BETA-LAKTAM ANTİBİYOTİKLERLE SİNERJİK ETKİYE SAHİP BOR KATKILI DOKU İSKELELERİNİN GELİŞTİRİLMESİ

DEVELOPMENT OF BORON DOPED TISSUE SCAFFOLDS WHICH HAVE SYNERGISTIC EFFECTS WITH BETA-LACTAME ANTIBIOTICS

DEMET ÇAKIR

PROF. DR. MENEMŞE GÜMÜŞDERELİOĞLU

Tez Danışmanı

Hacettepe Üniversitesi

Lisansüstü Eğitim-Öğretim ve Sınav Yönetmeliğinin

Kimya Mühendisliği Anabilim Dalı için Öngördüğü

YÜKSEK LİSANS TEZİ

olarak hazırlanmıştır.

2018

DEMET ÇAKIR' ın hazırladığı "Beta-Laktam Antibiyotiklerle Sinerjik Etkiye Sahip Bor Katkılı Doku İskelelerinin Geliştirilmesi" adlı bu çalışma aşağıdaki jüri tarafından **KİMYA MÜHENDİSLİĞİ ANABİLİM DALI**' nda **YÜKSEK LİSANS TEZİ** olarak kabul edilmiştir.

Prof. Dr. Nuray YILDIZ
Başkan .....

Prof. Dr. Menemşe GÜMÜŞDERELİOĞLU
Danışman .....

Prof. Dr. Nevin KESKİN
Üye .....

Prof. Dr. Zümriye AKSU
Üye .....

Prof. Dr. Deniz TANYOLAÇ
Üye .....

Bu tez Hacettepe Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü tarafından **YÜKSEK LİSANS TEZİ** olarak onaylanmıştır.

Prof. Dr. Menemşe GÜMÜŞDERELİOĞLU
Fen Bilimleri Enstitüsü Müdürü

YAYINLAMA VE FİKRİ MÜLKİYET HAKLARI BEYANI

Enstitü tarafından onaylanan lisansüstü tezimin/raporumun tamamını veya herhangi bir kısmını, basılı (kağıt) ve elektronik formatta arşivleme ve aşağıda verilen koşullarla kullanıma açma iznini Hacettepe üniversitesine verdiğimi bildiririm. Bu izinle Üniversiteye verilen kullanım hakları dışındaki tüm fikri mülkiyet haklarım bende kalacak, tezimin tamamının ya da bir bölümünün gelecekteki çalışmalarda (makale, kitap, lisans ve patent vb.) kullanım hakları bana ait olacaktır.

Tezin kendi orijinal çalışmam olduğunu, başkalarının haklarını ihlal etmediğimi ve tezimin tek yetkili sahibi olduğumu beyan ve taahhüt ederim. Tezimde yer alan telif hakkı bulunan ve sahiplerinden yazılı izin alınarak kullanması zorunlu metinlerin yazılı izin alarak kullandığımı ve istenildiğinde suretlerini Üniversiteye teslim etmeyi taahhüt ederim.

☐ **Tezimin/Raporumun tamamı dünya çapında erişime açılabilir ve bir kısmı veya tamamının fotokopisi alınabilir.**

(Bu seçenekle teziniz arama motorlarında indekslenebilecek, daha sonra tezinizin erişim statüsünün değiştirilmesini talep etseniz ve kütüphane bu talebinizi yerine getirse bile, tezinin arama motorlarının önbelleklerinde kalmaya devam edebilecektir.)

☒ **Tezimin/Raporumun 10.01.2020 tarihine kadar erişime açılmasını ve fotokopi alınmasını (İç Kapak, Özet, İçindekiler ve Kaynakça hariç) istemiyorum.**

(Bu sürenin sonunda uzatma için başvuruda bulunmadığım taktirde, tezimin/raporumun tamamı her yerden erişime açılabilir, kaynak gösterilmek şartıyla bir kısmı veya tamamının fotokopisi alınabilir)

☐ **Tezimin/Raporumun ..... tarihine kadar erişime açılmasını istemiyorum, ancak kaynak gösterilmek şartıyla bir kısmı veya tamamının fotokopisinin alınmasını onaylıyorum.**

☐ **Serbest Seçenek/Yazarın Seçimi**

09/01/2018



DEMET ÇAKIR

ETİK

Hacettepe Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü, tez yazım kurallarına uygun olarak hazırladığım bu tez çalışmasında,

- tez içindeki bütün bilgi ve belgeleri akademik kurallar çerçevesinde elde ettiğimi,
- görsel, işitsel ve yazılı tüm bilgi ve sonuçları bilimsel ahlak kurallarına uygun olarak sunduğumu,
- başkalarının eserlerinden yararlanılması durumunda ilgili eserlere bilimsel normlara uygun olarak atıfta bulunduğumu,
- atıfta bulunduğum eserlerin tümünü kaynak olarak gösterdiğimi,
- kullanılan verilerde herhangi bir tahrifat yapmadığımı,
- ve bu tezin herhangi bir bölümünü bu üniversitede veya başka bir üniversitede başka bir tez çalışması olarak sunmadığımı

beyan ederim.

Tarih: 09/01/2018



DEMET ÇAKIR

ÖZET

BETA-LAKTAM ANTİBİYOTİKLERLE SİNERJİK ETKİYE SAHİP BOR KATKILI DOKU İSKELELERİNİN GELİŞTİRİLMESİ

Demet ÇAKIR

Yüksek Lisans, Kimya Mühendisliği Anabilim Dalı

Tez Danışmanı: Prof. Dr. Menemşe GÜMÜŞDERELİOĞLU

Ocak 2018, 110 sayfa

Sunulan tez çalışmasında herhangi bir kemik hasarında enfeksiyonu önleyici ve tedavi sürecini hızlandırıcı sistemler olarak, beta-laktam antibiyotikleri ile sinerjik etkiye sahip bor katkılı hidroksiapatit (B-HAp)/kitosan doku iskelelerinin geliştirilmesi amaçlanmıştır. Bu kapsamda, MC3T3-E1 fare öncül kemik hücre hattı ile hücre kültür çalışmaları yapılarak hücre proliferasyonu incelenmiştir. Ayrıca, seçilen çeşitli bakteri suşları ile çalışılarak bir beta-laktam antibiyotiği olan amoksisilin (AMX) ve biyomimetik yöntem ile üretilen B-HAp arasındaki sinerjik etki incelenmiştir.

İkili-emülsiyon hazırlama-çözücü buharlaştırma (w/o/w) yöntemi kullanılarak AMX yüklü poli(laktik-ko-gikolik asit) (PLGA) nanopartiküller üretilmiştir. AMX'in, PLGA nanopartiküllere enkapsülasyon verimi %36 olarak bulunmuştur. Boş ve AMX yüklü PLGA nanopartiküllerin çapları sırasıyla, 187 nm ve 182 nm olarak belirlenmiştir. PLGA nanopartiküller ile gerçekleştirilen 85 günlük salım çalışması sonucunda, ilk saatte ani patlama etkisi ile AMX'in %20'sinin salındığı ve AMX salımının uzun dönemli olarak kontrollü bir şekilde gerçekleştiği belirlenerek salım mekanizmasının

“Higuchi modeli”ne uygun olarak difüzyon mekanizması ile gerçekleştiği kanıtlanmıştır.

Tez çalışmasının devamında AMX yüklü PLGA nanopartiküllerin varlığında dondurarak-kurutma yöntemiyle B-HAp/kitosan nanokompozit doku iskeleleri hazırlanmış ve karakteristik özellikleri belirlenmiştir. AMX salımının partiküllerden salıma nazaran daha yavaş ve daha kontrollu biçimde difüzyon mekanizmasıyla gerçekleştiği görülmüştür.

AMX yüklü PLGA nanopartikül içeren B-HAp/kitosan doku iskelelerinin hücre proliferasyonuna etkisini incelemek için MC3T3-E1 hücre hattı ile 7 gün süren *in-vitro* hücre kültür çalışmaları gerçekleştirilmiştir. B-HAp ile birlikte kullanılan düşük AMX miktarlarının hücre proliferasyonu üzerinde istatistiksel olarak anlamlı bir etkisinin olmadığı gözlenmiştir.

Beta-laktam antibiyotiği AMX ile B-HAp arasındaki sinerjik etkinin incelenebilmesi için beta-laktamaz enzimi üreten 4 farklı bakteri suşu (*Staphylococcus aureus* ATCC®25923, *Escherichia coli* ATCC®25922, *Klebsiella pneumoniae* ATCC®BAA-1144 ve *Klebsiella pneumoniae* ATCC®700603) ve 3 faklı yöntem ile (çift disk sinerji yöntemi, agar difüzyon yöntemi ve gradiyent testi) bakteriyel çalışmalar gerçekleştirilmiştir. Test sonuçları AMX ile B-HAp arasındaki sinerjik etkinin varlığını kanıtlamıştır.

Tez çalışması kapsamında elde edilen sonuçlar ışığında, beta-laktam antibiyotiği salan ve bor içeren doku iskelelerinin kemik dokusunun yenilenmesinde hücresel ve antibakteriyel özellikleri ile etkin bir biçimde kullanılabilecekleri gösterilmiştir.

Anahtar kelimeler: amoksisilin; ilaç salımı; doku iskelesi; bor; hidroksiapatit; antibakteriyel davranış.

ABSTRACT

DEVELOPMENT OF BORON DOPED TISSUE SCAFFOLDS WHICH HAVE SYNERGISTIC EFFECTS WITH BETA-LACTAME ANTIBIOTICS

Demet ÇAKIR

Master of Science, Chemical Engineering Division

Supervisor: Prof. Dr. Menemşe GÜMÜŞDERELİOĞLU

January 2018, 110 pages

In the presented study, it was aimed to develop boron-doped hydroxyapatite (B-HAp)/chitosan tissue scaffolds which have synergistic effect with beta-lactame antibiotics as systems to prevent infection and speed up the treatment of any bone damage. For this purpose, cell proliferation was investigated by cell culture studies with MC3T3-E1 mouse precursor bone cell line. In addition, the synergistic effect between amoxicillin (AMX), a beta-lactam antibiotic, and B-HAp, produced by the biomimetic method, was studied with selected bacterial strains.

AMX loaded poly(lactic-co-glycolic acid) (PLGA) nanoparticles were produced using the double-emulsion preparation-solvent evaporation (w/o/w) method. Encapsulation yield of AMX to PLGA nanoparticles was found to be 36%. The diameters of empty and AMX loaded PLGA nanoparticles were determined to be 187 nm and 182 nm, respectively. It has been proven through the 85-day release study with PLGA nanoparticles that 20% of AMX is released by a burst effect in the first hour and the AMX release is carried out in a long-term and controlled manner,

proving that the release is achieved by the diffusion mechanism according to the "Higuchi model".

In the on-going study B-HAp/chitosan nanocomposite tissue scaffolds were prepared by freeze-drying method in the presence of AMX loaded PLGA nanoparticles and their characteristics were determined. It has been observed that the AMX release is achieved by a slower and more controlled diffusion mechanism than that of the particles.

In-vitro cell culture studies were performed with the MC3T3-E1 cell line for 7-day to examine the effect of AMX loaded PLGA nanoparticle containing B-HAp/chitosan tissue scaffolds on cell proliferation. There was no statistically significant effect of low AMX doses used with B-HAp on cell proliferation.

Four different bacterial strains (*Staphylococcus aureus* ATCC®25923, *Escherichia coli* ATCC®25922, *Klebsiella pneumoniae* ATCC®BAA-1144 and *Klebsiella pneumoniae* ATCC®700603), which produce the beta-lactamase enzyme, and three different methods (double disk synergy method, agar diffusion method and gradient test) were used to examine the synergistic effect between the beta-lactame antibiotic, AMX, and B-HAp. Test results proved the synergistic effect between AMX and B-HAp.

The results obtained within the scope of the study indicated that beta-lactam antibiotic releasing and boron containing tissue scaffolds could be used effectively with their cellular and antibacterial properties in bone tissue regeneration.

Keywords: amoxicillin; drug delivery; tissue scaffold; boron; hydroxyapatite; antibacterial behaviour.

TEŞEKKÜR

Tez çalışmalarımın yürütülmesi ve sonuçlandırılması için gerekli olan desteği hiçbir zaman esirgemeyen, engin bilgi ve deneyimleri ile bana yol gösteren, umutsuzluğa kapıldığım anlarda bir anne şefkati ile beni cesaretlendiren, çalışma disiplinini ve insani yönlerini her zaman örnek alacağım, öğrencisi olduğum için büyük bir mutluluk ve gurur duyduğum çok değerli hocam ***Prof. Dr. Menemşe Gümüşderelioğlu'na*** sonsuz saygı ve teşekkürlerimi sunarım.

Bakteriyolojik çalışmalarımda laboratuvarlarını kullanmamıza izin vererek tezime katkı sağlayan değerli hocam ***Prof. Dr. Nuran Diril'e*** ve öğrencilerine teşekkürlerimi sunarım.

Çalışmalarımın tüm aşamalarında büyük emeği olan, bilgi ve tecrübeleriyle bana yol gösteren, her zaman yanımda olduğunu bildiğim değerli ***Gülseren Irmak'a*** ve bakteriyel çalışmalar ile ilgili tezime büyük katkılarda bulunanarak bilgi ve tecrübelerini paylaşan ***Dr. Farzin Asghari Sana'ya*** en içten sevgi ve teşekkürlerimi sunarım.

Anlayışları ve ilgileri ile bana her zaman manevi olarak büyük destek olan, umutsuzluğa kapıldığımda beni hep cesaretlendirerek bana inanan değerli hocalarım ***Prof. Dr. Zümriye Aksu*** ve ***Prof. Dr. Deniz Tanyolaç'a*** saygı ve teşekkürlerimi sunarım.

İyi ve kötü zamanlarımda hep yanımda olan, üzüntülerimi ve mutluluklarımı paylaşarak beni hiç yalnız bırakmayan, dostlarım olduğu için büyük bir mutluluk duyduğum canım arkadaşlarım ***Pınar Gözde Toprak*** ve ***Hatice Pınar Kırlı*****'ya**,

Birlikte çalışmaktan büyük mutluluk ve keyif duyduğum, nice anılar biriktirip daha nicelerini biriktirmeyi dilediğim canım arkadaşlarım ***Arş. Gör. Tuğçe Gültan'a, Şeyma Bektaş'a, Elvan Konuk'a, Ebru Tamahkar'a, Meltem Gamze Öztürk'e, Sena Koç'a, Tülay Selin Ertekin'e, Gülnihal Tok'a*** ve ***Aslı Sena Karanfil'e,***

Sorularımı hiçbir zaman yanıtsız bırakmayan, bilgi ve tecrübeleri ile her zaman destek olan ***Yrd. Doç. Dr. Işıl Gerçek Beşkardeş'e, Arş. Gör. Dr. Damla Çetin Altındal'a, Arş. Gör. Dr. Soner Çakmak'a, Dr. Anıl Sera Çakmak'a, Özge Ekin Akdere'ye, Gökçe Kaynak Bayrak'a*** ve ***Arş. Gör. Burcu Sarıkaya'ya***

Bilgi ve desteklerini her zaman hissettiğim, burada adını sayamadığım ***Hücre ve Doku Mühendisliği Araştırma Grubu'nun değerli üyelerine***,

Anlayışları ve sevgileri ile hep destek olan, iyi ve kötü her anımı paylaşabildiğim ***Hatice Bektaş'a, Hatice Yalçındere'ye, Arş. Gör. Dr. S. Pınar Kodal'a, Arş. Gör. Dr. Hande Günan Yücel'e, Arş. Gör. Dr. Özge Yüksel Orhan'a, Arş. Gör. Dr. A. Aslıhan Gökaltun'a, Arş. Gör. Dr. Yasemin Günaydın'a, Arş. Gör. Dr. Hande Ünsal Hunter'a*** ve ***Arş. Gör. İlkay Koçer'e,***

Hayatım boyunca beni her zaman destekleyen, sevgilerini ve emeklerini hiçbir zaman esirgemeyen, benimle ağlayıp benimle gülen, benim bu günlere gelmemde en büyük destekçilerim olan canımın içi ***Annem'e*** ve bitanecik ***Ablam'a,***

Son olarak, beni gökyüzünden her daim izlediğini düşündüğüm canım ***Babam'a,***

En içten sevgilerimi sunar ve sonsuz teşekkürler ederim.

İÇİNDEKİLER

Sayfa

ÖZET ..... **i**

ABSTRACT ..... **iii**

TEŞEKKÜR ..... **v**

İÇİNDEKİLER ..... **vi**

ÇİZELGELER DİZİNİ ..... **ix**

ŞEKİLLER DİZİNİ ..... **x**

SİMGELER VE KISALTMALAR ..... **xiii**

1. GİRİŞ **1**

2. GENEL BİLGİLER **4**

2.1. Doku Mühendisliği 4

2.2. Kemik Doku Mühendisliği 4

2.2.1. Kemiğin Yapısı ve Özellikleri 5

2.2.2. Kemik Doku Mühendisliği Yaklaşımı 6

2.2.3. Kemik Doku Mühendisliğinde Kullanılan Biyomalzemeler ve Doku İskeleleri 7

2.2.4. Kemik Doku Mühendisliğinde Kullanılan Hücreler ve Biyosinyal Moleküller 9

2.3. Antibiyotikler 10

2.3.1. Kullanım Alanları 11

2.3.2. Etki Mekanizmaları 12

2.3.3. Sınıflandırılmaları 14

2.4. Beta-Laktam Antibiyotikleri 16

2.4.1. Penisilin Grubu Beta-Laktamlar 19

2.4.1.1. Amoksisilin (AMX) 21

2.5. Beta-Laktam Antibiyotiklere Karşı Gelişen Direnç Mekanizmaları 22

2.6. Beta-Laktamazlar 23

2.6.1. Genişlemiş Spektrumlu Beta-Laktamazlar (GSBL) 25

2.7. Beta-Laktamaz Enzimi Üreten Bakteriler 27

2.7.1. Gram-Pozitif Bakteriler 27

2.7.1.1. *Staphylococcus aureus* Suşları 28
2.7.2. Gram-Negatif Bakteriler 29
2.7.2.1. *Escherichia coli* Suşları 30
2.7.2.2. *Klebsiella pneumoniae* Suşları 31
2.8. Beta-Laktamaz İnhibitörleri 31
2.9. Hidroksiapatit 34
2.10. Bor ve Bor Katkılı Hidroksiapatit 35
2.11. Kontrollü Salım Sistemleri 37
2.11.1. Partiküler Formdaki İlaç Salım Sistemleri 38
2.11.2. Partikül Üretim Yöntemleri 39
2.11.2.1. İkili-Emülsiyon Hazırlama-Çözücü Buharlaştırma Yöntemi 41
2.11.3. Partikül Üretiminde Kullanılan Biyomalzemeler 42
2.11.4. Kontrollü İlaç Salım Sistemlerinde Kullanılan Matematiksek Modeller ... 43
3. DENEYSEL ÇALIŞMALAR 45
3.1. Kullanılan Malzemeler 45
3.2. Biyomimetik Yöntemle HAp ve B-HAp Üretimi ve Karakterizasyonu 46
3.2.1. HAp ve B-HAp Üretimi 46
3.2.2. Hidroksiapatitin ve Bor Katkılı Hidroksiapatitin Karakterizasyonu 48
3.3. AMX Yüklü PLGA Nanopartiküllerin Hazırlanması 48
3.3.1. PLGA Nanopartiküllerin Sentezi 48
3.3.2. PLGA Nanopartiküllere AMX Yüklenmesi 49
3.4. PLGA Nanopartiküllerin Karakterizasyon Çalışmaları 50
3.4.1. AMX Yüklü PLGA Nanopartiküllerin Enkapsülasyon Veriminin Belirlenmesi 50
3.4.2. Partikül Boyutunun Belirlenmesi 51
3.4.3. Fourier Dönüşümlü Kızılötesi Spektroskopisi (FTIR) Analizi 51
3.4.4. Taramalı Elektron Mikroskobu (SEM) Analizi 51
3.5. Doku İskelelerinin Üretimi 52
3.6. Nanokompozit Doku İskelelerinin Karakterizasyonu 53
3.6.1.1. FTIR Analizi 53
3.6.1.2. SEM Analizi 53
3.7. Salım Sistemlerinin Hazırlanması ve Salım Kinetiklerinin İncelenmesi 53
3.7.1. PLGA Nanopartiküllerden AMX Salımı 53

3.7.2. Kitosan Nanokompozit Doku İskelelerinden AMX Salımı 54
3.8. Bakteriyel Çalışmalar 54
3.8.1. Çift Disk Sinerji Yöntemi 55
3.8.2. Agar Difüzyon Yöntemi 55
3.8.3. Gradiyent Testi 55
3.9. Hücre Kültür Çalışmaları 56
3.9.1. MC3T3-E1 Hücre Kültürü 56
3.9.2. Toksisite Çalışmaları 57
4. SONUÇLAR VE TARTIŞMA 59
4.1. Biyomimetik Yöntemle HAp ve B-HAp Üretimi ve Karakterizasyonu 59
4.2. PLGA Nanopartiküllerin Hazırlanması 61
4.3. PLGA Nanopartiküllerin Karakterizasyonu 63
4.3.1. AMX Yüklü PLGA Nanopartiküllerin Enkapsülasyon Veriminin Belirlenmesi 63
4.3.2. Boş ve AMX Yüklü PLGA Partiküllerin Boy ve Boy Dağılımı 65
4.3.3. FTIR Analizi 66
4.3.4. SEM Analizi 68
4.4. Doku İskelelerinin Üretimi 70
4.5. Nanokompozit Doku İskelelerinin Karakterizasyonu 70
4.5.1. FTIR Analizi 70
4.5.2. SEM Analizi 72
4.6. Salım Çalışmaları ve Salım Kinetiklerinin İncelenmesi 73
4.6.1. PLGA Nanopartiküllerden AMX Salımı 73
4.6.2. Kitosan Nanokompozit Doku İskelelerinden AMX Salımı 76
4.7. Bakteriyel Çalışmalar 79
4.8. Hücre Kültür Çalışmaları 92
4.8.1. MC3T3-E1 Hücre Kültürü 92
4.8.2. Toksisite Çalışmaları 92
5. GENEL SONUÇLAR 95
6. KAYNAKLAR 97
ÖZGEÇMİŞ 109

ÇİZELGELER DİZİNİ

Sayfa

Çizelge 2.1: AMX içeren ilaçlar ([47]'den değiştirilerek)……..22

Çizelge 2.2: Partikül üretim yöntemlerinin avantajları ve dezavantajları ([117]'den değiştirilerek)…… 40

Çizelge 3.1: 10XSBF çözeltsi için gerekli olan tuzlar ve miktarları ([88]'den değiştirilerek)…… 47

Çizelge 4.1: Nanopartikül üretimi için kullanılan parametreler…….. 62

Çizelge 4.2: AMX yüklü PLGA nanopartiküllerin enkapsülasyon verimleri……. 64

Çizelge 4.3: Çalışma kapsamında üretilen boş PLGA nanopartiküllerin ve AMX yüklü PLGA nanopartiküllerin (m_{PLGA}/m_{AMX}, w/w: 15) ortalama çapları ve çoklu dağılım endeksleri…….66

Çizelge 4.4: Salım kinetiği modelleri ve PLGA nanopartiküllerden AMX salımına ait veriler……..76

Çizelge 4.5: Salım kinetiği modelleri ve nanokompozit doku iskelelerinden AMX salımına ait veriler…….79

Çizelge 4.6: Antibiyogram diskleri, içerdikleri antimikrobiyal ajan ve miktarları…..80

Çizelge 4.7: Standart antibiyotiklere, antibiyotik/B-HAp ve antibiyotik/HAp kombinasyonlarına ait inhibisyon zon çapları……...85

Çizelge 4.8: B-HAp kullanımı ile standart antibiyotiklerin inhibisyon zon çaplarında meydana gelen değişiklikler…….87

Çizelge 4.9: Standart antibiyotiklere, antibiyotik/B-HAp ve HAp kombinasyonlarına ait MİK değerleri…….90

Çizelge 7.1: AMX yüklü PLGA nanopartiküllerin yüklendiği B-HAp/kitosan doku iskelelerinden AMX salımına ait değerler……108

ŞEKİLLER DİZİNİ

Sayfa

Şekil 2.1: Kemiğin hiyerarşik yapısı, a) makro yapısı, b) mikro yapısı, c) nano yapısı ([18]'den değiştirilerek)……...6

Şeki 2.2: Kemik doku mühendisliği yaklaşımı ([20]'den değiştirilerek)……7

Şekil 2.3: Antibiyotiklerin etki mekanizmaları ([37]'den değiştirilerek)……14

Şekil 2.4: Beta-laktam halkasının şematik gösterimi……16

Şekil 2.5: Beta-laktam antibiyotiklerinin farklı gruplarının kimyasal yapısı, a) Penisilin grubu beta-laktamlar, b) Sefalosporin grubu beta-laktamlar, c) Monobaktam grubu beta-laktamlar, d) Karbapenemler ([41]'den değiştirilerek)……18

Şekil 2.6: D-Ala-D-Ala peptit sekansının şematik gösterimi ([41]'den değiştirilerek)…… 19

Şekil 2.7: Penisilinin kimyasal yapısı…… 20

Şekil 2.8: Amoksisilin'in (AMX) kimyasal yapısı……... 21

Şekil 2.9: Beta-laktamazların AMX antibiyotiği üzerindeki etki mekanizması……..24

Şeki 2.10: Gram-pozitif bakterilerin hücre duvarının yapısı ([69]'dan değiştirilerek)…… 28

Şekil 2.11: Gram-negatif bakterilerin hücre duvarının yapısı ([69]'dan değiştirilerek)…… 30

Şekil 2.12: Çeşitli boronik asit beta-laktamaz inhibitörlerinin kimyasal yapısı ([84]'den değiştirilerek)……33

Şekil 2.13: Klavulanik asit, sulbaktam, tazobaktam, avibaktam ve relebaktam beta-laktamaz inhibitörlerinin kimyasal yapıları ([84]'den değiştirilerek)……...34

Şekil 2.14: Partikül üretim yöntemlerinin sınıflandırılması [117]……39

Şekil 2.15: İkili-emülsiyon hazırlama-çözücü buharlaştırma yöntemi ([119]'dan değiştirilerek)…… 41

Şekil 2.16: PGA, PLA ve PLGA'nın kimyasal yapıları……43

Şekil 3.1: a) HAp ve b) B-HAp üretiminin şematik gösterimi (*Tuzlar: KCl, NaCl, $CaCl_2.2H_2O$, $MgCl_2.6H_2O$, $NaH_2PO_4.H_2O$)……... 48

Şekil 3.2: PLGA nanopartiküllere AMX yüklenmesi işleminin şematik gösterimi… 50

Şekil 3.3: Nanokompozit doku iskelelerinin sentezi a) B-HAp/kitosan, b) AMX yüklü PLGA/B-HAp/kitosan……...53

Şekil 4.1: Çalışma kapsamında üretilen a) HAp b) B-HAp ve c) ICDD'den (Kırınım Verileri için Uluslararası Merkez) alınan saf HAp örneklerinin XRD spektrumları…60

Şekil 4.2: AMX'in HPLC kromatogramı (dalga boyu: 230 nm; mobil fazlar: asetonitril:%0.1 (v/v)'lik orto-fosforik asit karışımı (60:40 oranında))……63

Şekil 4.3: AMX'in kalibrasyon grafiği……..64

Şekil 4.4: DLS analiz sonuçları a) boş PLGA nanopartiküllerin boy ve boy dağılımına ait grafik, b) AMX yüklü PLGA nanopartiküllerin (m_{PLGA}/m_{AMX}, w/w: 15) boy ve boy dağılımı……...65

Şekil 4.5: DMAB stabilizatörüne, boş PLGA ve AMX yüklü PLGA nanopartiküllere(m_{PLGA}/m_{AMX}, w/w: 15) ve ait FTIR spektrumları……..67

Şekil 4.6: Boş PLGA nanopartiküllere ve AMX yüklü PLGA nanopartiküllere (m_{PLGA}/m_{AMX}, w/w: 15) ait farklı büyütmelerde SEM görüntüleri……69

Şekil 4.7: AMX yüklü PLGA nanopartiküllerine (m_{PLGA}/m_{AMX}, w/w: 15), B-HAp nanopartiküllerine, AMX yüklü PLGA nanopartikül/B-HAp/kitosan doku iskelelerine ve B-HAp/kitosan doku iskelelerine ait FTIR spektrumları……..71

Şekil 4.8: Nanokompozit doku iskelelerinin farklı büyütmelerde SEM görüntüleri...72

