tıp Fakültesi ve Hayvan Deneyleri Etik Kurul Üyesi	Var Yok	Evet Hayır	
Doç.Dr. Gürkan SERT	Tıp Tarihi ve Etik	M.Ü. Tıp Fakültesi ve Hayvan Deneyleri Etik Kurul Üyesi	Var Yok	Evet Hayır	
Vet. Dr. Dilek ÖZBEYLİ	Veteriner Hekim	M.Ü. Tıp Fakültesi ve Hayvan Deneyleri Etik Kurul Üyesi	Var Yok	Evet Hayır	
Bio. Arif GÜMÜŞ	Biyoloji	Sivil Toplum Kuruluşu Üyesi ve Kurumla ilişkisi olmayan TC vatandaşı üye	Var Yok	Evet Hayır	
Cihanşah MURATOĞLU	Serbest Danışmanlık	Kurumla ilişkisi olmayan TC vatandaşı üye	Var Yok	Evet Hayır	

10. ÖZGEÇMİŞ

Adı	Aysun	Soyadı	ÇELİK SOYSAL
Doğum Yeri	Kadıköy/İstanbul	Doğum Tarihi	14/06/1989
Uyruğu	T.C.	Tel	535 822 72 02
E-mail	aysunceliksoysal@gmail.com		

Eğitim Düzeyi

	Mezun Olduğu Kurumun Adı	Mezuniyet Yılı
Doktora/Uzmanlık	Marmara Üniversitesi Eczacılık Fakültesi	2020
Lisans	Gazi Üniversitesi Eczacılık Fakültesi	2013
Lise	Pendik Anadolu Lisesi	2007

İş Deneyimi

Görevi	Kurum	Süre (Yıl - Yıl)
1	Bülent Ecevit Üniversitesi Eczacılık Fakültesi Farmasötik Biyoteknoloji Anabilim Dalı	01/2014- 09/2014
2	Marmara Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü	09/2014- Halen

Yabancı Dilleri	Okuduğunu Anlama*	Konuşma*	Yazma*
İngilizce	Çok iyi	iyi	iyi

Yabancı Dil Sınav Notu #								
YDS	ÜDS	IELTS	TOEFL IBT	TOEFL PBT	TOEFL CBT	FCE	CAE	CPE
78.75								

	Sayısal	Eşit Ağırlık	Sözel
ALES Puanı	81.66	70.56	83.17
(Diğer) Puanı			

Bilgisayar Bilgisi

Program	Kullanma becerisi
Microsoft Office Programları	Çok iyi

*Çok iyi, iyi, orta, zayıf olarak değerlendiriniz.