Şekil 4.9: PLGA nanopartiküllerden (m_{PLGA}/m_{AMX}, w/w: 15) kümülatif (%) AMX salımının a) 85 gün ve b) 24 saat sonundaki sonuçları……74

Şekil 4.10: PLGA nanopartiküllerden (m_{PLGA}/m_{AMX}, w/w: 15) mg partikül başına salınan kümülatif AMX miktarı……75

Şekil 4.11: Nanokompozit doku iskelelerinden kümülatif (%) AMX salımının a) 85 gün ve b) 24 saat sonundaki sonuçları……..77

Şekil 4.12: Kitosan nanokompozit doku iskelelerinden mg partikül başına salınan kümülatif AMX miktarı……...78

Şekil 4.13: *K. pneumoniae* ATCC®BAA-1144*, K. pneumoniae* ATCC®700603 *ve E. coli* ATCC®25922 bakteri suşları için antibiyotik/B-HAp kombinasyonlarına ait görüntüler…….. 81

Şekil 4.14*: K. pneumoniae* ATCC®BAA-1144 ve *K. pneumoniae* ATCC®700603 bakteri suşları için antibiyotik/B-HAp ve HAp kombinasyonlarına ait görüntüler… 82

Şekil 4.15: Beta-laktamaz enziminin a) beta-laktam antibiyotiklerine (örneğin; sefalotin) ve b) borik aside karşı etki mekanizması [144]…….. 83

Şekil 4.16*: K. pneumoniae* ATCC®BAA-1144, *K. pneumoniae* ATCC®700603 v*e E. coli* ATCC®25922 bakteri suşları için a) CAZ/BA ve CAZ, b) CZC ve CFC antibiyotik/B-HAp ve HAp kombinasyonlarına ait görüntüler…….88

Şekil 4.17: *K. pneumoniae* ATCC®BAA-1144*, K. pneumoniae* ATCC®700603 ve *E. coli* ATCC®25922 bakteri suşları için a) CTX/BA ve CTS, b) CTX ve CTT antibiyotik/B-HAp ve HAp kombinasyonlarına ait görüntüler…….89

Şekil 4.18: Standart antibiyotiklere, antibiyotik/B-HAp ve HAp kombinasyonlarına ait görüntüler……...91

Şekil 4.19: MC3T3-E1 üreme grafiği [147]……92

Şekil 4.20: Nanokompozit doku iskeleleri üzerinde kültüre edilen MC3T3-E1 hücrelerine ait MTT sonuçları. (İstatistiksel olarak anlamlı farklar, B-HAp/Kitosan doku iskelesi kontrol grubu iken: n=3, * $p<0.05$, ** $p<0.01$, *** $p<0.001$; Her bir iskele grubunun 1'inci gün örnekleri kontrol grubu iken: n=3, • $p<0.05$, • • $p<0.01$, • • • $p<0.001$)……....93

SİMGELER VE KISALTMALAR

Simgeler

Ag^{1+}: Gümüş

-COOH: Karboksil Grubu

CO_3^{2-}: Karbonat İyonu

CO_2: Karbondioksit

Cu^{1+}: Bakır

Da: Dalton

dk: Dakika

HCl: Hidroklorik asit

K_0: Sırıncı Derece Salım Kinetiği Sabiti

K_1: Birinci Derece Salım Kinetiği Sabiti

K_H: Higuchi Salım Kinetiği Sabiti

K_{HC}: Hixson-Crowel Salım Kinetiği Sabiti

$-NH_2$: Amino Grubu

n: Nano

Mw: Moleküler Ağırlık

µ: Mikro

OH^-: Hidroksil İyonları

O: Organik Faz

PO_4^{3-}: Fosfat İyonları

sa: Saat

t_d: İkilenme Süresi

v/v: Hacim/Hacim Oranı

w/v: Kütle/Hacim Oranı

w/w: Kütle/Kütle Oranı

W1: Birinci Sulu Faz

W2: İkinci Sulu Faz

Zn^{2+}: Çinko

Kısaltmalar

ALP: Alkalen Fosfataz

AMX: Amoksisilin

AMC: Amoksisilin/Klavulanik Asit

AM: Ampisilin

6-APA: 6-Aminopenisilanik Asit

BL: Beta-Laktamazlar

B-HAp: Bor Katkılı Nano-Hidroksiapatit

CAZ: Seftazidim

CAZ/BA: Seftazidim/Boronik Asit

CTC: Sefotaksim/Klavulanik Asit

CTT: Sefotetan

CTS: Sefotaksim/Sulbaktam

CTX: Sefotaksim

CTX/BA: Sefotaksim/Boronik Asit

CZC: Seftazidim/Klavulanik Asit

DCM: Diklorometan

DSS: Dioktil Sodyum Sülfosuksinat

DLS: Dinamik Işık Saçılımı

DNA: Deoksiribonükleik Asit

DMAB: Didodesil Dimetil Amonyum Bromür

EDTA: Etilendiamin Tetraasetik Asit

EGF: Epidermal Büyüme Faktörü

FBS: Fetal Sığır Serumu

FDA: Food and Drug Administration

FGF: Fibroblast Büyüme Faktörü

FTIR: Fourier Dönüşümlü Kızılötesi Spektroskopisi

GA: Glikolik asit

GSBL: Genişlemiş Spektrumlu Beta-Laktamazlar

HPLC: Yüksek Performanslı Sıvı Kromatografisi

ICDD: Kırınım Verileri için Uluslararası Merkez

IGF: İnsüLin Benzeri Büyüme Faktörü

LA: Laktik Asit

LPS: Lipopolisakkatrit

MA: Molekül Ağırlığı

MBK: Minimum Bakterisidal Konsantrasyon

MC3T3-E1: Fare Kemik Öncül Hücreleri

MDR: Çoklu-İlaç Direnci

MHB: Mueller-Hinton Besiyeri

MHA: Mueller-Hinton Agar

MİK: Minimum İnhibitör Konsantrasyonu

α-MEM: Minimum Essential Medium-Alpha Modification

mRNA: Haberci RNA

MTT: 3-[4,5-Dimetilazol-2-İl]-Difenilterazolyum Bromür

HAp: Hidroksiapatit

PBP: Protein Bağlama Proteinleri

PBS: Fosfat Tampon Çözeltisi

PCL: Poli(kaprolakton)

PDGF: Trombosit Büyüme Faktörü

PDI: Çoklu Dağılım Endeksi

PGA: Poli(glikolik asit)

PLA: Poli(laktik asit)

PLGA: Poli(Laktik-ko-Glikolik) Asit

RNA: Ribonükleik Asit

SBF: Yapay Vücut Sıvısı

SDS: Sodyum Dodesil Sülfat

SEM: Taramalı Elektron Mikroskobu

TCPS: Polistiren Hücre Kültür Kapları

TGF-β: Dönüştürücü Büyüme Faktörü-Beta

VEGF: Vasküler Endotel Büyüme Faktörü

XRD: X-ışını Kırınımı

WHO: Dünya Sağlık Örgütü

TCX: Sefotaksim/Tazobaktam

TCA: Seftazidim/Tazobaktam

1. GİRİŞ

Kemik dokusu damarlı, karmaşık, mineralize ve organize bir bağ dokusudur. Bu doku genel olarak kolajen temelli yapılardan, hidroksiapatit kristallerinden ve osteoblast ve osteoklast hücrelerinden oluşmaktadır. Kemik dokusu sürekli olarak yeniden şekillenebilen bir dokudur, bu süreçte osteoblastlar yapıcı ve osteoklastlar yıkıcı rol almaktadır. Kemik dokusu genel olarak kendini tamir edebilmektedir; fakat büyük ve parçalı hasarlarda ve kırıklarda kemik dokusunun kendini tamir edebilme yetisi yetersiz kalmaktadır. Bu tür hasarlarda doku transplantasyonu güncel tedavi yöntemidir. Ancak kaynak yetersizliği ve doku uyuşmazlığı gibi dezavantajlardan dolayı son yıllarda "kemik doku mühendisliği yaklaşımı" ön plana çıkmaktadır. Bu yaklaşım ile doku iskeleleri, kemiğe özgü hücreler ve büyüme faktörleri birlikte veya ayrı ayrı kullanılarak kemik doku oluşumu amaçlanmaktadır [1–3].

Antibiyotikler, bakteri ve fungus gibi mikroorganizmalar tarafından doğal veya sentetik olarak üretilen, düşük konsantrasyonlarda bile mikroorganizmaların gelişmesini ve üremesini durduran veya onları öldüren maddelerdir [4]. Bütün bakterilerde çoğalma evresi 3 dönemden oluşmaktadır, bunlar; **i)** hazırlık evresi, **ii)** logaritmik evre ve **iii)** durgunluk evresidir. Antibiyotikler bakterilerin hızlı gelişme ve yavaş gelişme dönemlerine etki ederler. Bu etkileşim iki şekilde olur:

- bakterilerin öldürülmesi (**bakterisid** veya **bakterisida**l **etki**),
- bakterilerin gelişiminin ve üremesinin engellenmesi (**bakteriyostatik etki**).

Örneğin penisilinler, aminoglikozidler ve sefalosporinler gibi antibiyotikler bakterilerin mukopeptid sentezini inhibe ederek bakterileri öldürmekte iken (bakterisid etki), tetrasiklinler ve sülfonamidler gibi antibiyotikler ise bakterilerin üremesini ve gelişimini durdurmaktadırlar (bakteriostatik etki) [5–7].

Antibiyotikler bakteri hücresi üzerinde farklı mekanizmalarla etki göstermektedirler. Bunlar;

- hücre duvarının sentezini engellemek,
- sitoplazmik zarın geçirgenliğini değiştirmek,
- nükleik asit sentezini engellemek,
- protein sentezini engellemek ve
- antagonistik etki

şeklinde sıralanabilir.

Klinikte kullanımı yaygın olan beta-laktam antibiyotiklerinden olan penisilinler hücre duvarının sentezini engelleyerek etki gösteren antibiyotiklerdir [7].

Direnç, bir bakterinin, antimikrobiyal bir ajanın gelişmeyi ve üremeyi engelleyici veya öldürücü etkisine karşı koyabilme yetisidir. Bakterinin direnç gelişimi genel olarak gereksiz ve yanlış antibiyotik kullanımına bağlanmaktadır; fakat, 1940'lı yıllarda antibiyotiklerin kullanılmadığı bazı yörelerde tetrasiklin ve streptomisine dirençli bakterilerin varlığı tespit edilmiştir. Dolayısıyla, bakterilerin antibiyotik direncinin yalnızca yaygın antibiyotik kullanımının bir parçası olmadığı, bakterilerin olumsuz koşullarda yaşamlarını sürdürebilmek için kullandıkları savunma mekanizmalarının da bir parçası olduğu belirtilmektedir. Günümüzde hızla yeni antibiyotikler geliştirilmektedir. Ancak antibiyotiklerin sıklıkla kullanılması sonucunda yıllar içinde "çoklu dirençli mikroorganizmalar" ortaya çıkmıştır. Bunun sonucu olarak çoğul dirençli mikroorganizmalardan kaynaklanan enfeksiyonların sayısında artış gözlenmektedir. Bu artış sonucunda oluşan sorunların boyutları giderek büyümektedir. Avrupa'da yılda yaklaşık 25 000 kişinin antibiyotiklere direnç geliştirmiş bakteri kaynaklı enfeksiyonlardan dolayı hayatlarını kaybettikleri bildirilmiştir. Ayrıca, 2013 yılında ABD Hastalık Kontrol ve Önleme Merkezi (US Centers for Disease Control and Prevention) tarafından yayınlanan raporda, her yıl en az 2 milyon civarı kişinin antibiyotiklere dirençli bakteriler tarafından enfekte olduğu ve bu insanların da yaklaşık 23 000'inin bu enfeksiyonlar nedeniyle hayatını kaybettiği belirtilmiştir [8, 9].

Molekülünün antibakteriyel etkisinden sorumlu çekirdek kısmında beta-laktam halkası içeren antibiyotiklere "beta-laktam antibiyotikleri" veya kısaca "beta-laktamlar" adı verilir. Beta-laktam halkası biri azot, üçü karbon atomu olan 4 üyeli doymuş bir halkadır. Beta-laktamlar halkanın yapısına göre penisilinler (penamlar), sefalosporinler (sefemler), karbapenemler ve monobaktamlar olarak sınıflandırılırlar. Günümüzde antibiyotiklere karşı direncin kırılmasında beta-laktam antibiyotiklerinin klavulanik asit, sulbaktam ve tazobaktam gibi beta-laktamaz inhibitörleri ile birlikte kullanımı gündeme gelmektedir. Fakat bu inhibitörler beta-laktamaz enzimlerinin tamamına karşı etkin değildirler. Bu yüzden yeni sentetik beta-laktamaz inhibitörleri arayışı gündeme gelmiştir [10]. Bunun yanı sıra, lokal terapi yaklaşımı ile kemik enfeksiyonlarının önlenebilmesi için antibiyotiklerin kontrollü ilaç sistemleri ile birlikte kullanımı da gündemdedir [11, 12].

Yukarıda bahsedilen sorunlara çözüm getirilmesi amacı ile sunulan tez çalışmasının hedefi, son zamanlarda doku iskelelerinde kullanılmaya başlanan bor katkılı hidroksiapatit (B-HAp)'in geniş spektrumlu beta-laktam antibiyotikleri olarak bilinen ve penisilinler grubunun üyesi olan amoksisilin (AMX) ile birlikte kitosan doku iskelelerinde kullanılması ve doku iskelelerinin *in-vitro* koşullarda antibiyotik salım davranışlarının incelenmesidir. Sunulan tez ile AMX antibiyotik yüklü B-HAp/kitosan nanokompozit doku iskelelerinin hem kemik enfeksiyonunu önleyici hem de kemik hasarı tedavi sürecini hızlandırıcı sistemler olarak öngörülen potansiyeli kemik doku mühendisliği açısından değerlendirilmiştir.

Tez kapsamında ilk olarak biyomimetik yöntemle HAp ve B-HAp sentezi yapılmıştır. Ardından kitosan bazlı nanokompozit doku iskelelerine bir beta laktam antibiyotiği olan AMX yüklemesi gerçekleştirilmiştir. Yapılan hücre kültür çalışmaları ve bakteriyel deneylerle hücre proliferasyonu ve beta-laktam antibiyotikleri ile B-HAp arasındaki sinerjik etki incelenmiştir.

2. GENEL BİLGİLER

Tezin bu bölümünde çalışma kapsamında sıklıkla bahsedilen ve çalışmanın temelini oluşturan konular ayrıntılı olarak sunulmuştur. İlk olarak doku mühendisliği ve kemik doku mühendisliği alanlarındaki literatür bilgileri açıklanmıştır ve kemik doku mühendisliğinde kullanılan biyosinyaller, doku iskeleleri ve hücre hatları ile ilgili bilgilere yer verilmiştir. Ardından antibiyotikler hakkında literatür bilgisi verilmiştir ve sonrasında beta-laktam antibiyotikleri ve tez kapsamında kullanılan "**Amoksisilin (AMX)**" antibiyotiği ile ilgili bilgiler ayrıntılı olarak sunulmuştur. Beta-laktamazlar ve beta-laktamaz inhibitörleri hakkında ayrıntılı bilgi verildikten sonra bor elementi, hidroksiapatit ve bor katkılı nanohidroksiapatit ile ilgili bilgiler sunulmuştur. Son olarak ise partikül üretim yöntemleri, özellikle tez kapsamında kullanılan **ikili-emülsiyon hazırlama-çözücü buharlaştırma yöntemi** ile ilgili bilgiler sunulmuştur.

2.1. Doku Mühendisliği

Doku mühendisliği laboratuvar koşullarında dokuların onarımını ve/veya oluşumunu amaçlayan oldukça yeni ve disiplinler arası bir alandır. Bu amaca ulaşmak için dokuya özgü hücreler, biyosinyal moleküller ve iki boyutlu/üç boyutlu doku iskeleleri tek başlarına veya birlikte kullanılmaktadırlar. Doku iskeleleri yapay bir hücre dışı matriks görevi görerek ekstraselülar matriksi (ECM) taklit edecek biçimde tasarlanmaktadır. 1993 yılında *Langer* ve *Vacanti* yeni dokuların ve organların oluşturulması amacıyla doku iskelesi olmadan veya doku iskelesi ile hücre transplantasyonu ile ilgili "Doku Mühendisliği" başlığı altında çalışmalar yapmışlar ve bu çalışmalar ışığında bu yeni alanın temellerini atmışlardır [13, 14]. Doku mühendisliğinde çeşitli yaklaşımlar bulunmaktadır. Fakat bunlar arasında doku iskeleleri ve hücrelerin birlikte kullanılması ile doku ve organ onarımını ve/veya oluşumunu hedefleyen yaklaşım çalışmalarda sıklıkla tercih edilmektedir. Günümüzde doku mühendisliğinin deri, kıkırdak ve kemik dokusu gibi farklı dokuların geliştirilmesindeki uygulamaları mevcuttur. Son yıllarda bu alanlarda kullanılması hedeflenen birçok doku mühendisliği ürünü de ticarileştirilmiş ve tıbbi ürün pazarında yerlerini almışlardır.

2.2. Kemik Doku Mühendisliği

Son yıllarda kemik enfeksiyonları, kemik kırıkları, osteoporoz ve kemik tümörlerine bağlı kemik kayıplarından ötürü, kemik onarımına ve/veya yenilenmesine giderek

artan bir ihtiyaç vardır. Bu sebeple kemik doku mühendisliği alanında gün geçtikçe artan sayıda araştırmalar yapılmaktadır. Kemik doku mühendisliği laboratuvar koşullarında üç boyutlu, canlı ve fonksiyonel kemik oluşumunu amaçlamaktadır. Bu kapsamda üç boyutlu taşıyıcı sistemlerde mineralize dokunun yeterli miktarlarda elde edilebilmesi ve kemiğin rejenerasyonunun ve doğal yapısının iyi bir şekilde taklit edilebilmesi kritik noktalardır [15, 16].

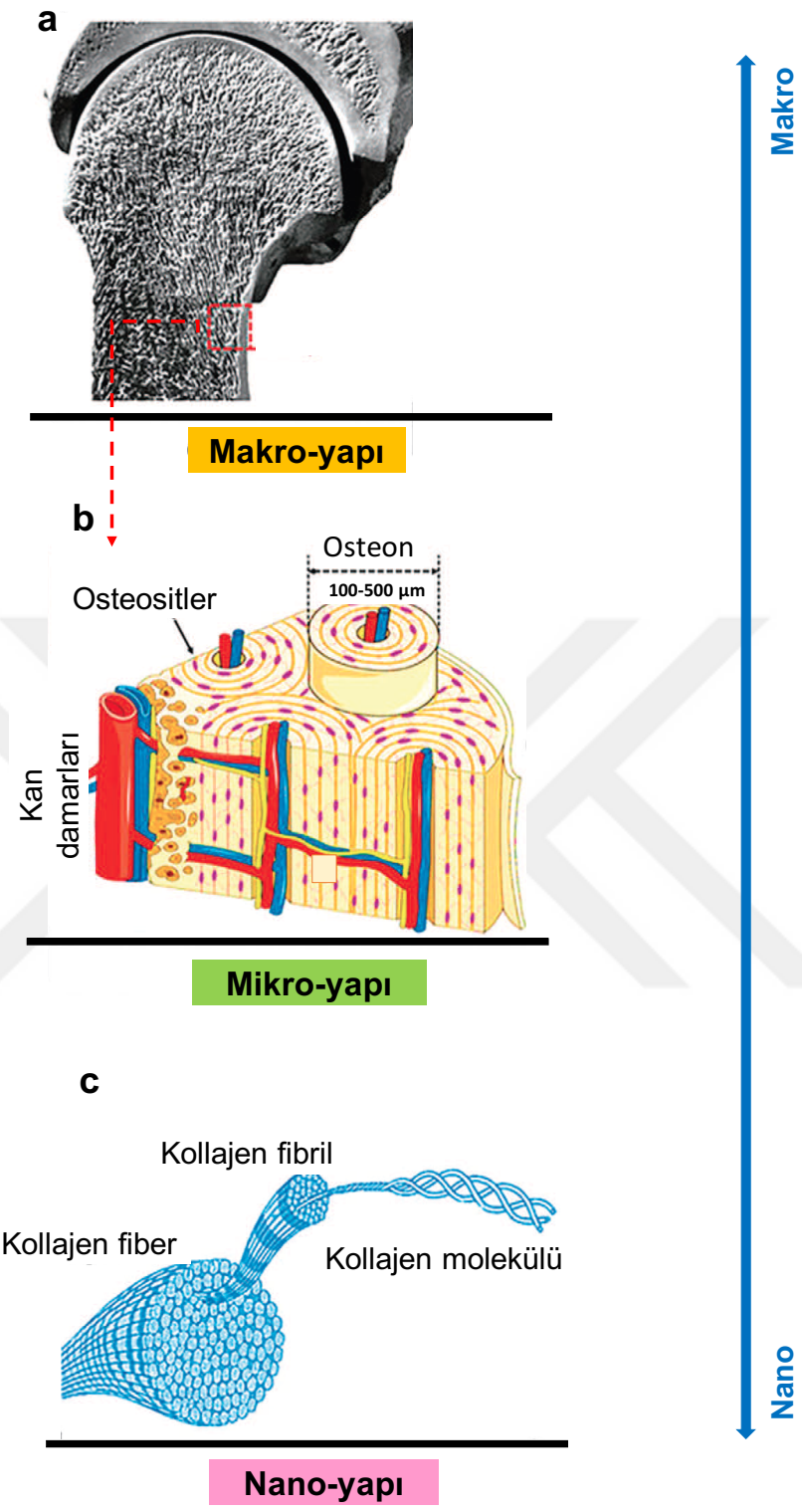
2.2.1. Kemiğin Yapısı ve Özellikleri

Kemik, kendini yenileyebilme özelliğine sahip, karmaşık, damarlı ve mineralize bir dokudur. Kemik dokusu iki farklı yapıdan oluşmaktadır, bunlar; **kortika**l ve **trabeküler kemik**'tir. Kortikal kemik sıkı ve sert bir yapıya sahipken trabeküler kemik esnek bir yapıya sahiptir. Kemiğin yapısında çoğunluğunu hidroksiapatitin oluşturduğu çeşitli inorganik bileşenler ve organik bileşenler bulunmaktadır.

Kemik dokusu, yapısında yer alan osteoblast ve osteoklast hücreleri sayesinde dinamik bir özelliğe sahiptir. Bu özelliğin sağlanmasında osteoblast hücreleri kemik yapımından sorumlu iken osteoklast hücreleri kemik yıkımından sorumludur. Ayrıca, osteoblast ve osteoklast hücreleri arasında var olan hassas denge sayesinde kemik dokunun yapısal bütünlüğü ve devamlılığı sağlanmaktadır [17]. Bu hücrelerin dışında kemiğin yapısında osteosit hücreleri de bulunmaktadır. Osteositler kemiğin esas hücreleridir ve "olgun kemik hücreleri" olarak da adlandırılmaktadır. Kemiğin hiyerarşik yapısı Şekil 2.1'de sunulmaktadır.

Kemik dokusu vücudumuza yapısal olarak destek sağlamakta ve iç organlarımızı korumaktadır. Bu temel görevlerinin yanında kalsiyum ve fosfor depolamakta ve böylelikle homeostazı sağlamaktadır. Bütün bu görevlerinden dolayı kemik dokusu hayati önem taşımaktadır ve kişinin yaşam kalitesinin temelini oluşturmaktadır.

Kemiğin rejenerasyon kapasitesi oldukça yüksektir, fakat; kemik tümörleri, enfeksiyonları ve kırılmaları sonucunda meydana gelebilecek büyük boyutlardaki kemik hasarları zamanla kendiliğinden iyileşememektedir. Bu gibi durumlarda kemik doku mühendisliği yaklaşımının da kullanıldığı cerrahi müdahalelere gereksinim vardır. Kemiğin rejenerasyon süreci aşamasında sentezlenen TGF-β (dönüştürücü büyüme faktörü-beta) ailesi, PDGF (trombosit büyüme faktörü), VEGF (vasküler endotel büyüme faktörü), EGF (epidermal büyüme faktörü), vb. büyüme faktörleri bu sürecin çeşitli aşamalarını kontrol ederek süreci düzenlemektedirler [16].



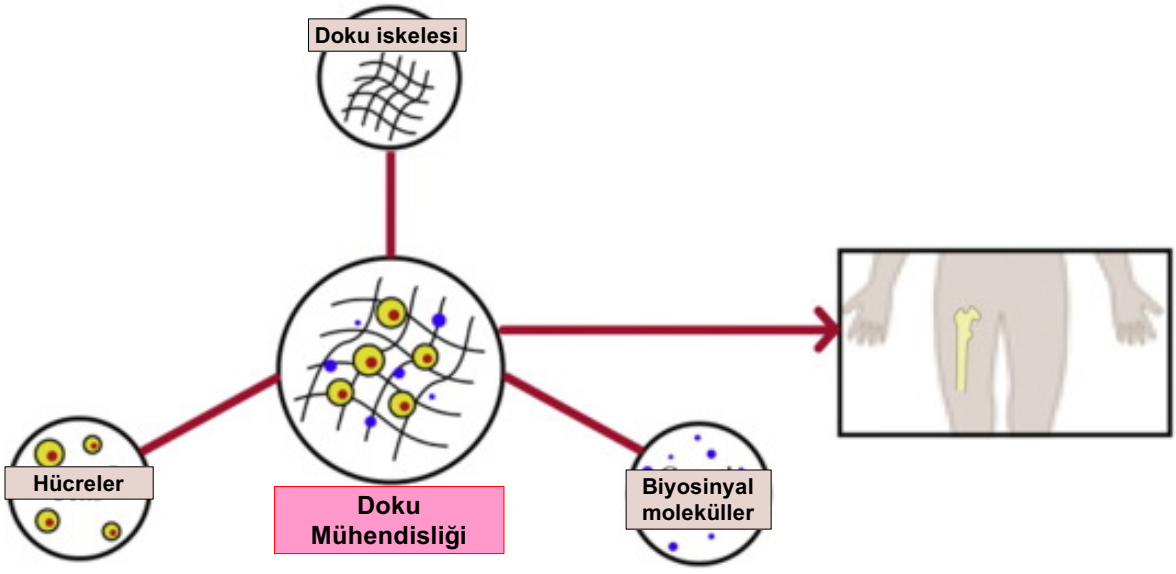
Şekil 2.1: Kemiğin hiyerarşik yapısı, a) makro yapısı, b) mikro yapısı, c) nano yapısı ([18]'den değiştirilerek).

2.2.2. Kemik Doku Mühendisliği Yaklaşımı

Günümüzde cerrahi uygulamalar gerektiren kemik hasarlarının tedavisinde kemik yamaları, metaller ve seramikler kullanılmaktadır. Kemik yamaları olarak kişinin

sağlıklı kemiğinden alınan otogreftler, kadavralardan alınan allogreftler ve hayvanlardan alınan zenogreftler kullanılmaktadır. Bunlar arasında otogreftler klinikte sıklıkla tercih edilmektedirler. Çünkü, otogreftler klinik uygulamalarda implante edildiği kemik ile bütünleşmesi ve hastanın bağışıklık sisteminde herhangi bir tepkiye neden olmaması açısından daha avantajlıdır. Fakat, hastanın yeni bir operasyon geçirmesine ve yeni bir kemik hasarına neden olması gibi nedenlerden dolayı kullanımı kısıtlıdır [19].

Yukarıda bahsedilen yöntemlerin çeşitli dezavantajlarının olmasından dolayı kemik hasarlarının tedavisinde son yıllarda yapılan araştırmalar **Kemik Doku Mühendisliği Yaklaşımı'**na yönelmiştir. Yaklaşımın temel hedefi, hücrelerin, biyosinyal moleküllerin ve doku iskelelerinin tek başlarına veya birlikte kullanılmaları ile kemiğin onarımını ve/veya yenilenmesini sağlamak için yeni kemik yamaları oluşturmaktır. Bu süreçte biyosinyal molekülleri doku iskelesi içerisindeki hücreleri yönlendirerek kemik dokuya farklılaşmayı sağlarken doku iskeleleri kemiğin çevresini taklit ederek yapısal destek sağlamaktadır. Ayrıntılı olarak bahsedilen kemik doku mühendisliği yaklaşımı Şekil 2.2'de şematik olarak sunulmaktadır.



Şeki 2.2: Kemik doku mühendisliği yaklaşımı ([20]'den değiştirilerek).

2.2.3. Kemik Doku Mühendisliğinde Kullanılan Biyomalzemeler ve Doku İskeleleri

Doku iskeleleri hücreler için yapay hücre dışı matris olarak tasarlanan yapılardır. Kemik doku mühendisliği uygulamalarında kullanılacak olan doku iskelelerinin kemiğin doğal çevresini taklit edebilmesi, atık maddelerin difüzyonunu

sağlayabilmesi için üç boyutlu ve gözenekli yapıda olması, yüksek mekanik dayanıma sahip olması ve implante edildiği dokuyla bütünleşebilmesi gerekmektedir. Bunların yanısıra, iskelenin hücrelerin osteoblastik hücrelere farklılaşmasını indükleyebilmesi için osteoindüktif özellikte olması ve kemiğin üç boyutlu yapısını oluşturabilmesi için osteokondüktif özellikte olması gerekmektedir. [21, 22].

İskele üretiminde kullanılacak malzemelerin biyouyumlu, biyo-inert olması ve iskelenin vücut içerisinde toksik etkiye ve istenmeyen doku tepkilerine neden olmaması gerekmektedir. Ayrıca iskele yüzeyinin hücrelerin yapışmasını ve çoğalmasını destekleyecek özellikte olması da gerekmektedir. Bunların haricinde, hücreler hücre dışı matrislerini kendileri oluşturabilecekleri yetişkinliğe ulaştıklarında yapay hücre dışı matris olarak görev alan bu iskelelere gereksinim kalmamaktadır. Bu sebeple iskelelerin üretildiği malzemelerin biyobozunur olması ve iskelenin vücut içerisinde bozunması sonrasında oluşan ürünlerin toksik olmaması gerekmektedir [21]. İlgili literatürde çeşitli biyobozunur malzemeler ile karaciğer, mesane, sinir, deri, kemik ve kıkırdak gibi farklı doku mühendisliği alanlarında kullanılması planlanan gözenekli, üç boyutlu ve yeterli mekanik dayanıma sahip doku iskelelerinin üretildiği çalışmalar bulunmaktadır [23].

Kemik doku mühendisliği uygulamalarında kullanılacak olan doku iskeleleri seramiklerden, metallerden, polimerlerden ve ayrıca bunların bir arada kullanılması ile elde edilen kompozit malzemelerden üretilmektedir. Metallerden üretilen iskeleler biyobozunur olmamaları ve vücut içinde istenmeyen tepkilere neden olabilmeleri gibi dezavantajlarından dolayı çalışmalarda pek tercih edilmemektedir. Seramiklerden üretilen iskeleler ise kırılganlıklarına bağlı düşük mekanik dayanıma sahip olmalarından dolayı çalışmalarda pek tercih edilmemektedirler. Kemik doku mühendisliği çalışmalarında, biyouyumlu olmaları, bileşimlerinin ve yapılarının ayarlanabilir olması gibi avantajlarından dolayı genellikle biyobozunur polimerler kullanılmaktadır [19, 24]. Biyobozunur polimerler doğal polimerler ve sentetik polimerler olmak üzere iki gruba ayrılmaktadır. Doğal polimerlere kitosan, nişasta, aljinat, ipek örnek olarak verilebilirken, sentetik polimerlere poli(laktik asit) (PLA), poli(glikolik asit) (PGA), bunların kopolimerleri ve poli(kaprolakton) (PCL) örnek olarak verilebilmektedir. Katyonik ve doğrusal bir yapıya sahip olan kitosan doğal

polimeri, böceklerin ve kabuklu deniz canlılarının kabuklarında yer alan kitinin deasetilasyonu ile elde edilen bir polisakkarittir.

Kitosan kemiğin hücre dışı matrisinin yapısında yer alan glikozaminoglikanlara benzemektedir. Bu sebeple *in-vitro* ortamlardaki kemik doku mühendisliği uygulamalarında etkin bir şekilde kullanılmaktadır [25]. Literatürde yapılan çalışmalarda kitosan doku iskelelerinin hücrelerin yapışmasını ve çoğalmasını desteklediği belirtilmektedir.

Kemik gibi sert dokularda matris mineralizasyonunun oluşturulması ve mekanik kuvvetin iletiminin sağlanması için mekanik özellikler çok önemlidir. Kitosan doku iskelelerinin kemik doku mühendisliğinde daha etkin bir şekilde kullanımı için mekanik özelliklerinin geliştirilmesine ihtiyaç duyulmuştur. Bu kapsamda mevcut kitosan iskelelere göre daha üstün özellikleri olan kitosan/biyoseramik kompozit doku iskeleleri geliştirilmiştir. Doğal kemik yapısının büyük çoğunluğunun hidroksiapatitten oluşmasından dolayı son yıllarda yapılan çalışmalarda kitosan/hidroksiapatit kompozit doku iskeleleri önem kazanmıştır [26]. Bu çalışmalara ek olarak, bor elementinin hücrelerin erken osteoblastik farklılaşmasını ve mineralizasyonu kuvvetle desteklemesinden dolayı günümüz çalışmalarında kitosan/bor katkılı hidroksiapatit kompozit doku iskeleleri de geliştirilmektedir [27].

2.2.4. Kemik Doku Mühendisliğinde Kullanılan Hücreler ve Biyosinyal Moleküller

Kemik doku mühendisliği uygulamalarında otolog hücreler, allojenik hücreler, zenojenik hücreler, kök hücreler ve hücre hatları olmak üzere çok çeşitli hücre kaynakları kullanılmaktadır. Bu kaynakların hepsinin bazı avantajları ve dezavantajları bulunmaktadır. Otolog hücreler hastanın kendisinden alınıp izole edildiği için vücutta immün cevaba neden olmamaktadır; fakat, izolasyon sırasında sınırlı sayıda hücre elde edilebilmektedir. Allojenik hücreler farklı bireylerden elde edilirken zenojenik hücreler farklı türdeki canlılardan elde edilmektedir. Allojenik ve zenojenik hücreler vücut içerisinde immün cevap oluşturabilmektedir, bu sebeple çalışmalarda pek tercih edilmemektedirler. Bir diğer hücre kaynağı olan hücre hatları insanlardan veya hayvanlardan izole edilip uygun ortamlarda çoğaltılan ve istenilen fenotipe ulaşılana kadar pasajlanan hücrelerdir. Günümüzde hücre hatlarının temin edildiği birçok hücre bankası bulunmaktadır. Hücre hatları, teminlerinin kolay olmasından dolayı tercih edilmektedir. Kemik doku mühendisliği uygulamalarında

olgunlaşmamış öncül kemik hücreleri olan kök hücreler, MC3T3-E1 (fare kemik öncül hücreleri), MG63 (insan kemik kanseri hücreleri) ve SAOS-2 (insan osteosarkom hücreleri) gibi osteoblast hücrelere benzerlikleriyle dikkat çeken hücre hatlarının kullanıldığı çalışmalara sıklıkla rastlanılmaktadır [28].

Kemiğin onarımında ve/veya yenilenmesinde önemli görevleri olan biyosinyaller hücrelerin bölünerek çoğalması ve farklılaşması gibi hücresel fonksiyonları uyarıp düzenleyebilen yüksek molekül ağırlıklı polipeptid yapılı moleküllerdir. Biyosinyal moleküller, büyüme faktörleri ve yapışma faktörleri olarak 2 grupta incelenmektedir. Hücre yapışma faktörleri hücrelerin yüzeyine adsorplanarak hücrelerin ürettiği proteinlerle etkileşmektedirler. Böylece hücrelerin yüzeye yapışmasını yönlendirmektedir. Hücre büyüme faktörleri ise endokrin bezlerden, bağışıklık sistemi tarafından ve vücuttaki çoğu hücre tarafından salgılanan büyüme faktörlerini kapsayan ve kemik oluşumunu düzenleyen proteinlerdir. Hücre yapışma faktörlerine örnek olarak immünoglobulinler, integrin ve selektinler; hücre büyüme faktörlerine örnek olarak ise sitokinler, insülin benzeri büyüme faktörü (IGF), transforme edici büyüme faktörü (TGF-β) ve fibroblast büyüme faktörü (FGF) verilebilmektedir [29]. Yukarıda bahsedilen yapışma faktörleri ve büyüme faktörlerinin yanısıra farklı birçok element ve bunların bileşikleri de kemik doku mühendisliği uygulamalarında biyosinyal molekül olarak kullanılmaktadır. Son zamanlarda yapılan ve bor elementinin hücrelerin osteojenik farklılaşmasını desteklediğinin belirtildiği çalışmalar ile borun biyosinyal olarak kemik doku mühendisliğinde kullanımı gündeme gelmiştir [30].

2.3. Antibiyotikler

Antibiyotikler, fungus, bakteri vb. mikroorganizmalar tarafından doğal olarak veya sentetik olarak üretilen ve düşük miktarlarda bile bakterilerin yaşam süreçlerini olumsuz şekilde etkileyen maddelerdir. Farklı bakteri derişimleri için farklı miktarda antibiyotikler kullanılmaktadır. Gerekli antibiyotik miktarını belirleyebilmek için MİK (minimum inhibitör konsantrasyonu) ve MBK (minimum bakterisidal konsantrasyon) gibi testler yapılmaktadır.

Antibiyotik kavramının temelleri 19. yüzyıla dayanmaktadır. **Pasteur** 19. yüzyılın ortalarında yaptığı çalışmalarda çeşitli mikroorganizmaların sentezleyip ortama saldıkları maddelerle diğer hastalık yapıcı mikroorganizmaların yaşam süreçlerinin olumsuz etkilendiğini görmüştür. Bunun sonucunda hastalık yapıcı

mikroorganizmaların büyümesinin ve çoğalmasının durdurulmasının ifade edildiği "antibiyoz" terimine değinilmiştir [4]. Daha sonra, 1928 yılında **Alexander Fleming** *Stafilokok* bakterisini kültür kaplarında çoğaltırken kapları yıkamadan uzun süren bir tatile çıkmıştır, tatilden döndüğünde kültür kaplarının bazı yerlerinde *Penicillium notatum* fungusunun ürediğini ve bu küfün etrafında da herhangi bir bakteri üremesinin olmadığını görmüştür. Fungusdaki bir maddenin buna neden olduğunu düşünerek fungusdan o maddeyi ayırmış ve **"**penisilin" olarak adlandırmıştır. Böylece dünyanın ilk antibiyotiği olan penisilin bulunmuştur [31]. Ardından 1940'lı yıllarda **Ernst Chain** ve **Howard Florey** *Penicillium notatum* kültüründen izole ettikleri ve penisilinden daha güçlü olan "penisilin tozu"nu bulmuştur. Penisilinin bulunmasının ardından özellikle 1930-60 yılları arasında hızla yeni antibiyotikler geliştirilmeye başlanmıştır. Bunlar arasında en önemlisi **Selman A. Waksman**'ın bulduğu "streptomisin"dir [32].

Yukarıda bahsedilen bütün bu çalışmalar günümüz antibiyotiklerinin geliştirilmesinde ilham kaynağı olmuştur. Günümüzde etki mekanizmalarına göre pek çok antibiyotik grubunun bulunduğu ve dünyada yaklaşık 5000 antibiyotiğin olduğu bilinmektedir [32]. Penisilinin bulunuşundan günümüze kadar hastalık yapıcı ve enfeksiyona neden olan mikroorganizmalara karşı yıllardır mücadele edilmektedir. Bu mücadelede antibiyotikler çok önemli bir yere sahiptir. Bu mücadeleyi kazanabilmek için birçok yeni antibiyotik geliştirilmiştir. Fakat, bakterilerin bu yeni geliştirilen antibiyotiklere karşı büyük bir hızla dirençleri de gelişmektedir. Son yıllarda geniş-spektrumlu beta-laktamaz kavramının ortaya çıkması ile birlikte penisilinler ve diğer beta-laktam antibiyotiklerinin kullanılmasında direnç sorunuyla karşılaşılmıştır. Bu direnç sorununun önüne geçebilmek için "beta-laktamaz inhibitörleri" geliştirilmiştir. Fakat sorun yine de tam olarak giderilememiştir ve amoksisilin gibi "beta-laktamlar"ın gram-negatif bakterilere karşı etkinliği azalmıştır.

2.3.1. Kullanım Alanları

Son yıllarda dünyadaki antibiyotik kullanımı giderek artmaktadır. Antibiyotikler özellikle sağlık alanında insanların ve hayvanların sağlığının korunmasında yoğun olarak kullanılmaktadır. Bunun haricinde, gıda sektöründe besinlerin bozulmaması ve ilaç sektöründeki bilimsel faaliyetler için de sıklıkla kullanılmaktadırlar. Fakat,

günümüzde gereksiz ve bilinçsiz bir şekilde antibiyotik kullanımına bağlı olarak hem sağlık problemleri hem de çevresel sorunlar ortaya çıkmaktadır.

Tez kapsamında antibiyotiklerin sağlık alanındaki kullanımından yararlanıldığı için antibiyotiklerin bu alandaki kullanım amaçları aşağıda ayrıntılı olarak incelenmiştir.

Sağlık alanında antibiyotiklerin kullanımı 3 şekilde olmaktadır. Bunlar;

i) ***Kanıtlanmış enfeksiyon varlığında kullanımı:*** Enfeksiyon etkeninin fiziki muayene ve mikrobiyolojik testlerle belirlenip kanıtlanmasının ardından antibiyotiğin kullanılmasıdır.

ii) ***Ampirik kullanımı:*** Tanı için gerekli testler yapıldıktan sonra sonuçlar beklenilmeden tedavi amaçlı antibiyotiğin kullanılmasıdır.

iii) ***Profilaktik kullanımı:*** Özellikle cerrahi müdahaleler sonrasında hastada enfeksiyon gelişeceği düşünülüyorsa, enfeksiyonun engellenmesi amaçlı olarak enfeksiyon etkeni ile karşılaşmadan önce ya da karşılaştıktan hemen sonra antibiyotiğin kullanılmasıdır [33].

2.3.2. Etki Mekanizmaları

Antibiyotik kullanımında ana ilke konakçıda yani hastada oluşabilecek mümkün olan en az miktarda toksik etki ile mikroorganizmalar üzerinde onların gelişmesini ve çoğalmasını engelleyecek kadar veya onları öldürecek kadar toksik etki oluşturmaktır. Antibiyotikler bu toksik etkiyi bakterilerin çoğalma evrelerine etki ederek oluşturmaktadırlar.

Antibiyotiklerin bakteriler üzerindeki etkisi temel olarak 2 grupta incelenmektedir. Bunlar;

i) ***Bakteriyostatik etki:*** Bu etki mekanizması ile bakterilerin sadece gelişmesi ve çoğalması engellenmektedir, bakteriler öldürülmemektedir. Fakat, gelişmesi ve çoğalması duran bu bakteriler vücudumuzun savunma sistemi ile kolaylıkla yok edilebilmektedir. Bakteriyostatik etkiye sahip antibiyotiklerin etki gücünün kantitatif olarak göstergesi MİK değeridir. MİK değerinin küçük olması bakteriyostatik etki gücünün fazla olması anlamına gelmektedir [34].

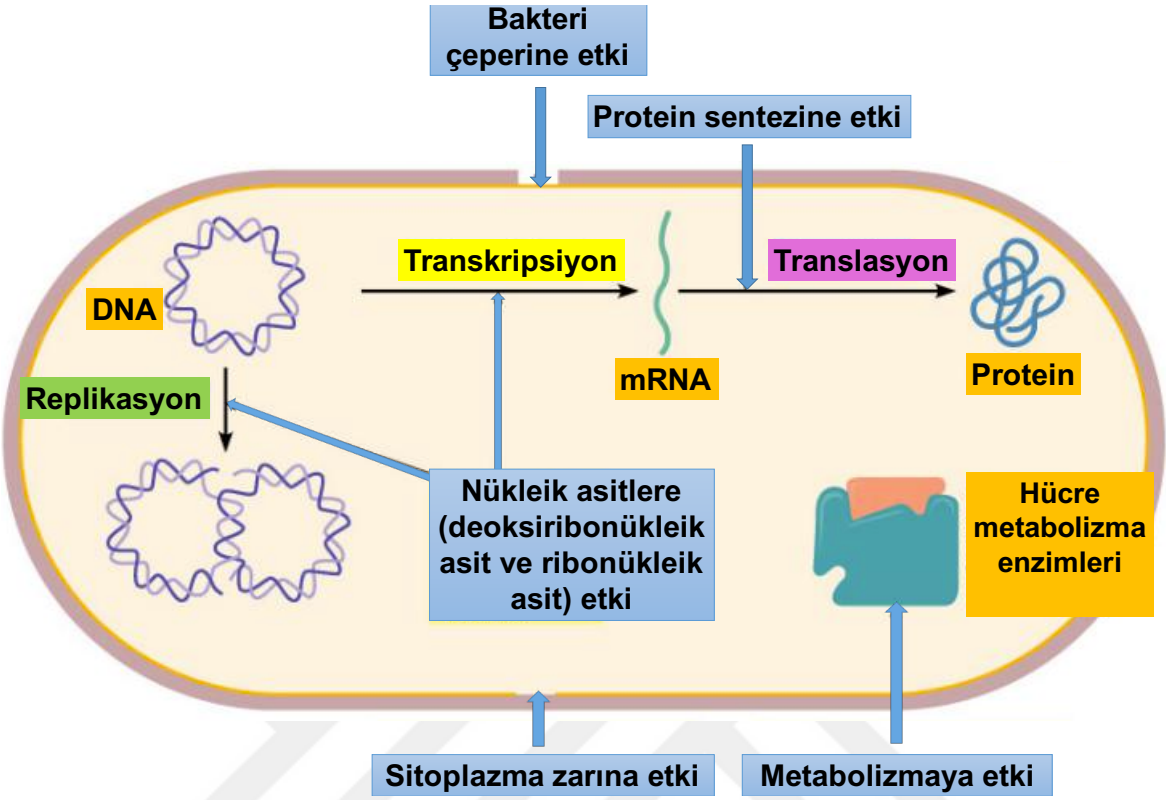
ii) ***Bakterisid veya bakterisidal etki:*** Bu etki mekanizması ile bakteriler öldürülerek yok edilmektedir. Bakterisid etkiye sahip antibiyotiklerin etki

gücünün göstergesi MBK değeridir. Bu değer ortamdaki bakterilerin en az %99.9'unu öldüren antibiyotik konsantrasyonudur [34].

Antibiyotikler bakteriyostatik ve bakterisid etki mekanizmalarını, etkili oldukları bakterilerin metabolik işlemlerine müdahele ederek gerçekleştirmektedirler. Antibiyotiklerin etkilerini göstermek için bakterilerde müdahele ettikleri metabolik olaylar çok çeşitlidir. Bu metabolik olaylar aşağıda ayrıntılı olarak sunulmuştur:

- Peptidoglikan (Murein) hem gram-pozitif bakterilerin hem de gram-negatif bakterilerin hücre duvarlarının dış yüzeyinde ve gram negatif bakterilerin ana bileşenidir. Bazı antibiyotikler bakterilerin peptidoglikan sentezini engelleyerek bakterileri yok etmektedir.
- Bakteri çeperinin iç yüzeyinde proteinlere bağlanmış fosfolipidlerden oluşan sitoplazmik zar bulunmaktadır. Bu zar bakteri sitoplazması ve dış ortam arasındaki geçişleri düzenlemektedir. Bazı antibiyotikler seçici olarak bu zara bağlanarak zarın yapısını bozmaktadır. Bunun sonucunda bakterinin ortamlar arasındaki alışveriş düzeni bozularak yıkıma uğramaktadır.
- Bakterilerin çoğalmasında ve metabolizmalarının düzenlenmesinde diğer hücrelerde olduğu gibi nükleik asitlere ihtiyaç vardır. Bazı antibiyotikler nükleik asitlerin sentezini engelleyerek bakterilerin gelişmesini ve çoğalmasını durdurmaktadır.
- Bakteri hücresinde de diğer hücrelerde olduğu gibi protein sentezinden sorumlu organel ribozomdur Bazı antibiyotikler ribozomda sentezlenen protein zincirinin oluşmasını ve uzamasını durdurmaktadır. Ayrıca, bu tür antibiyotikler bakterilerde anormal proteinlerin oluşmasına neden olarak bakterileri yok etmektedir.
- Metabolizma enzimleri bakteri hücresinin metabolik olaylarını gerçekleştirmesi için çok önemlidir. Fakat, bazı antibiyotikler metabolizma enzimlerini tutuklayarak enzimlerin işlevlerini engellemektedir. Böylece bu tür antibiyotikler bakterilerin üremesini veya çoğalmasını durdurmaktadır veya onları yok etmektedir [35, 36].

Yukarıda ayrıntılı olarak bahsedilen etki mekanizmaları Şekil 2.3'te şematik olarak gösterilmektedir.



Şekil 2.3: Antibiyotiklerin etki mekanizmaları ([37]'den değiştirilerek).

2.3.3. Sınıflandırılmaları

Antibiyotikler çok çeşitli kriterlere göre gruplandırılabilmektedir. Fakat, günümüzde en yaygın olarak 3 bilimsel sınıflandırması bulunmaktadır. Bunlar;

- etki güçlerine göre,
- etki mekanizmalarına göre ve
- kimyasal yapılarına göre

sınıflandırmadır.

i. Etki güçlerine göre sınıflandırma

Bakteriler üzerindeki etki güçlerine göre antibiyotikler 2 gruba ayrılmaktadır. Bunlar, bakteriyostatikler ve bakterisidlerdir. Bakteriyostatikler **Bölüm 2.3.2'**de ayrıntılı olarak anlatılan bakteriyostatik etki mekanizması ile bakteri hücrelerinin çoğalmasını ve gelişmesini engelleyen antibiyotiklerdir. Bakteriyostatiklere sülfonamidler, amfenikoller, tetrasiklinler, linkozamidler, makrolid ve metronidazol örnek olarak verilebilmektedir. Bakterisidler ise aynı bölümde bahsedilen bakterisid etki mekanizması ile bakteri hücrelerini öldüren antibiyotiklerdir. Bakterisidlere beta-

laktamlar, polipeptidler, rifamisin, florokinolonlar, vankomisin ve teikoplanin örnek olarak verilebilmektedir [38].

ii. Etki mekanizmalarına göre sınıflandırma

Bakteriler üzerindeki etki mekanizmalarına göre antibiyotikler 5 gruba ayrılmaktadırlar [31]. Bunlar;

1) Bakterilerin peptidoglikan sentezini engelleyerek hücre duvarının sentezini bozan ve litik enzimleri aktifleştiren antibiyotikler: Bu tür antibiyotikler; beta-laktamlar, vankomisin, ristosetin, teikoplanin ve basitrasindir.
2) Bakteri membran geçirgenliğini bozan antibiyotikler: Bu tür antibiyotikler; gramisidin, amfoterisin, ketokonazal, flukonazol ve hekzaklorofendir.
3) Bakteri ribozomlarında protein zincirinin sentezini ve uzamasını bozan antibiyotikler: Bunlar; aminoglikozidler, amfenikoller, fusidik asit, linkozamidler ve tetrasiklinlerdir.
4) Bakterilerin nükleik asit sentezini bozan antibiyotikler: Bunlar; rifamisinler, metronidazol, mitomisinler, aktinomisetler, asiklovir ve metotreksattır.
5) Bakterilerin metabolitlerini bozan antibiyotikler: Bunlara “bakteriyel anti-metabolitler” de denilmektedir. Bunlar; sülfonamidler, izoniazid, sülfonlar, trimetoprim ve etambutoldur.

iii. Kimyasal yapılarına göre sınıflandırılma

Benzer yapıya sahip antibiyotikler çoğunlukla benzer mikrobiyolojik aktiviteler sergilemektedir. Günümüzde 1 255 mikrobiyal ve 1 700'den fazla doğal antibiyotiğin yapısı tam olarak bilinmektedir. Antibiyotikler kimyasal yapılarına göre temel olarak;

- Beta-laktamlar,
- Fenikoller,
- Tetrasiklinler,
- Makrolidler,
- Sülfonamidler,
- Polipeptidler,
- Linkozamidler,
- Nitrofuranlar,
- Kinolonlar,
- İmidazoller ve

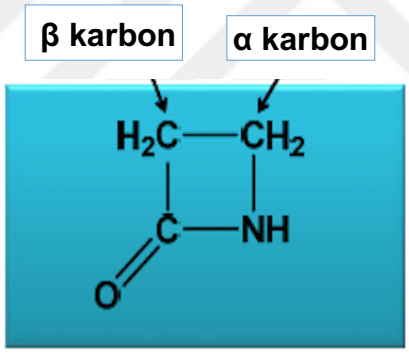
- Rifamisinler

olarak sınıflandırılmaktadır [39].

Bakteri kaynaklı enfeksiyonların tedavisinde yukarıda ayrıntılı olarak bahsedilen pek çok antibiyotik grubu günümüzde başarılı bir şekilde kullanılmaktadır. Ayrıca, son yirmi yılda enfeksiyon tedavisinde kullanılmaları için pek çok yeni antibiyotik geliştirilmiştir.

2.4. Beta-Laktam Antibiyotikleri

Beta-laktam antibiyotiklerin temeli 1928 yılında **Alexander Fleming** tarafından "Penisilin"in bulunmasına dayanmaktadır. "Beta-laktam antibiyotikler" veya kısaca "beta-laktamlar" yapılarında bir azot ve üç karbon atomundan oluşan 4 üyeli doymuş bir halka olan beta-laktam halkası içermektedir. Beta-laktam halkası, her bir bağı arasında 90° açıya sahip olan bir halkadır. Beta-laktamlar, bu özelliğinden dolayı yüksek moleküler gerinime sahiptir ve böylelikle bağlanma sırasında etkinlik kazanmaktadır. Beta-laktam halkasının şematik gösterimi Şekil 2.4'te sunulmaktadır.



Şekil 2.4: Beta-laktam halkasının şematik gösterimi.

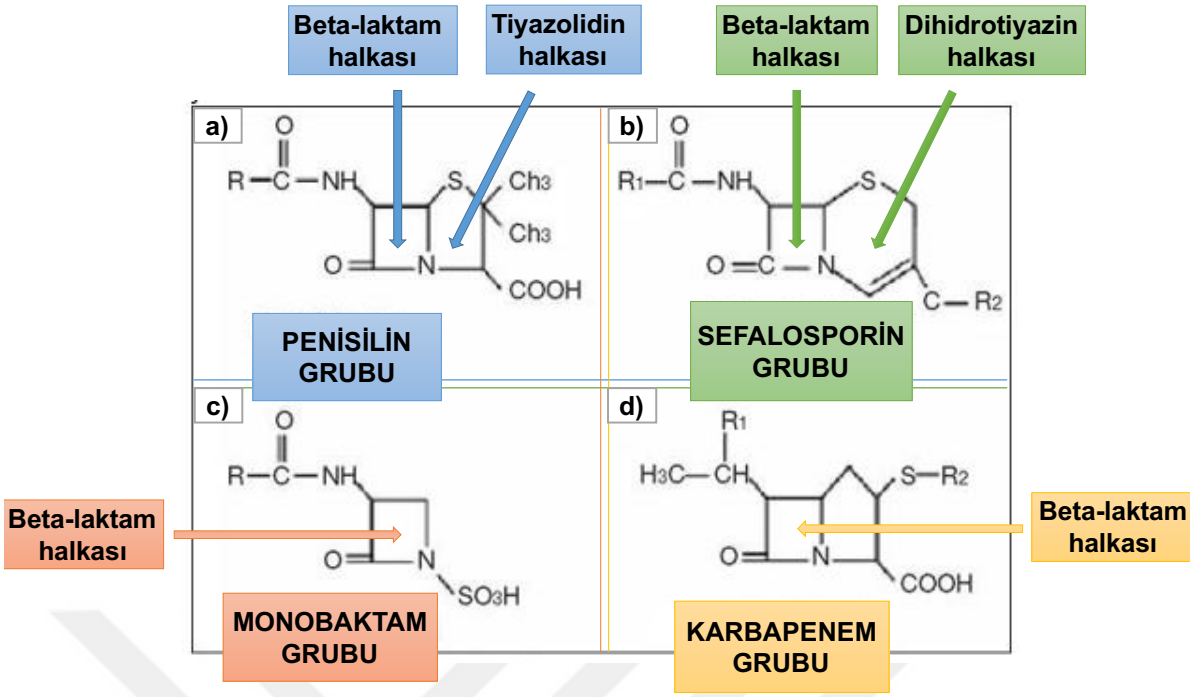
Beta-laktamlar sıklıkla kullanılan ve ortak bir yapı olarak beta-laktam halkası bulunduran antibiyotik grubudur. Günümüzde, beta-laktam halkasına bağlı amino asitlerde yapılan modifikasyonlar ile beta-laktam antibiyotikleri geliştirilmeye çalışılmaktadır. Beta-laktamların birçok çeşidi bulunmasına rağmen, beta-laktamlar kimyasal yapılarına göre temel olarak 4 gruba ayrılmaktadır. Bunlar;

- **Penisilin grubu beta-laktamlar:** Tıpta kullanılan en eski antibiyotik grubudur. Kimyasal yapılarında ***tiyazolidin halkası*** *ve* ***beta-laktam halkası*** bulunmaktadır. Bakterisid etki mekanizmaları ile bakteri hücrelerini yok etmektedirler. Bakterisid ilaç olmaları, tüm vücuda dağılım gösterebilmeleri

ve toksisitelerinin çok az olması gibi özelliklerinden dolayı bakteriyel enfeksiyonların birçoğunun tedavisinde sıklıkla kullanılmaktadırlar [40].

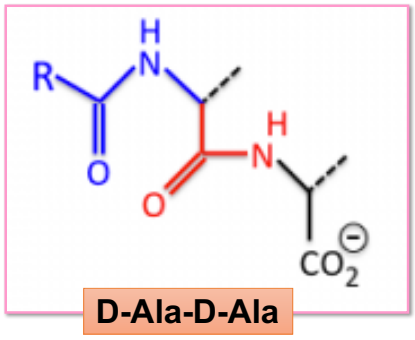
- **Sefalosporin grubu beta-laktamlar:** İlk sefalosporin grubu beta-laktam olan **Sefalosporin C**, 1940'lı yıllarda *Cephalosporicum acremonium* fungusundan elde edilerek günümüze kadar sürekli geliştirilmiştir. Günümüzde birbirinden farklı özelliklere sahip birinci kuşak, ikinci kuşak, üçüncü kuşak ve dördüncü kuşak sefalosporin grubu bulunmaktadır. Ortak özellik olarak kimyasal yapılarında ***dihidrotiyazin halkası ve beta-laktam halkası*** bulunmaktadır. Sefalosporinlerin beta-laktam halkalarının 7. pozisyonundaki "metoksi" grubunun yerine hidrojen atomu yerleştiği için gram-negatif bakterilere karşı etkinlikleri fazladır [40].
- **Monobaktam grubu beta-laktamlar:** Kimyasal yapılarında ***monosiklik beta-laktam halkası*** bulunmaktadır. Monobaktam grubu beta-laktamlar *Chromobacterium* vb. toprakta yaşayan bakteriler tarafından üretilmektedir. Birçoğunun bakterilere karşı etkinliği azdır [40].
- **Karbapenemler:** Beta-laktam grubu antibiyotiklerden karbapenemler bugüne kadarki en geniş spektruma sahip olan gruptur. Hem gram-negatif ve gram-pozitif hem de aerob ve anaerob bakterilere karşı etkindirler. Kimyasal yapılarında ***bisiklik beta-laktam halkası*** bulunmaktadır. Yapıdaki hidroksietil yan zinciri beta-laktamaz stabilitesinden sorumludur. Bu yan zincir diğer beta-laktam grubu antibiyotiklerden farklı olarak "trans" konfigürasyonundadır. Bu konfigürasyon, karbapenemlerin diğer beta-laktam grubu antibiyotiklere göre daha güçlü bir beta-laktamaz aktivitesine sahip olmalarını sağlamaktadır [40].

Yukarıda sözü edilen beta-laktam antibiyotiklerin farklı gruplarının kimyasal yapısı Şekil 2.5'te gösterilmektedir.



Şekil 2.5: Beta-laktam antibiyotiklerinin farklı gruplarının kimyasal yapısı, a) Penisilin grubu beta-laktamlar, b) Sefalosporin grubu beta-laktamlar, c) Monobaktam grubu beta-laktamlar, d) Karbapenemler ([41]'den değiştirilerek).

Şekil 2.5'te gösterildiği gibi beta-laktamların ortak özelliği yapılarında 4 üyeli beta-laktam halkası bulundurmalarıdır. Beta-laktam halkası beta-laktamların antimikrobik etkisinden sorumludur ve antibiyotiğin beta-laktam halkası bozulunca antimikrobik etkisi de kaybolmaktadır. Gram-pozitif bakterilerin çeperinde yer alan peptidoglikan tabakası bakteri çeperine şekil ve sağlamlık veren önemli bir makromoleküldür. Beta-laktam halkası, bakteri hücrelerinin büyüme evrelerinde peptidoglikan zincirlerinin kovalent bağlar ile birbirlerine bağlanmasını sağlayarak hücre duvarı oluşumundan sorumlu olan transpeptidazlar için, substrat görevindeki terminal "D-Ala-D-Ala" peptit sekansını taklit etmektedir. D-Ala-D-Ala yapısının şematik gösterimi Şekil 2.6'da sunulmaktadır. Beta-laktam halkası, "**Penisilin Bağlama Proteinleri (PBP)**" olarak bilinen transpeptidazların aktif bölgelerine bağlanarak enzim aktivitesini dolayısıyla, bakterilerin hücre duvarı sentezini engellemektedir. Hücre duvarı sentezini gerçekleştiremeyen bakteri de parçalanarak ölmektedir.



Şekil 2.6: D-Ala-D-Ala peptit sekansının şematik gösterimi ([41]'den değiştirilerek).

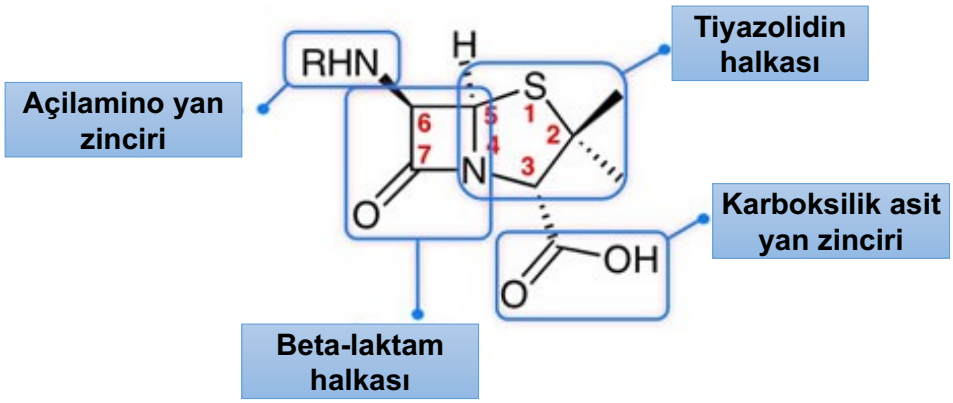
2.4.1. Penisilin Grubu Beta-Laktamlar

Alexander Fleming bakterileri yok etmek için 1928 yılına kadar yaptığı çalışmalarda başarısız olmuştur. Fakat, 1928 yılında çıktığı bir tatil dönüşünde laboratuvarında açık unuttuğu bakteri ekili Petri kaplarının küf mantarı ile dolduğunu farkeder. Küf mantarının kenarında bakteri üremediğini görür ve ***Penicillium notatum*** adlı bu küf mantarının bakterileri yok ettiğini düşünür. Bu küf mantarın kenarındaki sulu kısmına "**Penisilin**" ismini verir. Böylece, *Penicillium* türlerindeki küf mantarlarının antibakteriyel etkileri Alexander Fleming tarafından ilk kez gösterilmiştir. Fakat, Fleming penisilini *Penicillium notatum*'dan ayıramaz ve 1934 yılında penisilinle ilgili çalışmalarına son verir. Konu ile ilgili yayınladığı bir makalesinde penisilinin hastalıkların tedavisinde kullanılabileceğine değinmesine rağmen penisilin Fleming'den sonra hastalıkların tedavisinde kullanılmaya başlanmıştır [42–44].

Penisilinler gram-negatif ve gram-pozitif bakterilerin çoğu üzerinde etkindir, böylelikle çeşitli hastalıkların tedavisinde geniş kullanım alanı bulmaktadır. Penisilinler güçlü bakterisid etkiye sahip olan beta-laktam grubudur [45].

Penisilinler *Penicillium* türlerindeki (*Penicillium notatum*, *Penicillium chrysogenum* vb.) küf mantarlarının ekstraksiyonu ve saflaştırılmasıyla elde edilmektedir. Penisilinlerin toksik etkileri diğer antibiyotiklere göre oldukça düşüktür. Fakat, alerjik yan etkileri toksik etkilerine göre fazladır. Penisilinin kimyasal yapısı, 6-aminopenisilanik asit (6-APA)'den oluşmaktadır. 6-APA yapısında tiazolidin halkası ve beta-laktam halkası bulunmaktadır. Penisilinin kimyasal yapısı Şekil 2.7'de gösterilmektedir. Yapıdaki beta-laktam halkası, penisilinlerin antibakteriyel etkisinden sorumludur. Beta-laktam halkasının, çoğu bakteriler tarafından üretilen beta-laktamaz enzimleri tarafından açılmasından dolayı penisilinler kendilerine

uygun penisiloik asid türevlerine dönüşmektedir. Tiyazolidin halkasına bağlı karboksil grubunun (-COOH) serbest olmasından dolayı penisilin türevlerinin oluşturulması daha elverişli bir hale gelmektedir [42–44, 46].



Şekil 2.7: Penisilinin kimyasal yapısı.

Penisilinler, kimyasal yapılarına, farmokinetik ve antimikrobik özelliklerine göre çeşitli sınıflara ayrılmaktadır. Penisilinler, beta-laktam halkalarının amino grubuna ($–NH_2$) bağlı yan zincirin türüne göre şu şekilde sınıflandırılmaktadır:

- Benzilpenisilin (Penisilin G) tuz/esterleri,
- Fenoksipenisilinler,
- Beta-Laktamazlara (BL) dayanıklı penisilinler,
- Aminopenisilinler,
- Karboksipenisilinler,
- Açilüreidopenisilinler ve
- Diğer penisilinler [6].

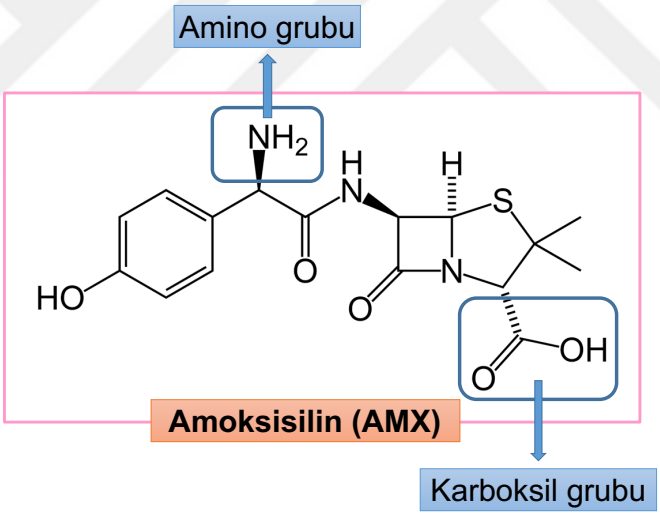
Penisilinler, aynı zamanda antibakteriyel spektrumlarına, farmokinetik ve kimyasal özelliklerine göre ise şu şekilde sınıflandırılmaktadır:

- Penisilin G ve depo türevleri,
- Aside dayanıklı penisilinler,
- Antistafilokokal penisilinler,
- Geniş spektrumlu penisilinler ve
- Antipsödomonal penisilinler [47].

2.4.1.1. Amoksisilin (AMX)

Tez kapsamında kullanılan Amoksisilin (AMX) antibiyotiği, penisilin türevi olan benzilpenisilinlerin yan zincirinin α-karbonuna amino grubunun (-NH_2) bağlanmasıyla sentezlendiği için "Aminopenisilinler" grubunda yer almaktadır. Aynı zamanda, gram-negatif ve gram-pozitif pek çok bakteri türüne karşı etkin olduğu için "Geniş spektrumlu penisilinler" grubunda da yer almaktadır.

AMX antibiyotiği kimyasal olarak; 6-[[amino-(4-hidroksifenil)asetil]amino]-3,3-dimetil-7-okso-[2S-[2α,5α,6β(S*)]]-4-tia-1-azabisiklo[3.2.0]heptan-2-karboksilik asit şeklinde isimlendirilmektedir [48]. Çalışma kapsamında kullanılan AMX antibiyotiği klinikte birçok bakteriyel enfeksiyonun tedavisinde kullanılan ve ampirik formülü $C_{16}H_{19}N_3O_5S$ olan etkin bir antimikrobiyal ajandır. AMX antibiyotiğinin moleküler ağırlığı 365.4 g/mol'dür [49] ve kimyasal yapısı Şekil 2.8'de gösterilmektedir. Hidrofilik bir ajandır, vücut sıvılarında yüksek oranlarda çözünürlüğe sahiptir ve kanıtlanmış bir toksisitesi yoktur [50].



Şekil 2.8: Amoksisilin'in (AMX) kimyasal yapısı.

Şekil 2.8'de gösterildiği gibi, AMX, yapısında karboksil (-COOH) ve amino (–NH_2) grupları taşımaktadır. Bu nedenle amfoter özelliğe sahiptir. Aynı zamanda, katı haldeki nötral çözeltilerinde "zwitter iyon" halindedir ve hem pozitif hem de negatif yük içermektedir. Bu iyon asidik ortamda katyona dönüşürken, bazik ortamda ise anyona dönüşmektedir [51].

AMX ilk olarak **Nayler** ve **Smith** isimli bilim adamları tarafından 1965 yılında sentetik olarak O,N-dibenziloksikarbonil-p-aminopenisillanik asit (6-APA) ve etil kloroformat

bileşiklerinin reaksiyonu sonucunda elde edilmiştir. AMX'in parçalanması diğer penisilin türlerinin hidrolizi ile benzerlik göstermektedir. Alkalilerin ve penisilinaz enziminin etkisi sonucunda beta-laktam halkası açılmaktadır. Halkanın açılması sonucunda α-amino-p-hidroksibenzilpenisilloik asit oluşmaktadır. Oluşan bu yapı ısıtıldığında kolaylıkla CO_2 kaybetmektedir ve α-amino-p-hidroksibenzilpenilloik asite dönüşmektedir. AMX'in asidik ortamda hidrolizasyonu sonucunda ise penisillenik asit oluşmaktadır. Yapılan çalışmalarda, AMX'in mide özsuyunda (pH: 1.5) yarı ömrünün 17 saat olduğu belirtilerek asidik ortama oldukça dayanıklı olduğu rapor edilmiştir. Bazı bakterilerin salgıladıkları amidaz enzimleri ile veya asidik ortamın etkisi ile AMX'in molekül yapısındaki amid bağı parçalanmaktadır. Bunun sonucunda 6-aminopenisillanik asit (6-APA) molekülü ve bu moleküle bağlı bulunan yan zincir sebest hale geçmektedir [48, 52–54].

Ülkemizin ilaç piyasasında içerisinde AMX'in yer aldığı pek çok ilaç bulunmaktadır. Bunlar tablet, süspansiyon, kapsül vb. farklı dozaj formlarındadır. Çizelge 2.1'de AMX içeren ilaçlar ve dozaj formları sunulmaktadır.

Çizelge 2.1: AMX içeren ilaçlar ([47]'den değiştirilerek).

İSİM	FİRMA	DOZAJ FORMU
Alfoxil	Abfar	Tablet/Süspansiyon
Amoksilin	Nobel	Kapsül
Amoksina	Mustafa Nevzat	Tablet/Kapsül/Süspansiyon
Amoxicil	Biosel	Tablet/Süspansiyon
Demoksil	Deva	Tablet/Süspansiyon
Helipak	Abbott	Tablet
Moksilin	Sandoz	Tablet/Süspansiyon
Trio	Deva	Tablet

2.5. Beta-Laktam Antibiyotiklere Karşı Gelişen Direnç Mekanizmaları

Beta-laktam antibiyotiklere karşı bakterilerin geliştirdiği 4 temel direnç mekanizması vardır. Bunlar:

- Bakteri hücrelerinin membranlarında yer alan porinlerin daralması veya porinlerin sayısının azalması,

- Bakteri hücre duvarı ile membranı arasında yer alan periplazmik boşluğa yerleşmiş bazı pompa sistemleri ile içeri girmiş olan antibiyotiğin dışarı pompalanması,
- Beta-laktam antibiyotiklerin etkinliklerini göstermek için bağlandıkları PBP (Protein Bağlama Proteinleri) yapısında konformasyonel değişiklikler meydana getirerek antibiyotiklerin PBP yapısına bağlanmasının engellenmesi veya azaltılması (Bu tür direnç mekanizmasına örnek olarak, "*Staphylococcus aureus* bakteri türünün penisilin direnci" verilebilmektedir),
- Beta-laktam antibiyotiklerini parçalayarak etkinliklerini yok eden beta-laktamaz enzimlerinin (beta-laktamazların) üretimi

olarak gruplandırılmaktadır [55].

2.6. Beta-Laktamazlar

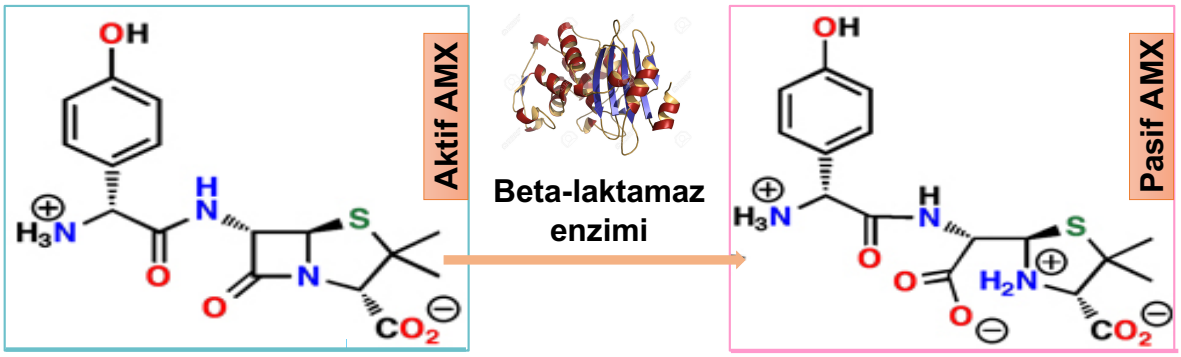
Beta-laktamazlar beta-laktam antibiyotiklere karşı klinikte en sık karşılaşılan direnç mekanizmasıdır. Gram-pozitif bakteriler ve çoğunlukla gram-negatif bakteriler tarafından üretilmektedirler ve "**beta-laktamaz enzimi**" olarak da isimlendirilmektedir. Beta-laktamazlar, nükleofilik yerdeğiştirme reaksiyonu ile antibiyotiğin beta-laktam halkasındaki karbonil grubu (C=O içeren grup) ile ester köprüsü kurup siklid amid bağını parçalamaktadır. Böylece, antibiyotiğin beta-laktam halkasını açarak PBP yapısına bağlanmasını engellemektedir. Bunun sonucunda, antibiyotik etkinliğini kaybetmektedir [56– 58].

Beta-laktamaz enzimlerinin beta-laktam antibiyotikleri üzerindeki etki mekanizması üç basamaklı olarak gerçekleşmektedir ve bu mekanizma Eşitlik 2.1'de sunulmaktadır [45].

$$E+C \underset{k_{-1}}{\overset{k_{+1}}{\longleftrightarrow}} EC \xrightarrow{k_2} EC^* \xrightarrow{k_3} E+P(s) \qquad (2.1)$$

Burada E, beta-laktamaz enzimini; C, beta-laktam antibiyotiğini; P(s) ise beta-laktam antibiyotiğinin inaktif bozunma ürünlerini göstermektedir. EC ve EC* kompleksleri enzimatik olarak inaktiftirler [45].

Beta-laktamaz enzimlerinin beta-laktam antibiyotikleri üzerindeki etki mekanizması (AMX üzerindeki etki mekanizması) Şekil 2.9'da şematik olarak da gösterilmektedir.



Şekil 2.9: Beta-laktamazların AMX antibiyotiği üzerindeki etki mekanizması.

Beta-laktamazların tarihsel gelişimi incelendiğinde, ilk beta-laktamaz enziminin Alexander Fleming tarafından belirtildiği görülmektedir. Ardından, her yeni antibiyotiğin klinikte kullanılmaya başlanması ile birlikte, o antibiyotiğin beta-laktam halkasını açarak etkinliğini yok eden yeni beta-laktamazlar gelişmektedir. 1980'lerin başlarında sefalosporin türü beta-laktamların klinikte kullanılmasıyla genişlemiş spektrumlu beta-laktamazlar (GSBL), 1980'lerin sonlarında beta-laktam antibiyotiğinin beta-laktam inhibitörleri ile birlikte kullanılmasıyla TEM enzimleri ve 1990'larda sefamisinlerin klinikte kullanımıyla plazmid kaynaklı Amp-C enzimleri ortaya çıkmıştır [59].

Günümüzde 600 civarında farklı özelliklere sahip, beta-laktamaz enzimi bulunmaktadır. Bunların çeşitli kriterlere (nükleotid dizilimleri, izoelektrik noktaları, biyokimyasal özellikleri, vb.) göre pek çok sınıflandırması yapılmaktadır. Fakat, **Bush**, **Ambler**, **Jacopy** ve **Medeiros** isimli bilim adamları tarafından yapılan sınıflandırmalar en çok kullanılanlarıdır [59].

1980 yılında **Ambler** moleküler yapılarına göre 4 çeşit beta-laktamaz enzimi tanımlamıştır. Bunlar;

- Grup A beta-laktamazlar,
- Grup B beta-laktamazlar,
- Grup C beta-laktamazlar ve
- Grup D beta-laktamazlar

olarak isimlendirilmektedirler.

i) **Grup A beta-laktamazlar:** Bu grupta yer alan enzimlerin aktif bölgelerinde serin amino asiti bulunmaktadır. Bunlar öncelikli olarak penisilin türü beta-laktamlara karşı etkindirler. Beta-laktamların beta-laktam halkasını hidrolize

ederek antibiyotiğin etkinliğini kaybetmesine neden olmaktadırlar. Grup A beta-laktamazlara, gram-negatif bakterilerde sıklıkla rastlanan TEM-1 tipi enzimler örnek olarak verilebilmektedir [59– 61].

ii) **Grup B beta-laktamazlar:** Çinko veya bakır gibi katyonlarla aktive olan metallo enzimlerdir. Bu tür enzimler klasik inhibitörlere (tazobaktam, sulbaktam, vb.) karşı dirençlidir. Fakat, EDTA (Etilendiamin tetraasetik asit) gibi metal şelatörlerine karşı dirençli değildir. Dolayısıyla, bu tür enzimler metal şelatörleri ile inhibe olarak etkinliklerini kaybetmektedir. Son 10 yılda yapılan çalışmalarda, bunların plazmidlere aktarılabildiği saptanarak insan sağlığı için ciddi bir tehdit oluşturduğu belirtilmektedir. Ülkemizde henüz çok az bilinen bu tür enzimler hemen hemen tüm beta-laktamları, özellikle karbapenemleri, hidrolize etmektedir [59–61].

iii) **Grup C beta-laktamazlar:** Grup A beta-laktamazlar gibi, aktif bölgelerinde serin amino asiti taşımaktadırlar. Bu tür enzimler esas olarak sefalosporin türü beta-laktamlara karşı etkindir, dolayısıyla sefalosporinaz aktivitesine sahiptir [60, 61].

iv) **Grup D beta-laktamazlar:** Penisilin türü beta-laktamlardan “oksasiline” karşı etkindir. Oksasilini hidrolize ederek antibiyotik etkinliğini yok etmektedir, dolayısıyla okzasilinaz aktivitesine sahiptir [60, 61].

2.6.1. Genişlemiş Spektrumlu Beta-Laktamazlar (GSBL)

GSBL’ler Grup A ve D beta-laktamazların büyük bir çoğunluğunu oluşturmaktadır. Penisilin türü ve sefalosporin türü (1., 2. ve 3. kuşak sefalosporinler) beta-laktamlara karşı direnç göstermektedirler [62]. Fakat, GSBL’ler sulbaktam, tazobaktam, klavulanik asit gibi beta-laktamaz inhibitörleri tarafından inhibe edilebilmektedir. Bu yüzden, klinikte GSBL kaynaklı hastalıkların tedavisinde beta-laktamlar ile beta-laktamaz inhibitörleri birlikte kullanılmaktadır.

GSBL’ler, TEM ve SHV tip klasik beta-laktamazların mutant formudur ve geniş spektrumlu beta-laktam antibiyotiklerin etkinliklerini yok edebilmelerini sağlayan mutasyonlar içermektedir [59]. Mutasyonlar sonucunda bu enzimlerin aktif bölgelerinde genişlemeler meydana gelmektedir. Böylece, GSBL’lerin beta-laktamaz inhibitörlerine karşı duyarlılıkları artmaktadır. Örneğin, AmpC beta-laktamazaların hidrolitik aktiviteleri klavulanik asit beta-laktamaz inhibitörüne ile inhibe olmamaktadır.

GSBL'lerin tarihsel gelişimi incelendiğinde, 1983 yılında ilk GSBL enzimi tanımlanmıştır. Bu enzimin *Klebsiella pneumoniae* türü bakterilerde bulunduğu, sefotaksim ve seftazidime karşı etkin olduğu belirtilmiştir. Ayrıca, yapılan çalışmalar sonucunda bu enzimin "SHV-1 beta-laktamaz" ın mutant formu olduğu bidirilerek bu enzime "SHV-2 beta-laktamaz" ismi verilmiştir. Bu tarihten itibaren, yeni GSBL enzim türlerinin bulunuşu ile ilgili olarak pek çok çalışma yayımlanmıştır. Ülkemizde de GSBL'ler ile ilgili araştırmalar 1990'lardan itibaren yapılmaktadır. Yapılan bu çalışmalar, yaklaşık 10 yıllık süreçte GSBL'lerin çok ciddi bir sağlık sorunu haline geldiğini göstermektedir. [59, 63, 64].

GSBL'lerin *Acetinobacter* gibi fermentatif olmayan etkenlere de yayılmış olmasından dolayı, bulunuşlarından itibaren sayılarında ve çeşitlerinde hızlı bir artış meydana gelmektedir. Fakat, GSBL'lerin baskın türleri coğrafi olarak farklılık göstermektedir. GSBL enzimlerinin en yaygın türü Fransa'da "SHV-5 beta-laktamaz" iken Türkiye'de "SHV-2 beta-laktamazı"dır [65].

GSBL enzimlerinin kökeni *Klebsiella pneumoniae* ve *Enterobacteriaceae* bakteri aileleri olmasına rağmen en fazla *Klebsiella pneumonia* bakteri suşunda gözlemlenmektedir [59]. Bunun sebebi, *Klebsiella pneumonia* suşlarının hastanın derisinde diğer suşlara göre daha uzun süre yaşamını sürdürebilmesidir [60]. Hastanın derisinde canlılığını uzun süre koruyabilen bu bakteri suşu, farklı yöntemlerle derin dokulara ilerleyerek hastada çeşitli enfeksiyonlara neden olmaktadır [66, 67]. Hastane kökenli *Klebsiella pneumonia* suşu kaynaklı hastalıklarda GSBL enzimleri ciddi bir sorun oluşturmaktadır. GSBL enzimlerinin ülkemizdeki hatta tüm dünyadaki görülme sıklığında hızlı bir artış gözlenmektedir. Bunun başlıca nedeni, GSBL'lerin plazmidlerle de aktarılabilmesidir [59]. Yapılan çalışmalar sonucunda, GSBL üretimine ilişkin pek çok risk faktörünün varlığı tespit edilmiştir. Bu risk faktörlerine cerrahi müdahaleler, ileri yaş, immunosüpresyon, kemoterapötik kullanımı ve ciddi derecedeki yanıklar örnek olarak verilebilmektedir [66, 67].

GSBL enzimi üreten bakterilere karşı klinikte kullanılabilecek en etkin beta-laktamlar karbapenemlerdir [59]. GSBL enzimi üreten bakteri suşlarının artışına bağlı olarak karbapenem kullanımında da hızlı bir artış gözlemlenmektedir. Bu artışa bağlı olarak ilerde oluşabilecek karbapenem direncini önleyebilmek için karbapenem kullanımı sınırlandırılmalıdır.

Literatürde GSBL enzimleri temel olarak 6 grupta incelenmektedir. Bunlar;

- TEM ve SHV kökenli olanlar,
- TEM ve SHV kökenli olmayanlar,
- İnhibitör dirençli beta-laktamazlar,
- İnhibitör dirençli ve geniş spektrumlu beta-laktamazlar,
- Karbapenemazlar ve
- Plazmid aracılı sefalosporinazlar (sefamisinazlar)'dır [68].

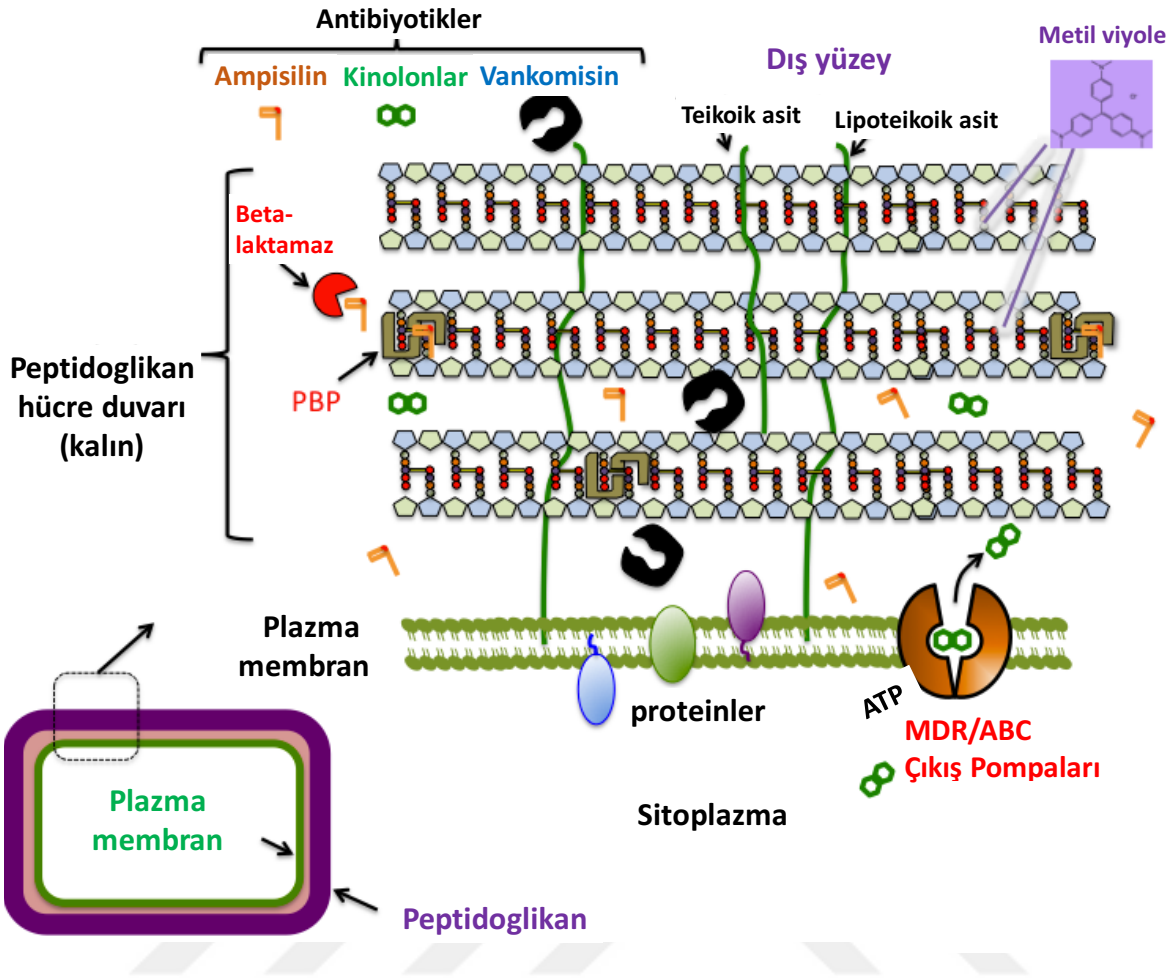
2.7. Beta-Laktamaz Enzimi Üreten Bakteriler

2.7.1. Gram-Pozitif Bakteriler

Hücre duvarının fiziksel ve kimyasal özelliklerine göre bakterileri sınıflandırmak için empirik bir yöntem olan "Gram boyama" yöntemi kullanılmaktadır. Bu yönteme göre bakteriler gram-pozitif bakteriler ve gram-negatif bakteriler olmak üzere ikiye ayrılmaktadır.

Gram-pozitif bakterilerin hücre duvarının yapısı incelendiğinde, birçok tabakadan oluştuğu ve hücre duvarlarında kalın bir peptidoglikan tabakasının bulunduğu görülmektedir. Antibiyotiklerin peptidoglikan tabakasına olan ilgilerinden dolayı antibiyotikler (penisilinler ve sefalosporinler gibi) bakterilerle etkileşebilmektedir. Bu antibiyotikler, glikan zincirleri arasındaki çapraz bağları katalize eden ve hücre duvarında yer alan transpeptidaz enzimlerinin (PBP-penisilin bağlama proteinleri-olarak da bilinmektedir) aktivitesini engellemektedirler. Gram-pozitif bakterilerin hücre duvarları aynı zamanda, konakçı hücre membranlarına bakterilerin tutnmasını kolaylaştıran teikoik asit lifleri içermektedir. Bakteriyel hücre zarı ise, hücre içi etki mekanizması olan beta-laktam antibiyotiklere karşı antibiyotik direnci ve çoklu-ilaç direnci (MDR) oluşturulmasına katkıda bulunan "ABC çıkış pompaları" içermektedir [69].

Yukarıda ayrıntılı olarak bahsedilen, gram-pozitif bakterilerin hücre duvarının yapısı Şekil 2. 10'da görsel olarak sunulmaktadır.



Şeki 2.10: Gram-pozitif bakterilerin hücre duvarının yapısı ([69]'dan değiştirilerek).

2.7.1.1. *Staphylococcus aureus* Suşları

Micrococcaceae ailesinin üyesi olan *Staphylococcus* cinsi *S. aureus,* fakültatif-anaerob gram-pozitif bir bakteridir. *Staphylococcus* ismi ilk kez 1880'lerde "Ogston" isimli bilim adamı tarafından kullanılmıştır. Bu bakteriler, genel besi ortamlarında, 6-46°C sıcaklık aralığında ve 4.0-9.3 pH aralığında üreyebilmektedir. Fakat, optimum üreme sıcaklık aralığı 30-37°C ve optimum üreme pH aralığı 7.0-7.5'dir [70].

S. aureus bakteri suşları deride, solunum sisteminde, kulakta ve kemikte bulunan patojen mikroorganizmalardır. Bu suşlar, hastane kökenli enfeksiyonların en önemli kaynaklarındandır. Ayrıca, hızlı bir şekilde çoklu antibiyotik direnci kazanarak halk sağlığı için büyük tehdit oluşturmaktadır [71].

S. aureus suşlarında ilk antibiyotik direnci 1930'larda sülfanomid grubu antibiyotiklere karşı gözlenmiştir. Ardından, 1940'larda "Penisilin G" türü beta-laktamların klinikte kullanılmaya başlanması ile birlikte *S. aureus* kaynaklı enfeksiyonların sayısında azalma gözlenmiştir, fakat bu durum uzun sürmemiştir.

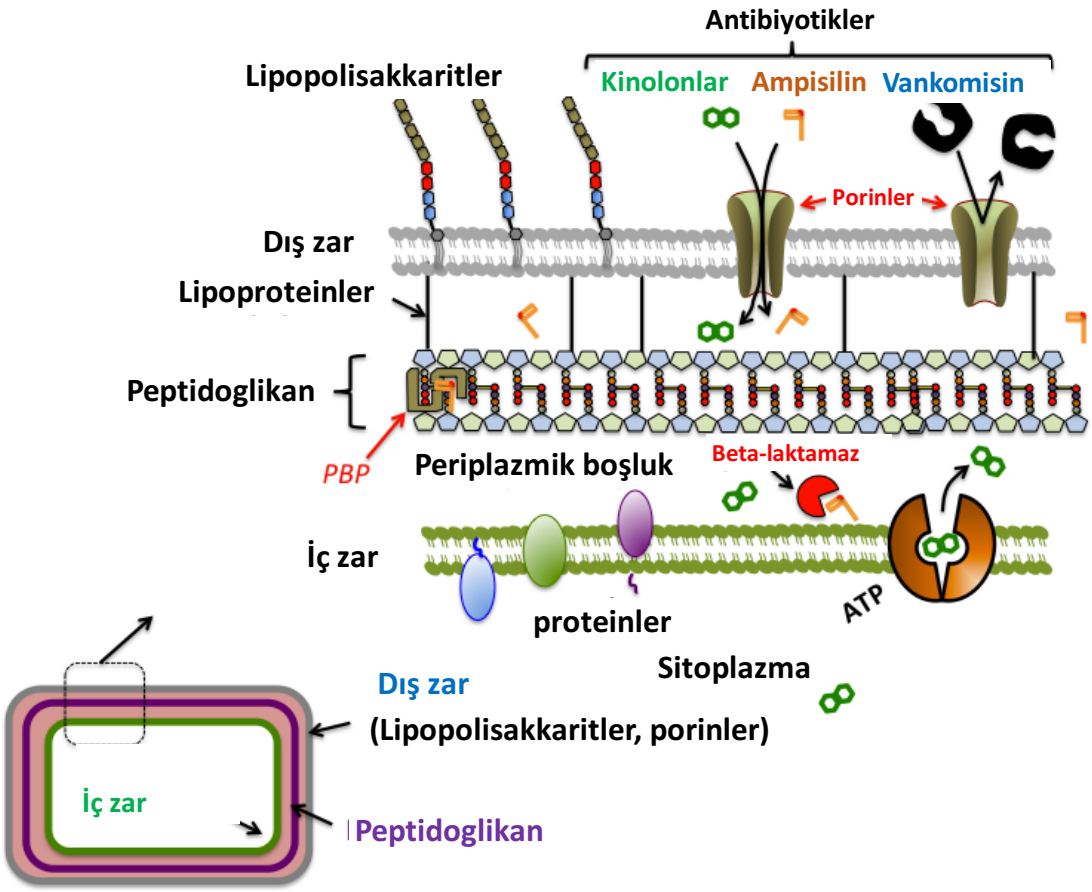
Aynı yıllarda, penisilinaz türü beta-laktamaz enzimi üreten *S. aureus* suşları izole edilerek penisiline dirençli *S. aureus* suşları gündeme gelmiştir [72]. 1950'lerde ise aminoglikozid türü beta-laktam antibiyotiklere dirençli *S. aureus* suşları ortaya çıkarak, bu suşların ürettiği yeni beta-laktamazlar tanımlanmıştır. *S. aureus* bakteri suşlarının 1946 yılında yaklaşık %6'sı beta-laktamaz enzimi üretmekte iken bu oran yıllar geçtikçe artarak 1948 yılında yaklaşık %50'lere, 1957 yılında %80'lere ve günümüzde ise %90'lara ulaşmıştır [71]. Bu artan oranlar sağlık açısından önemli sorunları da beraberinde getirmektedir.

2.7.2. Gram-Negatif Bakteriler

"Gram boyama" tekniğine göre, bu teknikte kullanılan kristal mor boyayı absorplamayan bakterilere "gram-negatif bakteriler" denilmektedir.

Gram-negatif bakterilerin hücre duvarının yapısı incelendiğinde, hücre membranı dışında iki tabakadan oluştuğu görülmektedir. Bu tabakalar; ince bir tabaka olan peptidoglikan tabakası ve gram-negatif bakterilere özgü olan dış zardır. Gram-negatif bakterilerin dış zarları lipopolisakkatrit (LPS) ve endotoksin içermektedir. Ayrıca, dış zar 700 Da'dan küçük molekül ağırlığına sahip hidrofilik moleküllerin (şeker, aminoasit, vitamin) difüzyonunu kolaylaştıran porinlere de sahiptir. Penisilin ve sefalosporin grubu beta-laktamlar gibi birçok antibiyotik grubu da hücre içerisinde etkin oldukları yerlere ulaşmak için porinlerden difüzlenmektedir. Fakat, vankomisin antibiyotiği (moleküler ağırlık, Mw: 1449 Da) porinlerden difüze olamayacak kadar büyük bir moleküldür. Bu sebeple, vankomisin antibiyotiği gram-negatif bakterilere karşı etkisizdir. Dolayısıyla, dış zar gram-negatif bakterilerin bazı antibiyotiklere karşı doğal-direnç göstermelerini sağlamaktadır. Fakat, bu direnç porinlerin gözenek özelliklerinin modifiye edilmesiyle yok edilebilmektedir [69].

Yukarıda ayrıntılı olarak bahsedilen, gram-negatif bakterilerin hücre duvarının yapısı Şekil 2.11'de görsel olarak sunulmaktadır.



Şekil 2.11: Gram-negatif bakterilerin hücre duvarının yapısı ([69]'dan değiştirilerek).

2.7.2.1. *Escherichia coli* Suşları

Escherichia coli 1850'lerde "Escherich" isimli bilim adamı tarafından ilk kez izole edilmiştir. *Enterobacteriaccae* ailesinin üyesi olan *E. coli*, fakültatif anaerob, gram-negatif bir bakteridir. Buyyon gibi genel besi ortamlarında, 15-45°C sıcaklık aralığında üreyebilmektedir. Fakat, optimum üreme sıcaklığı 37°C ve optimum üreme pH aralığı 7-7.2'dir [59].

E. coli suşları dış etkenlere karşı oldukça dayanıklı olup 50°C civarı sıcaklıklarda bile uzun süre canlı kalabilmektedir. Aynı zamanda, düşük sıcaklıklarda da canlılığını koruyabilmektedir. Fakat, dezenfektanlarla etkileştirildiğinde canlılığını kaybetmektedir [59, 72].

E. coli suşları, hastane ortamında güç yaşayan bakterilerdir. Fakat, son zamanlarda yapılan çalışmalarla birlikte, çoğul dirençli suşları hastane enfeksiyonlarından izole edilebilmektedir. *E. coli* suşları tarafından üretilen beta-laktamazların tarihçesine bakıldığında, ilk kez 1940 yılında "penisilinaz" olarak adlandırılan ve *E. coli*'de beta-laktam antibiyotik direncini oluşturan beta-laktamaz enzimi tanımlanmıştır [74].

1960'lı yılların sonunda, *E. coli'*nin aminopenisilinlere karşı direnç geliştirmesi gündeme gelmiştir [59]. Ardından, 1965 yılında ampisiline dirençli *E. coli* suşları izole edilmiştir. İzole edilen bu suşların, ampisilin direncini sağlayan beta-laktamaz enzimi belirtilerek "TEM-1" ismi verilmiştir [75]. 1980'lerde ise, klinikte gram-negatif bakteri kaynaklı enfeksiyonların tedavisinde sıklıkla tercih edilen yeni kuşak sefalosporinlere karşı direnç mekanizması olarak GSBL enzimlerinin üretimi gündeme gelmiştir [76]. Sonraki yıllarda da *E. coli* suşlarında görülen pek çok GSBL enzimi tanımlanarak literatüre bu konuda katkı sağlanmıştır [59].

2.7.2.2. *Klebsiella pneumoniae* Suşları

Enterobactericeaceae ailesinin bir üyesi olan *K. pneumoniae*, gram-negatif ve aerob bir bakteridir. Bu bakteri suşu genellikle su, toprak vb. doğal ortamlarda ve memelilerin mukozal yüzeylerinde bulunmaktadır. İnsanlarda yaygın olarak, gastrointestinal sistemde, gözlerde ve solunum sisteminde bulunmaktadır [77]. Genel besi ortamlarında 4-55°C sıcaklık aralığında üreyebilmektedir. Fakat, optimum üreme sıcaklığı 37°C ve optimum üreme pH'ı 7'dir. Bu suşlar yüksek sıcaklığa karşı dayanıksız iken susuz ortamlara karşı oldukça dayanıklıdır. Organik maddeler içinde kurutulurlarsa haftalarca hatta aylarca canlılığını koruyabilmektedir [59].

K. pneumoniae, özellikle yenidoğan yoğun bakım ünitesindeki hastalarda görülen ve ölüm oranı %70 civarında olan hastane kökenli enfeksiyonların önemli bir nedenidir [78]. *K. pneumoniae* suşları antibiyotiklere karşı oldukça dirençlidir. Son yirmi yılda, çoklu antibiyotik direncine sahip *K. pneumoniae* suşlarının neden olduğu enfeksiyonların sayısı giderek artmaktadır. Bunun en önemli nedenleri, hastanın derisinde uzun süre yaşamını sürdürebilmesi ve farklı yöntemlerle derin dokulara kolaylıkla ilerleyebilmesidir. *K. pneumoniae* suşları tarafından üretilen beta-laktamazların tarihçesine bakıldığında, ilk kez Avrupa'da 1983 yılında GSBL enzimi tanımlanarak "SHV-2" ismi verilmiştir. Aynı zamanda, ilk kez Birleşik Devletler'de de1989 yılında *K. pneumoniae* tarafından üretilen GSBL enzimleri tanımlanmıştır [59, 79, 80]. Sonraki yıllarda da *K. pneumoniae* suşlarında görülen pek çok GSBL enzimi tanımlanarak literatüre bu konuda katkı sağlanmıştır.

2.8. Beta-Laktamaz İnhibitörleri

Beta-laktamaz kökenli antibiyotik direncinin önüne geçebilmek için 1970'li yıllarda klavulanik asit, sulbaktam gibi beta-laktamaz inhibitörleri geliştirilmiştir. 1980'li

yıllarda ise beta-laktamaz inhibitörlerinin sayısında ve çeşidinde önemli bir artış meydana gelmiştir. Literatürde beta-laktamazların aktivitesini yok eden klavulanik asit aynı yıllarda ilk beta-laktamaz inhibitörü olarak tanımlanmıştır [81].

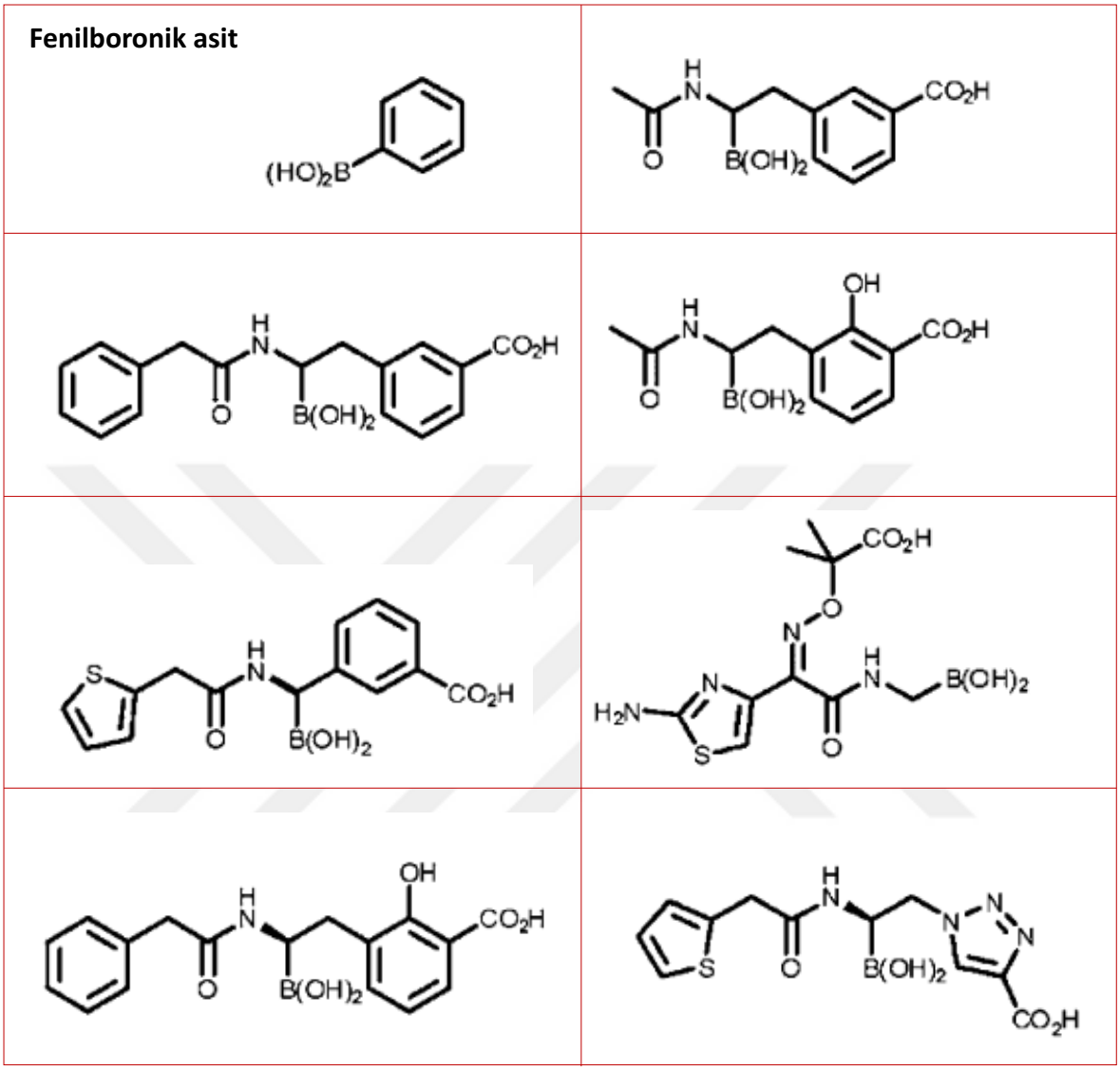
Beta-laktamaz inhibitörleri, antibakteriyel etkileri zayıf olan beta-laktam moleküleridir. Yapılarında, beta-laktam antibiyotiklerde olduğu gibi 4 üyeli beta-laktam halkası bulunmaktadır. Beta-laktamaz inhibitörleri, beta-laktamazın aktif bölgesine bağlandığında çok yavaş hidrolizlenmektedir ya da hidrolizlenmemektedir [82]. Bu nedenle, beta-laktamaz kökenli antibiyotik direncini önleyebilmek için klinik uygulamalarda beta-laktam antibiyotikleri ile beta-laktamaz inhibitörleri kombine olarak kullanılmaktadır. Literatüre bakıldığında, *in-vivo* ve *in-vitro* çalışmalarda beta-laktam antibiyotiği ile beta-laktamaz inhibitörünün kombine olarak kullanılmasının GSBL üreten mikroorganizmalara karşı etkin olduğu belirtilmektedir [59]. Beta-laktamaz inhibitörleri, beta-laktamazlara tersinmez olarak etki ettiklerinden dolayı beta-laktamazı etkisiz hale getirirken birlikte kullanıldıkları antibiyotiğin hidrolizini de engellemektedir. Böylece, beta-laktam antibiyotiğinin etkinliğini korumaktadır ve terapötik potansiyelini düzeltmektedir [83]. Beta-laktamaz inhibitörlerinin beta-laktamaz enzimleri üzerindeki etki mekanizması Eşitlik 2.2'de sunulmaktadır [81].

$$E+I \underset{k_{-1}}{\overset{k_{+1}}{\rightleftarrows}} EI \xrightarrow{k_2} E\text{-}I \xrightarrow{k_3} E\text{-}I^* \qquad (2.2)$$

Burada E, beta-laktamaz enzimini; I, beta-laktamaz inhibitörünü göstermektedir. E-I ve E-I* kompleksleri enzimatik olarak inaktiftirler [81].

Boronik asitler, uzun süre serin proteazların inhibitörleri olarak araştırılmıştır. Mekanik olarak, boronatların serinhidrolazlar için affinitesi, açilleme veya de-açilleme reaksiyonlarındaki tetrahedral geçiş durumunu etkin bir şekilde taklit eden ve katalitik serin yan zincir ile boronat kısmı arasında oluşan kovalent etkileşimden kaynaklanmaktadır [84]. Fenilboronik asit gibi borik asitlerle beta-laktamaz inhibisyonu, ilk olarak Oxford Üniversite'sindeki araştırmacılar tarafından rapor edilerek borat iyonlarının beta-laktamaz inhibisyonu üzerindeki etkisine dikkat çekilmiştir [85]. 1990'lı yılların sonundan günümüze, yapı-temelli tasarım çalışmaları boronik asit içeren beta-laktamaz inhibitörlerine yoğunlaştırılarak literatüre bu alanda önemli katkılar sağlanmıştır [84]. Literatürde çok çeşitli boronik asit beta-

laktamaz inhibitörleri tanımlanmaktadır. Çeşitli boronik asit beta-laktamaz inhibitörleri Şeki 2.12'de sunulmaktadır.

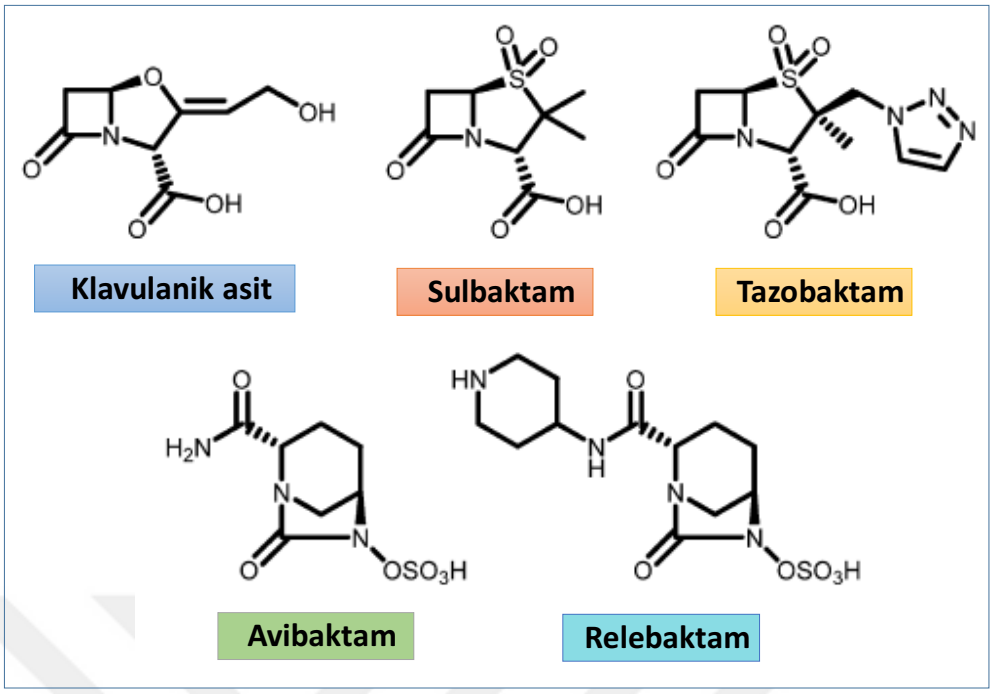


Şekil 2.12: Çeşitli boronik asit beta-laktamaz inhibitörlerinin kimyasal yapısı ([84]'den değiştirilerek).

Günümüzde kullanılan ve gelecek vadeden yeni beta-laktamaz inhibitörleri;

- Klavulanik asit,
- Sulbaktam,
- Tazobaktam,
- Avibaktam ve
- Relebaktam'dır [84].

Klavulanik asit, sulbaktam, tazobaktam, avibaktam ve relebaktam beta-latamaz inhibitörlerinin kimyasal yapıları Şekil 2.13'te sunulmaktadır.



Şekil 2.13: Klavulanik asit, sulbaktam, tazobaktam, avibaktam ve relebaktam beta-laktamaz inhibitörlerinin kimyasal yapıları ([84]'den değiştirilerek).

2.9. Hidroksiapatit

Biyomalzeme olarak pek çok alanda (dişçilik, ortopedi, implant kaplamaları, doku iskelelerinin üretimi ve kaplaması vb.) kullanımı tercih edilen hidroksiapatit (HAp), kalsiyum fosfat yapısındadır. Aynı zamanda, kimyasal bileşimi ve yapısal özellikleri nedeniyle insan iskelet sistemindeki apatitlere benzeyen biyoseramiklerdir. Yapılan araştırmalar kemik yapısının %60 oranında HAp ve %20 oranında da kollajen fiberden oluştuğunu göstermektedir [86]. Hidroksiapatit $Ca_{10}(PO_4)_6(OH)_2$ kimyasal formülüne sahiptir [87]. HAp'ın yapısında eser miktarda, başta karbonat iyonu (CO_3^{2-}) olmak üzere anyonik iyonlar ve katyonik iyonlar bulunmaktadır. HAp yapısında bulunan karbonat iyonları (CO_3^{2-}) hidroksil iyonları (OH^-) ve fosfat iyonları (PO_4^{3-}) ile yer değiştirebilmektedir. Karbonat iyonlarının hidroksil iyonları ile yer değiştirmesi sonucu "A tipi HAp" oluşmakta iken fosfat iyonları ile yer değiştirmesi sonucu "B tipi HAp" oluşmaktadır. Kemik yapısında yaygın olarak bulunan HAp tipi "B tipi HAp"tır ve stokiyometrik olarak yukarıda verilen kimyasal formülde eksikler içermektedir [88]. Biyoaktif HAp biyouyumluluğu yüksek, non-toksik, korozyona dayanıklı, non-immunojenik ve kemik oluşumunu destekleyen osteokondüktif malzemelerdir. Fakat bu avantajlarının yanı sıra, zayıf mekanik dayanıma sahip, kırılgan ve işlenmesi zordur. Kullanım açısından dezavantajlara sahip olan bu malzeme grubuna alternatif olarak iyon katkılı HAp üretimi gündeme gelmiştir. İlgili

literatür incelendiğinde farklı birçok iyon katkısının (Cl^-, F^-, Al^{3+}, Mg^{2+}, Zn^{2+}, La^{3+}, Y^{3+}, In^{3+}, Bi^{3+}) HAp'ın kimyasal ve fiziksel yapısına olan etkisinin incelendiği görülmektedir [88]. Aynı zamanda, literatürde HAp'ın antibakteriyel özelliklerini artırmak için gümüş (Ag^{1+}), bakır (Cu^{1+}) ve çinko (Zn^{2+}) iyonlarının da yapıya katıldığı belirtilmektedir [89].

HAp üretimine ilişkin literatürde birçok yöntem yer almaktadır. Bunlar;

- Sol-jel yöntemi,
- Çöktürme yöntemi,
- Hidrotermal sentez yöntemi,
- Mikrodalga ışıma yöntemi,
- Çoklu emülsiyon yöntemi,
- Elektrokristalizasyon yöntemi ve
- Biyomimetik yöntem'dir [88].

Polimerik implantlar ve/veya gözenekli doku iskelelerinin HAp ile kaplanması üzerine yapılan çalışmalar incelendiğinde SBF (yapay vücut sıvısı) çözeltisine daldırma yönteminin (biyomimetik yöntem) diğer yöntemlerle karşılaştırıldığında, kolay ve hızlı olması, özel ekipman gerektirmemesi, yüksek işleme sıcaklıklarına ihtiyaç duymaması ve fizyolojik koşullarda uygulanabilirliği gibi avantajları vardır [90, 91]. Fakat SBF'nin doygunluk seviyesinden dolayı çökelme yavaş gerçekleşmektedir ve osteoindüktif malzemeler üzerinde HAp çökelmesi birkaç hafta sürmektedir. Grubumuz tarafından yapılan çalışmalar sonucunda 10 kat deriştirilmiş 10xSBF'nin mikrodalga enerjisi ile hızlı ve yüksek HAp verimi sağladığı bilgisi literatüre kazandırılmıştır [92–94]. Tez kapsamında HAp üretimi için "10xSBF'den biyomimetik yöntemle mikrodalga destekli HAp üretim yöntemi" uygulanmıştır.

2.10. Bor ve Bor Katkılı Hidroksiapatit

Bor insanlar, hayvanlar, bitkiler vb. canlılar için oldukça önemli olan iz elementlerdendir. Vücuda beslenme yoluyla alınarak pek çok metabolik enzimin aktivitesini etkilemektedir. Ayrıca, magnezyum, vitamin D ve kalsiyum gibi birçok besinin metabolizmasını da etkilemektedir [95]. Meyveler ve baklagiller bor bakımından zengin besinler iken, et ve süt ürünleri ise bor bakımından fakir besinlerdir. Günlük olarak alınması önerilen bir bor miktarı bulunmamaktadır. Fakat,

Dünya Sağlık Örgütü (WHO) raporlarında borun insanlar, hayvanlar ve bitkiler için gerekli bir element olduğu bildirilerek yüksek dozlarda alınmasının toksik etki yapabilmesi nedeni ile günlük maksimum bor miktarının 20 mg olduğu belirtilmektedir [88, 96, 97]. WHO'a göre bir insan vücuduna alınan günlük bor miktarı ise 1.84 mg - 2.24 mg arasındadır.

Bor vücutta kalsiyum ve magnezyum emilimini kolaylaştırarak kemik iyileşmesinde önemli bir görev almaktadır ve sağlık alanında kemik kırıklarının, osteoporozun, menopozun ve beyin kanserlerinin tedavisinde kullanılmaktadır. Ayrıca, bor hücre membran fonksiyonlarında görev almaktadır ve hücre dışı matris üretimini destekleyerek yara iyileşmesini hızlandırmaktadır [98, 99]. Sıçanlar ve fareler ile yapılan bir çalışmada, bor eksikliğinin kemiğin iyileşmesini geciktirdiği ve osteogenezin seviyesini düşürdüğü gösterilmiştir [100]. Yapılan bir diğer çalışmada çeşitli bor dozları kullanılarak MC3T3-E1 fare kemik öncül hücreler ile hücre kültürü çalışmaları yapılmıştır [101]. Çalışma sonucunda borun fare kemik öncül hücrelerinin farklılaşmasını desteklediği rapor edilerek borun osteoporoza karşı oldukça etkili olabileceği belirtilmiştir. Bai ve Hunt tarafından yapılan bir çalışmada ise sıçanlar tarafından bakteriyel antijenlere karşı oluşturulan immün yanıtın bor eksikliğinde baskılandığı gösterilerek borun immün sistemde de etkili olduğu belirtilmiştir [88].

Sunulan tez çalışmasının "**2.8. Hidroksiapatit**" kısmında bahsedildiği üzere, HAp'ların özelliklerini iyileştirmek için HAp'lara iyon katkıları yapılarak iyon katkılı HAp'lar üretilmektedir. İyon katkılı HAp'lar arasında bor-katkılı hidroksiapatitler (B-HAp) de bulunmaktadır. Bor, fosfat (PO_4^{3-}) ve hidroksil (OH^-) grupları ile yer değiştirerek HAp'ların yapısına katılmaktadır ve sonuçta B-HAp elde edilmektedir [102]. Konu ile ilgili yapılan bir çalışmada, asit-baz kimyasal reaksiyonu ile B-HAp üretimi gerçekleştirilmiştir. Ardından, mezenkimal kök hücreler ile hücre kültürü çalışmaları yapılmıştır. Çalışma sonucunda B-HAp'ların mezenkimal kök hücrelerin yapışmasını ve farklılaşmasını desteklediği rapor edilerek B-HAp'ların kemik doku rejenerasyonunda oldukça faydalı olduğu belirtilmiştir [103]. Grubumuzca yapılan bir çalışmada ise mikrodalga ışıması yardımı ile biyomimetik çöktürme yöntemi kullanılarak amorf yapıda doğal kemik benzeri B-HAp üretimi gerçekleştirilmiştir. Ardından, B-HAp/kitosan nanokompozit doku iskeleri hazırlanarak MC3T3-E1 fare kemik öncül hücreleri ve mezenkimal kök hücreleri ile hücre kültürü çalışmaları

yapılmıştır. Çalışma sonucunda bor katkısının HAp'ın osteoindüktif etkisini artırdığı rapor edilmiştir [88, 104].

Literatürde, bor bileşiklerinin kemik iyileşmesi ve immün sistem vb. birçok yaşamsal faaliyet üzerindeki olumlu etkilerinin yanı sıra bakteriyostatik, bakterisidal, fungistatik, fungisidal ve antiviral etkilerinin olduğu da belirtilmektedir [105]. Arslan ve ark. tarafından yapılan bir çalışmada, içerisinde bor ihtiva eden %12 (w/v)'lik borik asit çözeltisinin, *Stapylococcus aureus* ATCC®25923, *Streptococcus mutans* RSHM®06029, *Enterococcus faecalis* ATCC®29212, *Enterococcus faecium*, *Escherichia coli* ATCC2®5922, *Pseudomonas aeruginosa* ATCC®27853, *Klebsiella pneumonia* ATCC®700603 vb. gram-pozitif ve gram-negatif bakteriler üzerinde oldukça etkili olduğu rapor edilmiştir [106].

Yukarıda ayrıntılı olarak bahsedildiği üzere, borun kemik doku üzerindeki etkilerinin araştırıldığı çok sayıda çalışma mevcuttur. Çalışmalardan çıkartılabilecek ortak sonuç, borun *in-vitro* kemik doku mühendisliğinde kullanıldığında osteojenik farklılaşmayı desteklediği ve osteoporoz gibi önemli kemik hastalıklarına iyi geldiğidir. Bu konu ile ilgili yapılan çalışmalar B-HAp'ın kemik doku iskelelerinde kullanımını gündeme getirmiştir [30]. Sunulan tez kapsamında B-HAp nanopartikülleri ilk kez beta-laktam antibiyotiği ile birlikte kullanılarak hem osteojenik etkisi, hem de beta-laktamaz inhibitörü olarak etkinliği birlikte değerlendirilmiştir.

2.11. Kontrollü Salım Sistemleri

İlaç salım sistemleri 1950'li yıllardan beri araştırmacıların ilgisini çekmektedir [107]. İlaç salım sistemleri farmasötik bileşenlerin kontrollü bir şekilde verilerek, insanlardaki ve/veya hayvanlardaki etkinliğinin arttırılmasını hedeflemektedir. Bütün kontrollü salım sistemlerinde temel amaç ilacın uzun periyotlarda belli doz aralıklarında salımının sağlanarak etkin doz aralığında kalmasını sağlamaktır ve yan etkilerin oluşumunu önlemektir. Böylelikle ilaç salım sistemleri ile mevcut ilaçlar yeni sistemlerde kullanım potansiyeli bulmaktadır.

İlaç salım sistemlerinde temel mekanizma, ilacın biyomalzemenin içine ve/veya yüzeyine tutuklanması ve ardından uygun salım mekanizmaları (biyomalzemenin erozyonu sonucu ilacın salımı, biyomalzemenin içine ve/veya yüzeyine tutuklanan ilacın difüzyonu sonucu ilacın salımı vb.) ile biyomalzemeden salınmasıdır [108]. Son yıllarda ilaç salım sistemlerinin hazırlanmasında biyobozunur polimerlerin

kullanımı ön plana çıkmaktadır [109]. Ayrıca, günümüzde teknolojinin ve malzeme biliminin gelişimiyle birlikte kontrollü salım sistemlerinde gelişmeler meydana gelmektedir.

Çoğu ilaç salım sisteminde, salım periyodunun hemen başlangıcında görülen ve biyomalzemenin yüzeyine yakın kısımlarında tutuklanan ilacın difüzyonuna dayanan “ani patlama etkisi (burst effect)” ile karşılaşılmaktadır. Patlama etkisi, ilacın hızlı bir şekilde salınmasına neden olmaktadır. Bu nedenle, “geciktirilmiş salım (sustained release)” gerektiren uygulamarda “ani patlama etkisi” tercih edilmemektedir [110]. Salım sistemlerinda patlama etkisinin görülmesine neden olan pek çok etken vardır. Bunlara; ilacın biyomalzemenin yüzeyine iyi tutunmaması, biyomalzeme-ilaç arasındaki zayıf etkileşim, kullanılan polimer konjugatlarının uygun olmaması vb. örnek olarak verilebilmektedir [112, 113].

2.11.1. Partiküler Formdaki İlaç Salım Sistemleri

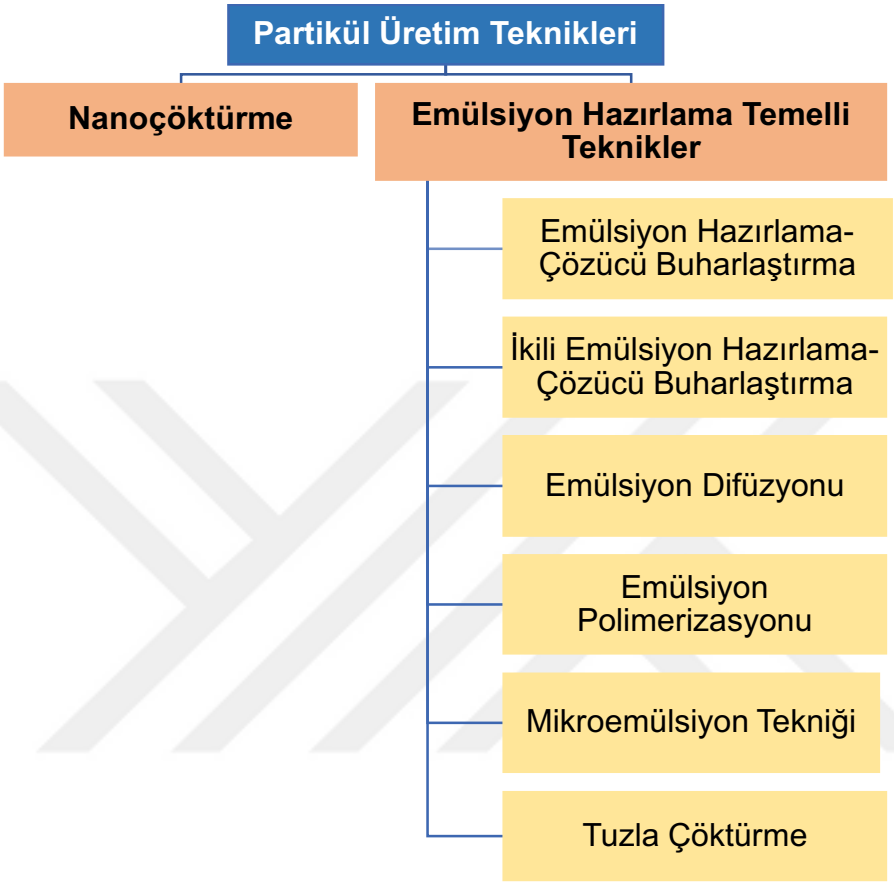
Partiküler formdaki ilaç salım sistemleri, yükleme kapasitelerinin yüksek olması, yüklenen ilaç dozunun ayarlanabilir olması, partikül boyutunun ayarlanabilir olması, toksik yan etkileri azaltması, ilacın farmasötik ve terapötik etkisini geliştirmesi, doku ve hücrelere spesifik hedefleme sağlaması vb. avantajları ile günümüzde kontrollü salım sistemleri arasında ön plana çıkmaktadır [114, 115].

Partiküler formdaki ilaç salım sistemleri kullanılan taşıyıcı sistemlerin boyutlarına göre sınıflandırılmaktadır. Bunlar;

- **Mikropartiküler sistemler:** Boyutları 1 μm ile 1000 μm arasında değişen taşıyıcı sistemlerdir. Mikropartiküller kontrollü salım sağlaması, istenilen boyutta üretilebilmesi, toksik etkiye sebep olmaması gibi avantajlarından dolayı pek çok kontrollü salım çalışmasında tercih edilmektedir [115].
- **Nanopartiküler sistemler:** Boyutları 1 nm ile 1000 nm arasında değişen taşıyıcı sistemlerdir. Nanopartiküllerin en önemli avantajları; partikül boyutunun ayarlanabilir olması, hücrelerle etkileşimlerinin sağlanması, hidrofobik ajanların sudaki çözünürlüğünü artırması, salımın kontrol edilebilmesidir [116]. Pek çok avantajına rağmen, nanopartiküllerin, küçük boyutlu olması, partikül agregasyonuna neden olması ve ilaç yükleme kapasitelerinin sınırlı olması gibi dezavantajları da bulunmaktadır [116].

2.11.2. Partikül Üretim Yöntemleri

Partikül üretim yöntemleri genel olarak nanoçöktürme ve emülsiyon hazırlama temelli yöntemler olmak üzere iki gruba ayrılmaktadır. Şekil 2.14'te bu yöntemler ve alt grupları şematik olarak sunulmaktadır.



Şekil 2.14: Partikül üretim yöntemlerinin sınıflandırılması [117].

Bu yöntemlerin avantajları ve dezavantajları ile ilgili ayrıntılı açıklamalar Çizelge 2.2'de sunulmuştur [117].

Çizelge 2.2: Partikül üretim yöntemlerinin avantajları ve dezavantajları ([117]'den değiştirilerek).

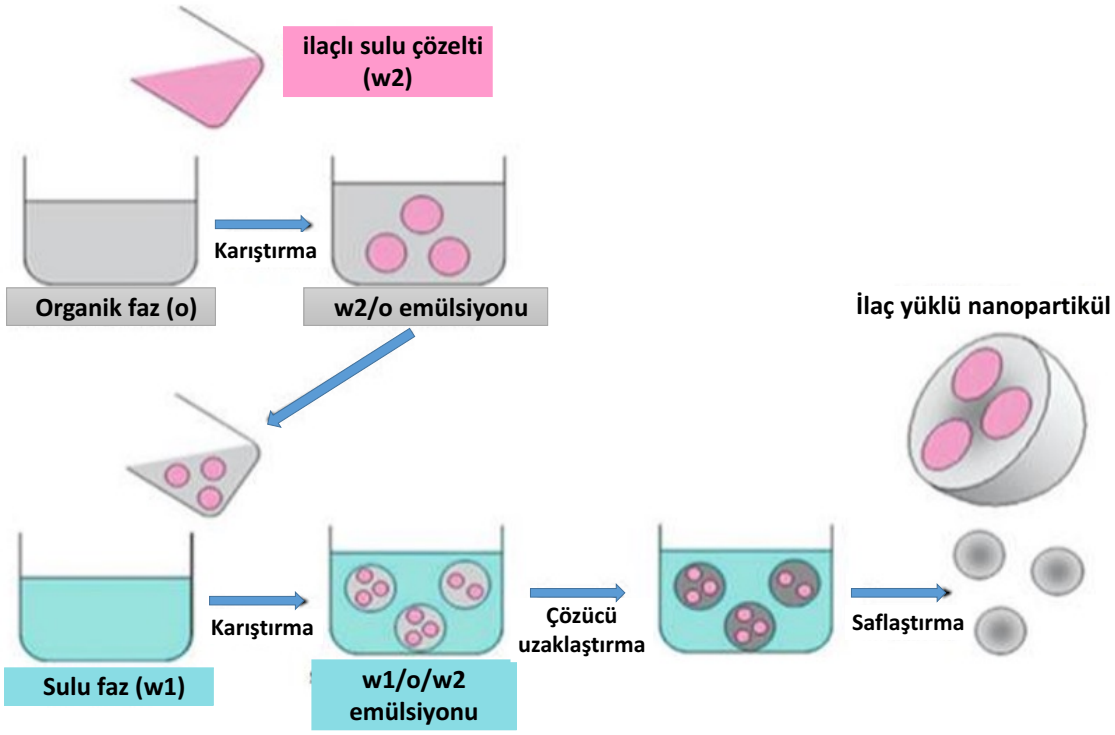
YÖNTEM	AVANTAJ	DEZAVANTAJ
Emülsiyon hazırlama-çözücü buharlaştırma	• Lipofilik ilaçlar için enkapsülasyon veriminin yüksek olması, • Partikül büyüklüğünün ayarlanabilir olması.	• Hidrofilik ilaçlar için enkapsülasyon veriminin düşük olması.
İkili-emülsiyon hazırlama-çözücü buharlaştırma	• Hidrofilik ve hidrofobik ilaçlar için uygun olması.	• Heterojen dağılıma sahip büyük boyutlarda partikül oluşumu, • İki basamaklı bir proses olması, • Ölçek büyütme zorluğu.
Emülsiyon difüzyonu	• Lipofilik ilaçlar için enkapsülasyon veriminin yüksek olması, • Toksik olmayan çözücülerin kullanımı, • Ölçek büyütme kolaylığı.	• Organik çözücülerin partikülden tam olarak uzaklaştırılamaması, • Hidrofilik ilaçlar için enkapsülasyon veriminin düşük olması.
Emülsiyon polimerizasyonu	• Hızlı bir yöntem olması.	• Toksik organik çözücülerin ve monomerlerin kullanılması.
Mikroemülsiyon tekniği	• Organik çözücülerin kullanılmaması, • Enerji tüketmemesi.	• Gerekli olan yüzey aktif madde derişiminin yüksek olması.
Nanoçöktürme	• Kolay ve hızlı olması, • Çok toksik çözücülerin kullanılmaması.	• Partikül boyutunun temel olarak kullanılan polimer konsantrasyonuna bağlı olması.
Tuzla çöktürme	• Lipofilik ilaçlar için enkapsülasyon veriminin yüksek olması, • Sıcaklık duyarlı ilaçlar için uygulanabilir olması.	• Lipofilik ilaçlar için kullanımının uygun olması.

Tez kapsamında kullanılan yöntem olması nedeniyle "**ikili-emülsiyon hazırlama-çözücü buharlaştırma**" yöntemi aşağıda ayrıntılı olarak anlatılmaktadır.

2.11.2.1. İkili-Emülsiyon Hazırlama-Çözücü Buharlaştırma Yöntemi

İkili-emülsiyon hazırlama-çözücü buharlaştırma yöntemi hem hidrofilik hem hidrofobik ilaçlar ile yapılan salım sistemlerinin hazırlanmasında kullanılabilmesine rağmen genellikle hidrofilik ilaçların kullanıldığı sistemlerde tercih edilmektedir [118]. Yöntem genel hatlarıyla iki aşamadan oluşmaktadır. İlk olarak biyoaktif ajan (ilaç) içeren sulu çözelti (w2) polimer içeren organik faz (o) içerisinde dağıtılmaktadır. Ardından, w2/o emülsiyonu dış sulu faz (w1) içerisinde emülsifiye edilmektedir. Sonuçta oluşan w1/o/w2 emülsiyonundan organik çözücü uzaklaştırılarak (buharlaştırma, difüzyon yöntemi vb.) nanopartikül süspansiyonu elde edilmektedir. Nanopartikül süspansiyonunun santrifüjlenmesi ve su ile yıkanması sonucu nanopartiküller elde edilmektedir. Son olarak ise elde edilen nanopartiküller liyofilize edilerek kurutulmaktadır [119].

Yukarıda ayrıntılı olarak anlatılan "İkili-emülsiyon hazırlama-çözücü buharlaştırma yöntemi" Şekil 2.15'de şematik olarak sunulmaktadır.



Şekil 2.15: İkili-emülsiyon hazırlama-çözücü buharlaştırma yöntemi ([119]'den değiştirilerek).

İkili-emülsiyon hazırlama-çözücü buharlaştırma yöntemi homojenizasyon ve/veya ultrasonikasyon destekli bir yöntemdir. Partikül boyutu işlem sırasında uygulanan homojenizasyon ve/veya ultrasonikasyon işlemlerinin hızına ve süresine bağlıdır. Partikül boyutu aynı zamanda polimerin türüne ve derişimine, emülsiyon ajanının çeşidine (sodyum dodesil sülfat, SDS; poli(vinil alkol), PVA; didodesil dimetil amonyum bromür, DMAB) ve derişimine de bağlıdır. Toksik çözücülerle (diklorometan, DCM; kloroform vb.) çalışılması, homojenizasyon ve/veya ultrasonikasyon işlemlerinden dolayı enerji gereksiniminin yüksek olması bu yöntemin dezavantajlarıdır [120]. Fakat, prosesin kolay olması ve partikül boyutunun ayarlanabilir olması nedeniyle ilaç salım sistemlerinin hazırlanmasında sıklıkla tercih edilen yöntemlerdendir [121].

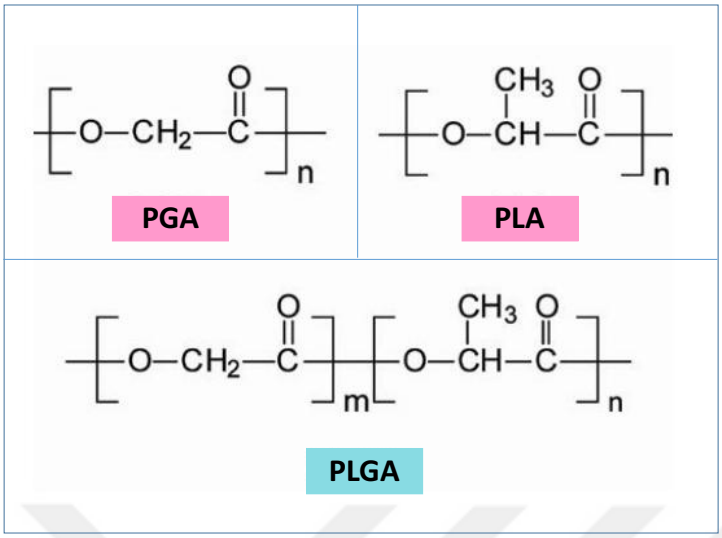
2.11.3. Partikül Üretiminde Kullanılan Biyomalzemeler

Kontrollü ilaç salım sistemlerinde taşıyıcı malzemeler olarak polimerler, metaller, seramikler, yağlar vb. kullanılmaktadır. Bu malzemelerden polimerler biyouyumlu ve biyobozunur olmaları sebebiyle kontrollü salım sistemlerinde sıklıkla tercih edilmektedir [122]. Biyobozunur polimerlerin bozunma ürünlerinin sistemde ve vücutta toksik etki yapmaması gerekmektedir. Salım sistemlerinin hazırlanmasında kullanılan polimerler iki gruba ayrılmaktadır. Bunlar;

i. **Sentetik polimerler:** Bu tür polimerler oldukça dayanıklı ve kararlıdırlar. Aynı zamanda yüksek miktarlarda ve yüksek saflıklarda üretilebilmektedirler. Bu avantajlarından dolayı ilaç salım sistemlerinde sıklıkla kullanılan polimerlerdendir. İlaç salım sistemlerinde tercih edilen sentetik polimerlere; PLA, PGA, PCL, poli(laktik-ko-glikolik asit) (PLGA) ve poli(hidroksi bütirat) (PHB) örnek olarak verilebilmektedir [123]. Tez kapsamında hazırlanan ilaç salım sisteminde kullanılan PLGA aşağıda ayrıntılı olarak anlatılmaktadır.

   - **Poli(laktik-ko-glikolik asit) (PLGA):** Laktik ve glikolik asit kopolimeri olan PLGA FDA (Food and Drug Administration) onaylı bir polimerdir. PGA polimeri hidrofilik özelliktedir ve hücre içinde hızla çözünmektedir. PLA ise yapısında bulunan metil yan gruplarından ($-CH_3$) dolayı hidrofobik özelliktedir. PLGA kopolimerinin yapısında bulunan PLA:PGA oranı PLGA'nın özelliklerini belirlemektedir. PLA içeriğinin fazla olması PLGA'yı hidrofobik yapmakta iken PGA içeriğinin fazla olması PLGA'yı hidrofilik

yapmaktadır [124]. PLA, PGA ve PLGA polimerlerinin kimyasal yapıları Şekil 2.16'da sunulmaktadır.



Şekil 2.16: PGA, PLA ve PLGA'nın kimyasal yapıları.

PLGA nanopartiküllerden ilacın salımı iki basamaklı olarak gerçekleşmektedir. İlk olarak, salım ortamı ilaç ile birleştirilen polimerik taşıyıcı ile etkileşerek taşıyıcıya penatre olmaktadır. Böylelikle, taşıyıcı içerisine sıvı alarak şişmeye başlamaktadır. Bu esnada, taşıyıcı yüzeyindeki ilaç da salınmaya başlamaktadır. Ardından, ortam sıvısı polimerik taşıyıcı tarafından absorplanırken, taşıyıcıda ilacın salımını artıracak olan difüzyon kanalları oluşmaya başlamaktadır. Böylelikle, ilacın salımı artarak devam etmektedir. Bu sistem PLGA polimerik yapılı taşıyıcının bozunmasıyla yok olmaktadır [29].

ii. **Doğal polimerler:** Bu tür polimerler bitkisel veya hayvansal kaynaklıdırlar. Hidrofilik ilaçlar için yüksek enkapsülasyon verimi sağlaması, biyobozunur ve biyouyumlu olması vb. avantajlarından dolayı ilaç salım sistemlerinde kullanılmaktadır [125]. İlaç salım sistemlerinde kullanılan doğal polimerlere; kolajen, kitosan ve albumin örnek olarak verilebilmektedir [126].

2.11.4. Kontrollü İlaç Salım Sistemlerinde Kullanılan Matematiksek Modeller

Kontrollü ilaç salım sistemlerinde ilaç salımı enkapsüle edilen biyomalzemenin bozunmasına ve/veya ilacın difüzyonuna dayanmaktadır. Son zamanlarda yapılan salım sistemi tasarımlarıyla ilaç salımının süresi ve kinetiği kontrol edilmeye çalışılmaktadır. Salım sistemlerinin kinetiklerini belirlemek için sıklıkla kullanılan matematiksel modeller aşağıda açıklanmıştır [127].

I. Sıfırıncı-derece salım kinetiği

Sıfırıncı derece salım kinetiğinde ilacın salım hızı ilacın derişiminden bağımsızdır. Salım periyodu boyunca ortamdaki ilaç seviyesi sabit tutulmaktadır. Bu salım kinetiğinin matematiksel modeli Eşitlik 2.3'te sunulmaktadır.

$$\mathbf{Q_t = Q_0 + K_s t} \tag{2.3}$$

Eşitlikte; Q_t ilacın zamanla salınan miktarını, Q_0 ise ilacın başlangıç miktarını ifade etmektedir. K_s sabiti sıfırıncı-derece salım sabiti, t ise salım süresidir.

II. Birinci-derece salım kinetiği

Birinci derece salım kinetiğinde ilacın salım hızı ilacın derişimine birinci dereceden bağlıdır (Eşitlik 2.4).

$$\mathbf{dC/dt = K_B(C_0 - C_t)} \tag{2.4}$$

Eşitlikte; C_0 ilacın başlangıç derişimini, C_t ise ilacın t anındaki derişimini ifade etmektedir. K_B sabiti birinci-derece salım sabiti, dC/dt ise zamanla ilaç derişiminde meydana gelen değişimdir. Eşitlik 2.4'ün doğrusallaştırılmış hali Eşitlik 2.5'te sunulmaktadır.

$$\mathbf{\ln\left(C_0/(C_0 - C_t)\right) = K_B t} \tag{2.5}$$

III. Higuchi salım kinetiği

Higuchi salım kinetiği illaç moleküllerinin boyutunun polimerik taşıyıcıların boyutlarından çok küçük olması varsayımına dayanmaktadır. Bu salım kinetiğinin matematiksel modeli Eşitlik 2.6'da sunulmaktadır.

$$\mathbf{Q_t = K_H\sqrt{t}} \tag{2.6}$$

Eşitlikte; Q_t ilacın t anındaki miktarını, t ise salım süresini ifade etmektedir. K_H sabiti Higuchi salım kinetiği sabitidir.

IV. Hixson-Crowell salım kinetiği

Bu salım kinetiğinin matematiksel modeli Eşitlik 2.7'de sunulmaktadır.

$$\mathbf{\sqrt[3]{Q_0} - \sqrt[3]{Q_t} = -K_{HC} t} \tag{2.7}$$

Eşitlikte; Q_0 ilacın başlangıç miktarını, Q_t ise ilaın zamanla salınan miktarını ifade etmektedir. K_{HC} Hixson-Crowell sabiti, t ise salım süresidir.

3. DENEYSEL ÇALIŞMALAR

Sunulan tez çalışması genel olarak 6 aşamada gerçekleştirilmiştir. İlk olarak hidroksiapatit (HAp) ve bor katkılı hidroksiapatit (B-HAp) nanopartikülleri grubumuz tarafından daha önceden belirlenmiş protokole uygun olarak sentezlenmiş ve karakterizasyon çalışmaları yapılmıştır. Ardından AMX yüklü PLGA nanopartiküller sentezlenerek karakterizasyon çalışmaları yapılmıştır. Sonraki basamakta AMX yüklü PLGA nanopartiküller ile HAp veya B-HAp'tan oluşan nanokompozit doku iskeleleri üretilmiştir ve karakterizasyon çalışmaları gerçekleştirilmiştir. Ardından, AMX yüklü nanopartiküllerin ve iskelelerin *in-vitro* salım çalışmaları gerçekleştirilmiş ve salım kinetikleri belirlenmiştir. Son aşamada ise üretilen nanokompozit doku iskeleleri ile hem MC3T3-E1 fare kemik öncül hücreleri kullanılarak hücre kültür çalışmaları hem de 4 farklı bakteri suşu kullanılarak bakteriyel çalışmalar gerçekleştirilmiştir.

3.1. Kullanılan Malzemeler

Sunulan tez çalışmasında kullanılan AMX (MA: 365.40 g/gmol, potansi $\geq$900 μg/mg) antibiyotiği Sigma-Aldrich (Almanya) firmasından satın alınmıştır. Nanopartikül hazırlanmasında kullanılan poli(laktik-ko-glikolik asit) (PLGA) kopolimeri (PLA:PGA; 50:50) ile sulu faz hazırlanmasında stabilizatör olarak kullanılan didodesil dimetil amonyum bromür (DMAB) Sigma-Aldrich firmasından temin edilmiştir. PLGA polimerini çözmek için kullanılan etil asetat Riedel-de Haen (Almanya) firmasından satın alınmıştır. PLGA nanopartiküllerinin üretimi aşamasında Heidolph (Almanya) marka homojenizatör kullanılmıştır. AMX'in enkapsülasyon verimini belirlemek için Dionex (A.B.D.) marka yüksek basınçlı sıvı kromatografisi (HPLC) ve analizinde 4.6 mm x 250 mm boyutlarındaki C18 kolonu kullanılmıştır. Mobil faz olarak kullanılan asetonitril Sigma-Aldrich firmasından temin edilirken ortofosforik asit (%85 (v/v)) Fluka (Almanya) firmasından temin edilmiştir. AMX'in salım çalışmalarında kullanılan fosfat tampon çözelti (PBS) tablet olarak Sigma-Aldrich firmasından temin edilmiştir.

Nanokompozit doku iskelelerinin sentezinde kullanılan kitosan (aşırı viskoz) Sigma-Aldrich firmasından temin edilmiştir. HAp ve B-HAp nanopartiküllerinin üretiminde kullanılan potasyum klorür (KCl), sodyum klorür (NaCl), kalsiyum klorür dihidrat ($CaCl_2.2H_2O$), sodyum dihidrojen fosfat monohidrat ($NaH_2PO_4.H_2O$) ve magnezyum

klorür hekzahidrat ($MgCl_2.6H_2O$) tuzları ve sodyum bikarbonat ($NaHCO_3$) Merck (Almanya) firmasından satın alınmıştır. B-HAp nanopartiküllerin sentezinde kullanılan borik asit (H_3BO_3) BDH Chemicals Ltd (İngiltere) firmasından temin edilirken sodyum hidroksit (NaOH) ise Merck firmasından temin edilmiştir. HAp ve B-HAp nanopartiküllerin üretiminde Milestone (İtalya) marka mikrodalga fırın kullanılmıştır.

Hücre kültür çalışmalarında Riken hücre bankasından (Tsukaba, Japonya) alınan MC3T3-E1 preosteoblast hücre hattı kullanılmıştır. Çalışmalarda kullanılan Minimum Essential Medium Alfa Modifikasyonu (α-MEM), penisilin-streptomisin, L-glutamin ve fetal sığır serumu (FBS) Biowest (Fransa) firmasından temin edilirken hücreleri yüzeyden kaldırmak için kullanılan Tripsin-EDTA çözeltisi Sigma-Aldrich firmasından temin edilmiştir. Hücre canlılığının belrlenmesinde kullanılan 3-[4,5-dimetiltiazol-2-il]-difenilterazolyum bromür (MTT) ve izopropanol Sigma-Aldrich firmasından satın alınmıştır.

Antibakteriyel çalışma kapsamında kullanılan *Escherichia coli* ATCC®25922, *Staphylococcus aureus* ATCC®25923, *Klebsiella pneumoniae* ATCC®BAA-1144 ve *Klebsiella pneumoniae* ATCC®700603 bakteri suşları Microbiologics (A.B.D.) firmasından temin edilmiştir. Bakterilerin çoğaltılması için kullanılan Mueller-Hinton Besiyeri (MHB) ve bakteri kültür çalışmalarında kullanılan Mueller-Hinton Agar (MHA) Becton Dickinson (Fransa) firmasından satın alınmıştır. Çalışmalarda kullanılan antibiyogram diskleri ve strip çubukları ise Bioanalyse (Türkiye) firmasından satın alınmıştır.

3.2. Biyomimetik Yöntemle HAp ve B-HAp Üretimi ve Karakterizasyonu

Biyomimetik yöntemle HAp ve B-HAp üretimi için Maviş ve ark. tarafından üretilen 10xSBF (yapay vücut sıvısı) çözeltisi kullanılmış [21] ve mikrodalga ışımasından yararlanılmıştır. Çalışma kapsamında gerçekleştirilen HAp ve B-HAp üretimi ayrıntılı olarak aşağıda açıklanmıştır.

3.2.1. HAp ve B-HAp Üretimi

Biyomimetik yöntemle HAp üretimi için 10XSBF çözeltisi kullanılmıştır. 10XSBF çözeltisi için gerekli olan kimyasallar ve miktarları Çizelge 3.1'de listelenmiştir.

Çizelge 3.1: 10XSBF çözeltsi için gerekli olan tuzlar ve miktarları ([88]'den değiştirilerek).

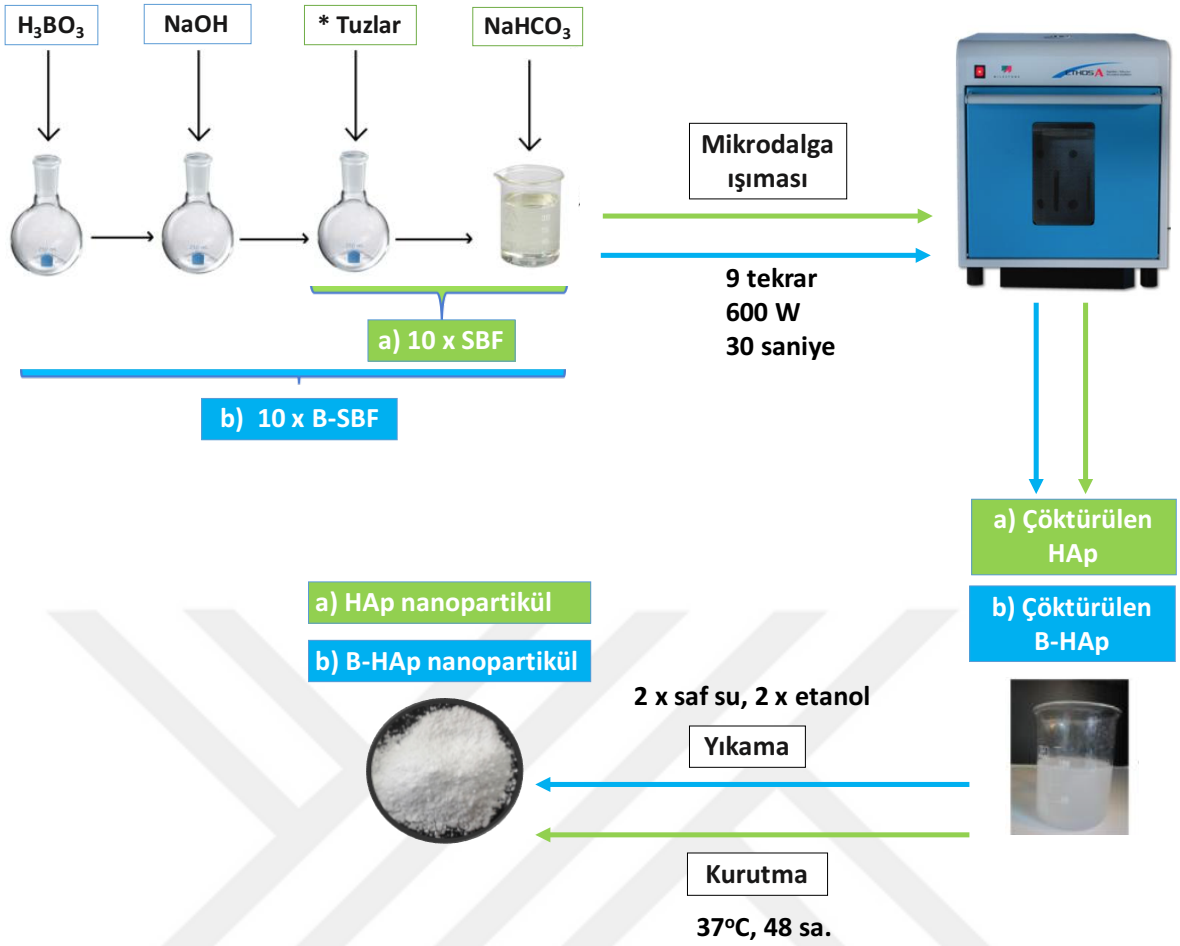
Tuzlar	Ekleme sırası	Miktar (g)
NaCl	1	58.443
KCl	2	0.373
$CaCl_2.2H_2O$	3	3.675
$MgCl_2.6H_2O$	4	1.016
$NaH_2PO_4.H_2O$	5	0.250
* $NaHCO_3$	6	0.084

* 100 mL SBF için.

10XSBF stok çözeltisi hazırlamak için 800 mL saf su içerisine Çizelge 3.1'de verilmiş olan ilk 5 tuz sırasıyla eklenmiş ve çözdürülmüştür. Ardından stok çözeltiye 200 mL saf su ilave edilerek çözelti hacmi 1000 mL'ye tamamlanmıştır. Stok çözeltisiden 100 mL alınarak boş behere aktarılmış ve içerisine Çizelge 3.1'de verilmiş olan 6'ıncı tuz ilave edilip çözelti mikrodalga fırın içerisine yerleştirilerek 30 saniyelik sürelerle 9 kere 600 W mikrodalga ışıması verilmiştir. Mikrodalga ışıması yardımı ile çöktürülen HAp çözeltisindeki safsızlıkların giderilmesi için örnekler sırasıyla 2 kere saf su ve 2 kere etanol (%96 (v/v)) ile yıkanarak her defasında 13 000 rpm'de 5'er dk santrifüjlenmiştir. Yıkama işlemi sonrasında süpernatan kısmı atılan örnekler 37°C'de bekletilerek kurumaları sağlanmıştır. Kurutma işleminin ardından örnekler havanda dövülmüş ve kullanım aşamasına kadar desikatörde muhafaza edilmiştir [27].

B-HAp üretimi için 800 mL ultra saf su içerisine ilk olarak 10 g H_3BO_3 eklenerek çözdürülmüştür. Çökelme için uygun olan pH değer aralığını (6.8-7.4) elde edebilmek için stok çözeltisine 10 M NaOH çözeltisinden 900 μL eklenmiştir (10XB-SBF). Ardından HAp üretimindeki süreç aynen uygulanmıştır.

Yukarıda ayrıntılı olarak bahsedilen HAp ve B-HAp üretiminin şematik gösterimi Şekil 3.1'de sunulmaktadır.



Şekil 3.1: a) HAp ve b) B-HAp üretiminin şematik gösterimi (*Tuzlar: KCl, NaCl, $CaCl_2.2H_2O$, $MgCl_2.6H_2O$, $NaH_2PO_4.H_2O$).

3.2.2. Hidroksiapatitin ve Bor Katkılı Hidroksiapatitin Karakterizasyonu

HAp ve B-HAp partiküllerinin faz özelliklerini incelemek için X-Işını kırınımı (XRD) analizi yapılmıştır. Analiz sırasında PANanalytical X'Pert Pro MPD (45 kv-40 mA Cu source) marka XRD cihazı kullanılmıştır. Partikül örnekleri için 20-80° (2θ) arasında 0.026°'lik adımlarla tarama yapılmıştır. HAp ve B-HAp partikülleri için elde edilen sonuçlar grafiğe geçirilerek karşılaştırılmış ve sonuçlar bölümünde sunulmuştur.

3.3. AMX Yüklü PLGA Nanopartiküllerin Hazırlanması

3.3.1. PLGA Nanopartiküllerin Sentezi

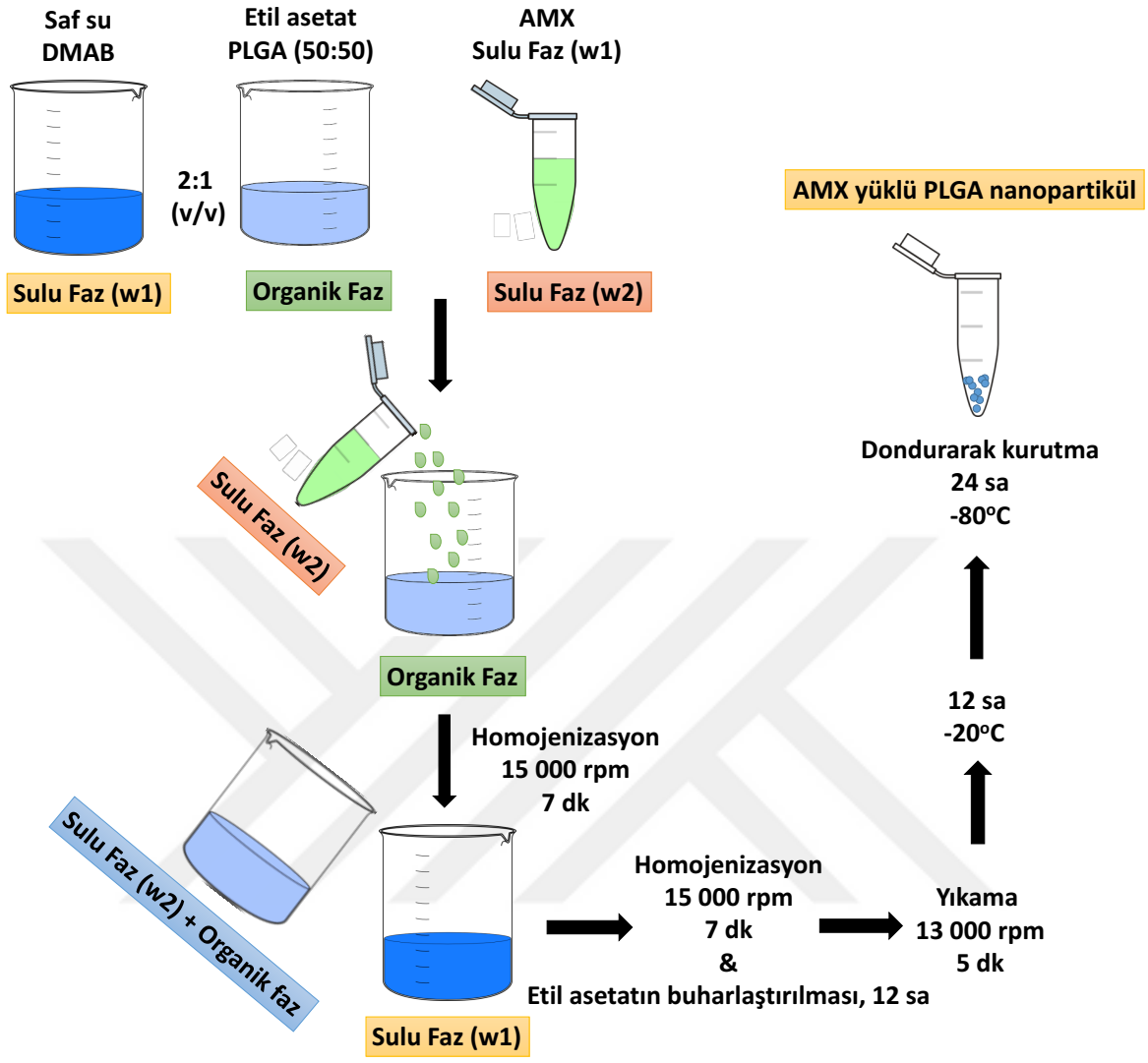
PLGA nanopartiküllerin sentezi için emülsiyon hazırlama-çözücü buharlaştırma yöntemi kullanılmıştır. İlk olarak PLGA kopolimeri (PLA:PGA oranı 50:50) etil asetet içerisinde çözdürülerek %2 (w/v)'lik organik faz elde edilmiştir. Ardından stabilizatör olarak kullanılan DMAB saf su içerisinde çözdürülerek %1 (w/v)'lik sulu faz elde

edilmiştir. Hazırlanan organik ve sulu fazlar ayrı ayrı olarak 3 saat boyunca manyetik karıştırıcıda karıştırılmıştır. Üç saatin sonunda sulu faz organik faza ilave edilmiş ve oluşan karışım yüksek hızlı homojenizatörde 7 dk süresince 15 000 rpm'de homojenize edilmiştir. Ardından karışım manyetik karıştırıcıya alınmış ve önceden 40°C'de bekletilmiş olan saf sudan 2 mL ilave edilmiştir. Organik fazın buharlaşarak karışımdan uzaklaşması ve karışımda süspanse halde bulunan PLGA nanopartiküllerinin aglomere olmaması için çözelti 12 saat boyunca karıştırılmıştır. Ardından karışım 1 kere saf su ile 13 000 rpm'de 5 dk santrifüj edilerek yıkanmıştır. Süpernatan kısmı atılan örnekler -20°C'de 12 sa bekletildikten sonra kuruması için dondurarak-kurutma (Christ, Almanya) cihazına alınmış ve 24 sa bekletilmiştir. Kurutulan örnekler kullanım aşamasına kadar desikatörde muhafaza edilmiştir [29].

3.3.2. PLGA Nanopartiküllere AMX Yüklenmesi

PLGA nanopartiküllere AMX yüklenmesi işleminde ikili emülsiyon hazırlama-çözücü buharlaştırma yöntemi modifiye edilerek kullanılmıştır. Öncelikle PLGA kopolimerinin (PLA:PGA oranı 50:50) etil asetat içerisinde ve DMAB'ın saf su içerisinde çözdürülmesi ile sırasıyla 5 mL %2 (w/v)'lik organik faz (o) ve 10 mL %1 (w/v)'lik sulu faz (w1) elde edilmiştir. Hazırlanan organik ve sulu fazlar ayrı ayrı olarak manyetik karıştırıcıda karıştırılmıştır. Karıştırılma işlemi sonrasında farklı miktarlarda AMX antibiyotiği 500 μL w1 fazı ile çözdürülerek ikinci sulu faz elde edilmiştir (w2). Elde edilen w2 fazı organik faza ilave edilerek 15 000 rpm'de 7 dk homojenize edilmiş ve o/w2 karışımı hazırlanmıştır. Karışım bir süre manyetik karıştırıcıda karıştırıldıktan sonra w1 fazına ilave edilerek 15 000 rpm'de 7 dk homojenize edilmiştir (w1/o/w2 karışımı). Daha sonra w1/o/w2 karışımı manyetik karıştırıcıya alınmış ve önceden 40°C'de bekletilmiş olan saf sudan 2 mL ilave edilmiştir. Ardından, PLGA nanopartikül hazırlanmasında kullanılan yıkama ve kurutma işlemleri uygulanmıştır [128]. Kurutulan örnekler kullanım aşamasına kadar desikatörde muhafaza edilmiştir.

Yukarıda ayrıntılı olarak bahsedilen PLGA nanopartiküllere AMX yüklenmesi işleminin şematik gösterimi Şekil 3.2'de sunulmaktadır.



Şekil 3.2: PLGA nanopartiküllere AMX yüklenmesi işleminin şematik gösterimi.

3.4. PLGA Nanopartiküllerin Karakterizasyon Çalışmaları

3.4.1. AMX Yüklü PLGA Nanopartiküllerin Enkapsülasyon Veriminin Belirlenmesi

Kurutulmuş toz halindeki AMX yüklü PLGA nanopartikülden 1 mg tartılarak PLGA polimerinin çözünmesi için 1 mL diklorometan (DCM) içerisine eklenmiştir. Çözünmenin ardından elde edilen karışım çeker ocak içerisindeki vakum etüvünde yaklaşık 2 sa bekletilerek DCM'in uzaklaşması sağlanmıştır. Bu işlemler sonucunda PLGA nanopartikülde enkapsüle olan AMX antibiyotiğinin tamamı karışım ortamına salınmıştır. Ortamdaki AMX'in çözünmesi için karışım üzerine asetonitril:saf su (70:30 (v/v)) karışımı ilave edilerek vortekslenmiştir. Elde edilen çözeltiden 20 µL alınarak Dionex marka HPLC C18 kolonuna beslenmiştir. HPLC sisteminde mobil

faz olarak asetonitril:%0.1 (v/v)'lik orto-fosforik asit karışımı 60:40 oranında kullanılmıştır ve numunenin akış hızı 1 mL/dk olarak ayarlanmıştır. Kolona beslenen AMX çözeltisinin 230 nm dalga boyunda alıkonma süresi olan 1.8'inci dk'da kromatogramda çıkan pikin alanı not edilmiştir. Ardından pik alanından derişime geçiş yapabilmek için kalibrasyon grafiği oluşturulmuştur. Kalibrasyon grafiği için AMX antibiyotiği asetonitril:saf su (70:30) karışımında çözdürülerek 1.25 mg/mL derişiminde stok çözelti hazırlanmıştır. Hazırlanan stok çözelti asetonitril:saf su (70:30) karışımı ile seyreltilerek farklı AMX konsantrasyonlarına sahip standart çözeltiler hazırlanmıştır. Elde edilen standart çözeltiler HPLC sistemine beslenmiş ve pik alanı-derişim parametrelerinden oluşan kalibrasyon grafiği elde edilerek kalibrasyon denklemi bulunmuştur. Önceden not edilen pik alanı bu denklemde yerine yazılarak derişime geçilmiştir ve ardından enkapsülasyon verimi hesaplanmıştır.

3.4.2. Partikül Boyutunun Belirlenmesi

Sulu ortamda süspanse halde bulunan boş PLGA nanopartiküller ve AMX yüklü PLGA nanopartiküller 1:100 oranında saf su ile seyreltilmiştir. Ardından Zetasizer (Malvern Nano series, İngiltere) cihazı ile boy ve boy dağılımları incelenmiştir. Elde edilen sonuçlar karşılaştırılmış ve sonuçlar bölümünde sunulmuştur.

3.4.3. Fourier Dönüşümlü Kızılötesi Spektroskopisi (FTIR) Analizi

AMX yüklü PLGA nanopartiküllerde AMX antibiyotik varlığını gösterebilmek için toz haldeki boş PLGA nanopartiküller ve AMX yüklü PLGA nanopartiküller Fourier dönüşümlü kızılötesi spektrofotometresi (Thermo Fisher Scientific, A.B.D) ile 400-4000 cm^{-1} dalga boyu aralığında incelenmiştir. Analiz sonucunda elde edilen spektrumlar birbirleri ile karşılaştırılarak sonuçlar bölümünde sunulmuştur.

3.4.4. Taramalı Elektron Mikroskobu (SEM) Analizi

Sulu ortamda süspanse halde bulunan boş PLGA nanopartiküller ve AMX yüklü PLGA nanopartiküller 1:100 oranında seyreltilmiştir. Seyreltilmiş karışım analiz yapılacak yüzeye damlatılarak kurutulmuştur. Kurutma işleminin ardından örnekler altın-paladyum ile kaplanarak taramalı elektron miroskobu (Zeiss Evo-50, Almanya) ile incelenmiştir. Elde edilen sonuçlar birbirleri ile karşılaştırılmış ve sonuçlar bölümünde sunulmuştur.

3.5. Doku İskelelerinin Üretimi

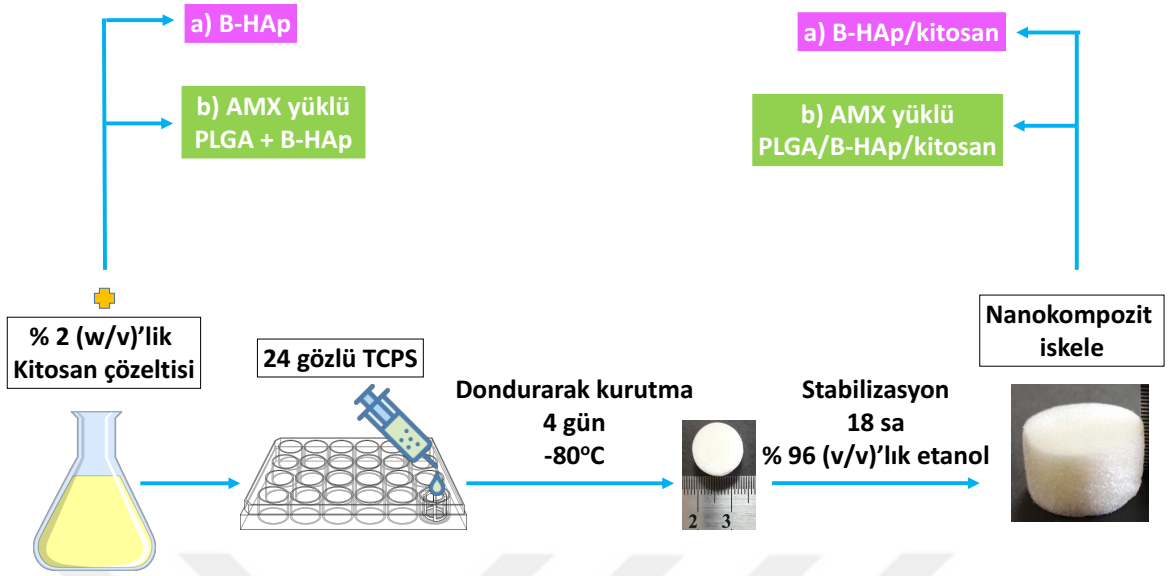
Tez çalışma kapsamında üretilen nanokompozit doku iskeleleri;

- B-HAp/kitosan ve
- AMX yüklü PLGA nanopartikül/B-HAp/kitosan'dır.

Sunulan çalışma kapsamında sentezlenen doku iskeleleri dondurarak-kurutma yöntemi kullanılarak üretilmiştir [129]. Bu yöntemde ilk olarak 2 g kitosan 0.2 M asetik asit içerisinde çözünerek %2 (w/v)'lik kitosan çözeltisi hazırlanmıştır. Çözelti 24 saat manyetik karıştırıcıda karıştırılarak kitosanın tamamen çözünmesi sağlanmıştır. Ardından çözelti safsızlıkların giderilmesi için süzülmüştür.

B-HAp/kitosan doku iskelesi sentezi için %2 (w/v)'lik kitosan çözeltisinden bir miktar alınmış ve üzerine mikrodalga desteği ile biyomimetik olarak çöktürülen B-HAp nanopartiküllerinden belirli miktarda ilave edilerek karıştırılmıştır. Benzer şekilde, AMX yüklü PLGA nanopartikül/B-HAp/kitosan nanokompozit doku iskelesi sentezi için de bir miktar kitosan çözeltisine belirli miktarda B-HAp ve AMX yüklü PLGA nanopartikül ilave edilerek karıştırılmıştır. Elde edilen çözelti 24 gözlü Petri kaplarına (TCPS) dökülerek 1 gece -20°C'de ve ardından 4 gün dondurarak-kurutma cihazında (-80°C) bekletilmiştir. Hazırlanan doku iskeleleri stabilizasyon için %96 (v/v)'lık ethanolde 18 sa bekletilmiştir. Stabilizasyon sonrası tekrardan 1 gün dondurarak-kurutma cihazında bekletilmiştir. Örnekler 6 mm x 1 mm boyutlarında kesilerek kullanım aşamasına kadar desikatörde muhafaza edilmiştir.

Sunulan tez çalışma kapsamındaki nanokompozit doku iskelelerinin (B-HAp/kitosan ve AMX yüklü PLGA/B-HAp/kitosan) sentezine ilişkin kullanılan yöntem şematik olarak Şekil 3.3'te sunulmuştur.



Şekil 3.3: Nanokompozit doku iskelelerinin sentezi a) B-HAp/kitosan, b) AMX yüklü PLGA/B-HAp/kitosan.

3.6. Nanokompozit Doku İskelelerinin Karakterizasyonu

3.6.1.1. FTIR Analizi

Nanokompozit doku iskelelerinde B-HAp ve AMX yüklü PLGA nanopartiküllerin varlığını gösterebilmek için doku iskeleleri FTIR ile 400-4000 cm^{-1} dalga boyu aralığında incelenmiştir. Analiz sonucunda elde edilen spektrumlar karşılaştırılarak sonuçlar bölümünde sunulmuştur.

3.6.1.2. SEM Analizi

B-HAp/kitosan, PLGA nanopartikül (boş) içeren B-HAp/kitosan ve AMX yüklü PLGA nanopartikül içeren B-HAp/kitosan nanokompozit doku iskeleleri 6 mm x 1 mm boyutlarında kesilmiş ve altın-paladyum ile kaplanmıştır. Kaplanan iskeleler Zeiss (Evo-50, Almanya) marka SEM cihazı ile incelenmiştir. Elde edilen sonuçlar karşılaştırmalı olarak sonuçlar bölümünde sunulmuştur.

3.7. Salım Sistemlerinin Hazırlanması ve Salım Kinetiklerinin İncelenmesi

3.7.1. PLGA Nanopartiküllerden AMX Salımı

PLGA nanopartiküllerden AMX salımının incelenmesi için 0.17 mg AMX içeren 4 mg PLGA nanopartikül selüloz membrana yerleştirilmiş ve membran içerisine 1 mL fosfat tampon çözeltisi (PBS, pH: 7.4) eklenmiştir. Hazırlanan selüloz membran 10 mL PBS çözeltisinden oluşan rezervuar ortamına konmuştur. Salım çalışmaları üç paralel örnek ile 37°C sıcaklığındaki ve 70 rpm çalkalama hızındaki etüvde

yürütülmüştür. Nanopartiküllerden AMX salım çalışmasında ilk gün 1., 3., 6. ve 24. saatlerde, diğer günlerde ise salım süresi sonuna kadar birer gün ara ile hazırlanan rezervuar ortamından 900 μL alınmış ve yerine 900 μL taze PBS eklenmiştir. Partiküllerden salınan AMX antibiyotiğinin miktarının belirlenebilmesi için HPLC sistemi ve kalibrasyon grafiği kullanılmıştır. Analiz sonucunda AMX antibiyotiğinin kümülatif salım verileri elde edilmiştir. Ardından salım profili oluşturulmuştur ve bu profile uygun kinetik model belirlenmiştir.

3.7.2. Kitosan Nanokompozit Doku İskelelerinden AMX Salımı

AMX yüklü PLGA nanopartikül içeren B-HAp/kitosan nanokompozit doku iskelelerinden AMX salımı için her biri 0.25 mg AMX yüklü 6 mg PLGA nanopartikül içeren 6 mm x 1 mm boyutlarındaki kompozit doku iskeleleri hazırlanmıştır. Doku iskelelerinin her biri koyu renkli şişelere konularak üzerlerine 10 mL PBS çözeltisinden oluşan rezervuar ortamı eklenmiştir. Salım çalışmaları üç paralel örnek ile 37°C'deki ve 70 rpm'deki çalkalamalı etüvde gerçekleştirilmiştir. Kitosan nanokompozit doku iskelelerinden AMX salım çalışmasında ilk gün 1., 3., 6. ve 24. saatlerde, diğer günlerde ise salım süresi sonuna kadar birer gün ara ile salım ortamından 900 μL alınmış ve yerine 900 μL taze PBS eklenmiştir. İskelelerden salınan AMX antibiyotiğinin derişimi HPLC sistemi ve kalibrasyon grafiği yardımı ile belirlenmiştir. Ardından AMX antibiyotiğinin kümülatif salım verileri elde edilmiştir ve salım profili oluşturularak, kinetik salım modeli belirlenmiştir.

3.8. Bakteriyel Çalışmalar

Sunulan tez çalışmasında B-HAp nanopartiküllerinin beta-laktam antibiyotiklerle sinerjik etkinliği üç farklı mikrobiyolojik yöntem ile incelenmiştir. Aşağıda bu yöntemlerin ayrıntıları verilmiştir. Bu yöntemlerde kullanılan referans suşları;

- *Escherichia coli*, Amerikan Tipi Kültür Koleksiyonu (ATCC)®25922,
- *Staphylococcus aureus* ATCC®25923,
- *Klebsiella pneumoniae* ATCC®BAA-1144 ve
- *Klebsiella pneumoniae* ATCC®700603'dür.

Kullanılan referans suşlarından *Escherichia coli* ATCC®25922 ve *Staphylococcus aureus* ATCC®25923 bakteri suşları GSBL enzimi üretmeyen standart suşlardır ve kontrol grubu olarak kullanılmışlardır.

İncelenecek olan mikroorganizmaların ekimi, 18-24 saatlik agar plağındaki tek düşmüş kolonilerin 2-4 saat süreyle 37°C'de inkübe edilmesi ile hazırlanmıştır. Süspansiyonun bulanıklığı fotometrik neflometre ile 0.5 McFarland bulanıklığına eşdeğer olarak ayarlanmıştır (BD PhoenixSpec Nephelometer BBL™ CrystalSpec™).

3.8.1. Çift Disk Sinerji Yöntemi

Çift disk sinerji testleri Mueller-Hinton agar (MHA) plakları üzerinde yukarıda bahsedilen dört farklı referans suşu ile gerçekleştirilmiştir. Hücre süspansiyonu hazırlanarak MHA'a steril pamuklu eküvyon ile ekim gerçekleştirilmiştir. Daha sonra MHA üzerine steril panç ile 6 mm çapında delik açılmıştır ve 200 µg bor bulunduracak şekilde belli miktarda B-HAp (eşdeğer miktarda HAp) buraya yerleştirilmiştir. Ardından B-HAp ve HAp ile sinerjik etkisini incelemek için beta-laktam antibiyotik içeren diskler steril bir pens yardımıyla agar yüzeyine yerleştirilmiş ve inhibisyon zon çaplarındaki değişimler incelenmiştir.

3.8.2. Agar Difüzyon Yöntemi

Antimikrobik duyarlılığın belirlenmesinde agar difüzyon yöntemi yerleşmiş bir tekniktir. Bu yöntem, yukarıda bahsedilen 4 farklı referans suşu ile MHA plakları üzerinde gerçekleştirilmiştir. Her plakta 200 µg bor bulunacak şekilde belli miktarda B-HAp (eşdeğer miktarda HAp) agar besiyerine karıştırılmıştır ve ardından steril pamuklu eküvyon ile ekim gerçekleştirilmiştir. Antibiyotik içeren diskler steril bir pens yardımıyla agar yüzeyine yerleştirilmiş ve inhibisyon zon çaplarındaki değişimler değerlendirilerek sinerjik etkiler incelenmiştir.

3.8.3. Gradiyent Testi

Sinerjik etkilerin incelenmesi için MHA plağa 200 µg bor bulunacak şekilde belli miktarda B-HAp (eşdeğer miktarda HAp) agar besiyerine karıştırılmıştır ve ardından steril pamuklu eküvyon ile ekim gerçekleştirilmiştir Daha sonra, şeritlerde (Bio-Merieux) bulunan antibiyotiklerle B-HAp'ın sinerjik etkisi incelenmiştir. İşlem sonrasında (16-18 sa) oluşan elipsdeki genişlemeye bakılarak MİK değerleri standart değerler ile karşılaştırılmıştır.

3.9. Hücre Kültür Çalışmaları

Sunulan çalışmada AMX yüklü PLGA/B-HAp/kitosan nanokompozit doku iskelesi sisteminin kemik doku mühendisliğinde kullanımının değerlendirilmesi amacıyla fare kemik öncül hücre hattı (MC3T3-E1) kullanılarak *in-vitro* koşullarda hücre kültür çalışmaları gerçekleştirilmiştir. Çalışmalar 3 paralel şeklinde gerçekleştirilmiştir.

3.9.1. MC3T3-E1 Hücre Kültürü

MC3T3-E1 hücreleri %10 (v/v) FBS, %1 (v/v) L-glutamin ve %1 (v/v) penisilin/streptomisin içeren α-MEM besi ortamı (büyüme ortamı) içerisinde 75 cm^2'lik hücre kültür flasklarına ekilerek %5 CO_2 ve %95 nem içeren 37˚C'deki etüvde (Heraus Instruments, Almanya) kültüre edilmiştir. Kültüre edilen hücreler her 4 günde bir pasajlanarak hemositometrik hücre sayımı yapılmış ve çalışma için gerekli olan hücre sayısı elde edilene kadar kültüre devam edilmiştir.

Sunulan tez kapsamında bakteriyel çalışmalarda kullanılan antibakteriyel disklerin boyutları 6 mm x 1 mm olduğundan dolayı hücre kültür çalışmaları için üretilen nanokompozit doku iskeleleri de 6 mm x 1 mm boyutlarında kesilmiştir. Doku iskelelerinin sterilizasyonu etilen oksit gazı (Point Medical-Teknomar Ltd. Şti., Ostim, Ankara) ile yapılmıştır. Etilen oksit ile sterilizasyonun ardından, iskeleler laminer akış kabin (Bioair, Type, İtalya) içerisine alınarak 24-gözlü polistiren hücre kültür kaplarının (TCPS, Orange Scientific, Belçika) her bir gözünde birer adet olacak şekilde yerleştirilmiştir. Ardından, etilen oksit gazının toksik etkisini uzaklaştırmak için iskeleler steril PBS ile yıkanmıştır. Daha sonra, her bir iskeleye büyüme ortamından 100'er µL emdirilmiştir. Serum proteinleri ile iskelelerin etkileşmeleri için iskeleler %5 CO_2 ve %95 nem içeren 37˚C'deki etüvde 2 sa inkübe edilmiştir. Ardından her bir iskeleye 25 µL hücre süspansiyonu, hücre yoğunluğu $1x10^6$ hücre/iskele olacak şekilde, emdirilerek hücre ekimi gerçekleştirilmiştir. Sonrasında iskeleler üzerine 100'er µL besi ortamı eklenerek 2.5 sa CO_2 inkübatöründe bekletilmiştir. Bu süre sonunda iskeleler üzerine 900 µL daha besi ortamı eklenerek inkübatöre tekrar yerleştirilmiştir. Kültür süresince iskelelerin içinde bulunduğu ortam 2-3 günde bir taze büyüme ortamı ile değiştirilmiştir.

3.9.2. Toksisite Çalışmaları

AMX yüklü PLGA nanopartiküllerin (m_{PLGA}/m_{AMX}, w/w: 15) farklı miktarlarının hücreler üzerindeki etkisini incelemek amacı ile B-HAp miktarları sabit tutularak 4 farklı grup nanokompozit doku iskelesi hazırlanmıştır. Hazırlanan doku iskelesi grupları aşağıda verilmiştir.

I. B-HAp/Kitosan doku iskelesi: 0.2 mL kitosan çözeltisine 8 mg B-HAp eklenerek hazırlanmıştır.
II. AMX-PLGA (0.5 mg)/B-HAp/Kitosan doku iskelesi: 0.2 mL kitosan çözeltisine 8 mg B-HAp ve AMX yüklü 0.5 mg PLGA nanopartikül eklenerek hazırlanmıştır.
III. AMX-PLGA (1 mg)/B-HAp/Kitosan doku iskelesi: 0.2 mL kitosan çözeltisine 8 mg B-HAp ve AMX yüklü 1 mg PLGA nanopartikül eklenerek hazırlanmıştır.
IV. AMX-PLGA (2.5 mg)/B-HAp/Kitosan doku iskelesi: 0.2 mL kitosan çözeltisine 8 mg B-HAp ve AMX yüklü 2.5 mg PLGA nanopartikül eklenerek hazırlanmıştır.

Hazırlanan bu iskelelerde kültüre edilen MC3T3-E1 hücreleri ile 7 gün süren hücre kültür çalışmaları gerçekleştirilmiştir. Hücrelerin canlılığı 1., 3. ve 7. günlerde MTT analizi ile belirlenmiştir.

Hücrelerin mitokondriyal aktiviteleri MTT analizi ile kantitatif olarak tayin edilmektedir. Analiz günlerinde, 24-gözlü polistiren hücre kültür kaplarındaki iskeleler üzerinden kültür ortamı uzaklaştırılarak her bir göze 600 µL serum içermeyen α-MEM ortamı ve ardından 60 µL MTT boyası eklenmiş ve 3 sa boyunca 37°C'deki etüvde inkübe edilmiştir. Böylece, canlı hücrelerin mitokondrileri tarafından tetrazolyum bileşeni indirgenmiş ve formazan kristallerine dönüştürülmüştür. Bütün bu işlemler, karanlık ortamda ve laminer akış kabini içerisinde gerçekleştirilmiştir. Üç saatin sonunda, her bir gözdeki MTT içeren ortam uzaklaştırılmış ve ardından oluşan formazan kristallerinin çözünmesi için doku iskeleleri parçalanarak her bir göze 0.04 M HCl içeren 400 µL izopropanol çözeltisi eklenmiştir. Formazan kristallerinin tamamı çözündükten sonra mor renkli bir çözelti elde edilmiştir. Bu çözeltiden 200 µL alınarak 96-gözlü polistiren hücre kültür kabına aktarılmıştır. Ardından, 690 nm dalga boyu referans alınarak 570 nm dalga boyunda mikroplaka okuyucu (Oasys UVM 340, Avusturya) ile analiz gerçekleştirilmiştir.

Analiz sonucunda, canlı hücre sayısı ile doğru orantılı olan optik yoğunluklar belirlenmiştir.

3.10. İstatistiksel Analiz

Sunulan tez çalışması kapsamında sonuçlar “GraphPad Software Instat” programı ile istatistiksel olarak değerlendirilmiştir. Elde edilen veriler üç paralel için “*ortalama* $\pm$ *standart sapma”* olarak hesaplanmıştır ve sunulmuştur. Farklı deney grupları istatistiksel açıdan karşılaştırılarak p-değerinin 0.05’ten küçük olduğu durumlar anlamlı olarak kabul edilmiştir.

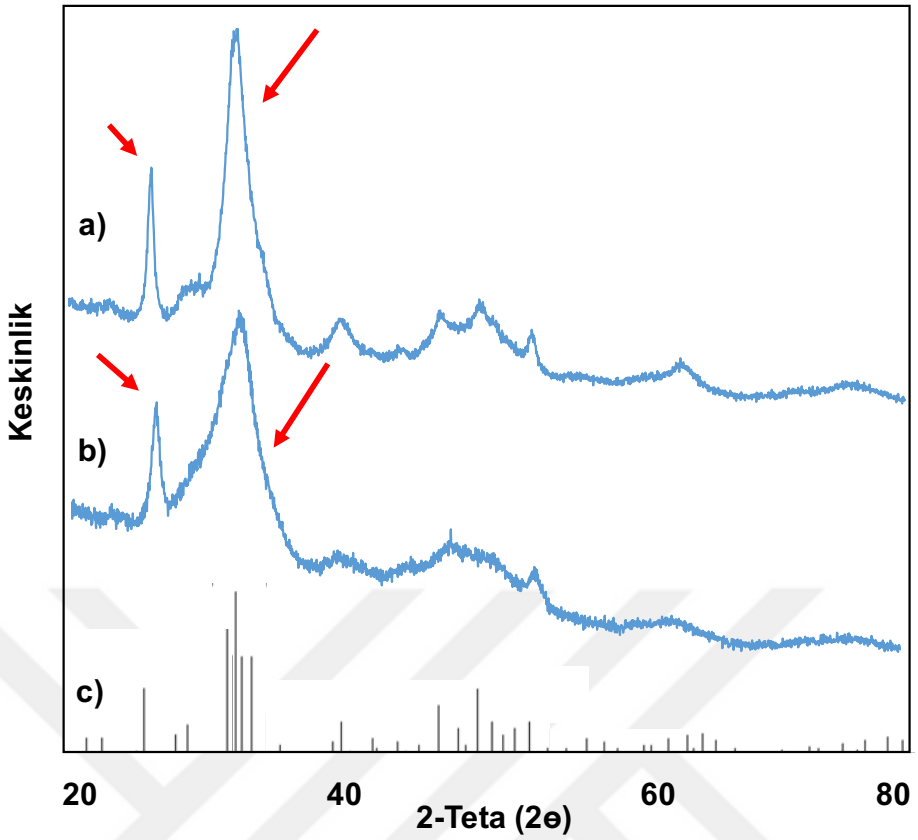
4. SONUÇLAR VE TARTIŞMA

Çalışmanın bu kısmında, **"Deneysel Çalışmalar"** bölümünde anlatılan çalışmaların sonuçları ve değerlendirilmesi yapılmaktadır. İlk olarak grubumuz tarafından yapılan çalışmalar sonucunda literatüre kazandırılmış olan **mikrodalga destekli biyomimetik yöntem** ile HAp ve B-HAp üretilmiştir. Ardından, PLGA nanopartiküllerin ve nanokompozit doku iskelelerinin üretimi ve karakterizasyon çalışmalarının sonuçları tartışılmıştır. İlerleyen bölümde, PLGA nanopartiküllerden ve nanokompozit doku iskelelerinden AMX salım profilleri belirlenerek salım kinetikleri incelenmiştir. Son olarak ise, 4 farklı bakteri suşu ile yapılan bakteriyolojik çalışmaların ve MC3T3-E1 fare kemik öncül hücreleri ile yapılan hücre kültür çalışmalarının sonuçları verilmiştir. Bakteriyel çalışmaların sonuçları hücre kültürü çalışmalarının sonuçları ile birlikte değerlendirilerek bor katkılı nanokompozit doku iskelelerinin bir beta-laktam antibiyotiği olan AMX ile sinerjik etkisi tartışılmıştır.

4.1. Biyomimetik Yöntemle HAp ve B-HAp Üretimi ve Karakterizasyonu

Literatürde hidroksiapatit üretimi için pek çok yöntem yer almaktadır. Fakat ısıl işlem gerektirmediği ve biyoaktivitesi yüksek apatit yapılar oluşturduğu için çalışmalarda genellikle biyomimetik yöntem tercih edilmektedir [130]. Grubumuz tarafından daha önce yapılan çalışmalarda biyomimetik yöntemle hidroksiapatit ve bor katkılı hidroksiapatit üretimi için 10xSBF ve 10xB-SBF çözeltileri mikrodalga desteği ile çöktürülmüştür [88, 93]. Böylece, yüksek doygunluk derecesine sahip SBF çözeltileri kısa sürede çöktürülerek apatit yapılar elde edilmiştir. Pek çok avantaja sahip olmasından dolayı tez kapsamında da mikrodalga destekli biyomimetik yöntem kullanılarak HAp ve B-HAp üretimi gerçekleştirilmiştir.

Çalışma kapsamında üretilen HAp ve B-HAp'ın XRD analizi sonuçları Şekil 4.1'de sunulmaktadır. Hidroksiapatit yapısına ait karakteristik pikler 26° ve 32°de yer almaktadır [131]. Şekil 4.1'deki spektrumlar incelendiğinde bu pikler, çalışma kapsamında üretilen HAp ve BHAp yapılarının her ikisinde de görülmüştür. Ayrıca, yapıya bor katılımının farklı fazlar (dikalsiyum fosfat anhidröz, DCP; β-trikalsiyum fosfat, β-TCP; dikalsiyum fosfat dihidrat, DCDP vb.) oluşturmadığı da belirlenmiştir.



Şekil 4.1: Çalışma kapsamında üretilen a) HAp b) B-HAp ve c) ICDD'den (Kırınım Verileri için Uluslararası Merkez) alınan saf HAp örneklerinin XRD spektrumları.

Şekil 4.1'deki XRD spektrumları incelendiğinde ICDD'den alınan saf HAp örneklerine ait piklerin çok keskin olduğu görülmektedir. Bu durum saf hidroksiapatitin kristal yapıda olduğunu göstermektedir. Çalışma kapsamında üretilen HAp ve B-HAp yapılarına ait piklerin ise yayvan olduğu görülmektedir. Üretilen HAp ve B-HAp yapılarında görülen pik keskinliğinin azalması ve pik genişliğinin artması doğal kemik yapısındaki HAp'a benzerlik gösteren özelliklerdir [132]. Dolayısıyla, bu apatitlerin kemik benzeri yapılar olduğu söylenebilmektedir.

Grubumuz tarafından daha önce yapılan bir çalışmada ilk kez biyomimetik yöntemle B-HAp üretimi gerçekleştirilmiştir [88]. Borun, çoğunlukla BO_3^{3-} olarak PO_4^{3-} iyonları ile yer değiştirmesi sonucu yapıya katıldığı belirtilmiştir. Ayrıca, ICP-OES (endüktif eşleşmiş plazma optik emisyon spektrometresi) ile B-HAp yapısında bulunan bor miktarının ağırlıkça %1.15±0.11 olduğu rapor edilmiştir.

4.2. PLGA Nanopartiküllerin Hazırlanması

AMX, antibiyotiği hidrofilik yapıda bir beta-laktam grubu antibiyotik olup, 25°C'de sudaki çözünürlüğü 5 mg/mL'dir [133]. AMX'in vücut içerisinde salım süresini artırmak için taşıyıcı partiküller ile birlikte kullanımı düşünülmüştür. Çalışma kapsamında, PLGA nanopartiküllere AMX yüklemesi yapılarak B-HAp/kitosan nanokompozit doku iskelelerinden kontrollü ve uzun süreli salımının incelenmesi amaçlanmıştır.

Çalışma kapsamında taşıyıcı nanopartiküllerin hazırlanması için uygun özelliklerinden dolayı, FDA (Food and Drug Administration) onaylı bir kopolimer olan PLGA kullanılmıştır. PLGA'nın PLA; PGA oranları farklı kopolimerleri bulunmaktadır. PLGA'nın özellikleri yapısında bulunan PLA:PGA bileşimine bağlı olarak değişmektedir. PLA yapıya hidrofobik özellik kazandırırken, PGA ise yapıya hidrofobik özellik kazandırmaktadır. Çalışmada hidrofilik bir ajan olan AMX için, PLGA'nın (PLA:PGA) 50:50 bileşimine sahip kopolimeri kullanılmıştır.

Nanopartikül üretiminde genellikle emülsiyon hazırlama-çözücü buharlaştırma yöntemi kullanılmaktadır. Bu yöntem, kolay olması, partikül boyutunun ayarlanabilir olması ve farklı maddelere uygulanabilir olması gibi avantajlarından dolayı çalışmalarda sıklıkla tercih edilmektedir [134]. Fakat, bu yöntem hidrofilik ajanlarla birlikte kullanıldığında düşük verimler elde edilmektedir [117]. Bu nedenle, emülsiyon hazırlama-çözücü buharlaştırma yönteminin geliştirilmesi ile ikili-emülsiyon hazırlama-çözücü buharlaştırma yöntemi önerilmiştir. Çalışma kapsamında boş PLGA nanopartiküllerin üretiminde emülsiyon hazırlama-çözücü buharlaştırma yöntemi kullanılırken [29], AMX yüklü PLGA nanopartiküllerin üretiminde ise, AMX hidrofilik bir ilaç olduğundan dolayı, ikili-emülsiyon hazırlama-çözücü buharlaştırma yöntemi kullanılmıştır. İkili emülsiyon hazırlama-çözücü buharlaştırma yönteminde polimer etil asetat gibi organik bir çözücüde çözünerek organik faz oluşturulmaktadır. Stabilizatör içeren birinci sulu faz ve hidrofilik ajanı içeren ikinci sulu faz oluşturulduktan sonra, ikinci sulu faz organik faza eklenerek birinci emülsiyon hazırlanmaktadır. Ardından, birinci emülsiyon birinci sulu faza eklenerek ikinci emülsiyon hazırlanmaktadır. Oluşturulan ikinci emülsiyon sürekli karıştırılarak organik çözücünün buharlaşması ve yapıdan uzaklaşması sağlanmaktadır.

Partikül boyutunu küçültmek ve homojen olarak dağılımını sağlamak için oluşturulan emülsiyonlar yüksek hızlı homojenizatör ile karıştırılmaktadır. Homojenizatörün hızının artması patiküllerin kayma gerilimini arttırarak boyutlarını küçültmekte ve dolayısıyla küçük boyutlu nanopartiküllerin oluşumunu sağlamaktadır [136, 137]. Bu bilgiler ışığında, çalışma kapsamında yüksek hızlı homojenizatör kulanılarak hem boş PLGA nanopartikül emülsiyonu hem de AMX yüklü PLGA nanopartikül emülsiyonu 15 000 rpm'de 7 dk homojenize edilmiş ve AMX yüklü nanopartiküller üretilmiştir.

Homojen partikül boyutu dağılımına sahip nanopartiküllerin üretimi için PVA ve DMAB gibi stabilizatör ajanlar kullanılmaktadır. Stabilizatörler biyolojik sistemlerde toksik etkiye sebep olduklarından dolayı, işlem sonrası partikül yüzeyinden tamamen uzaklaştırılması gerekmektedir. İlgili literatür incelendiğinde, DMAB stabilizatörünün kullanıldığı çalışmalarda partikül boyut dağılımının dar bir aralıkta kaldığı ve partikül boyutunun küçüldüğü görülmektedir [134]. Bu nedenle, yapılan çalışmada stabilizatör olarak DMAB kullanılmıştır.

İlgili literatürde, AMX yüklü nanopartiküllerin üretimi ile ilgili bir çalışmaya rastlanmamıştır. Ancak, Xu ve ark. yaptıkları bir çalışmada AMX yüklü PLGA mikroküreler üretmişlerdir [128]. Bu amaçla, ikili-emülsiyon hazırlama-çözücü buharlaştırma (w/o/w) ve katı/yağ/su-çözücü buharlaştırma (s/o/w) yöntemlerini farklı stabilizatörler ile kullanmışlardır. Çalışma sonucunda ortamdaki ilaç miktarı ile partiküle enkapsüle edilen ilaç miktarı arasında doğrusal bir ilişki bulunamamıştır.

Tez çalışması kapsamında PLGA ve DMAB sabit miktarlarda kullanılırken AMX miktarları değiştirilerek iki farklı derişimde ilaçlı sulu faz (w2) hazırlanmıştır (Çizelge 4.1). Bu derişimlerden ilki, AMX'in 25°C'de sudaki çözünürlük değeri (5 mg/mL) dikkate alınarak belirlenen 14 mM'dır (m_{PLGA}/m_{AMX}, w/w: 20). Çalışma sırasında 7 mg AMX'in DMAB içeren 1 mL sulu fazda çözündüğü gözlenmiştir. Bu bilgi dikkate alınarak belirlenen diğer derişim değeri ise 19 mM'dır (m_{PLGA}/m_{AMX}, w/w: 15).

Çizelge 4.1: Nanopartikül üretimi için kullanılan parametreler.

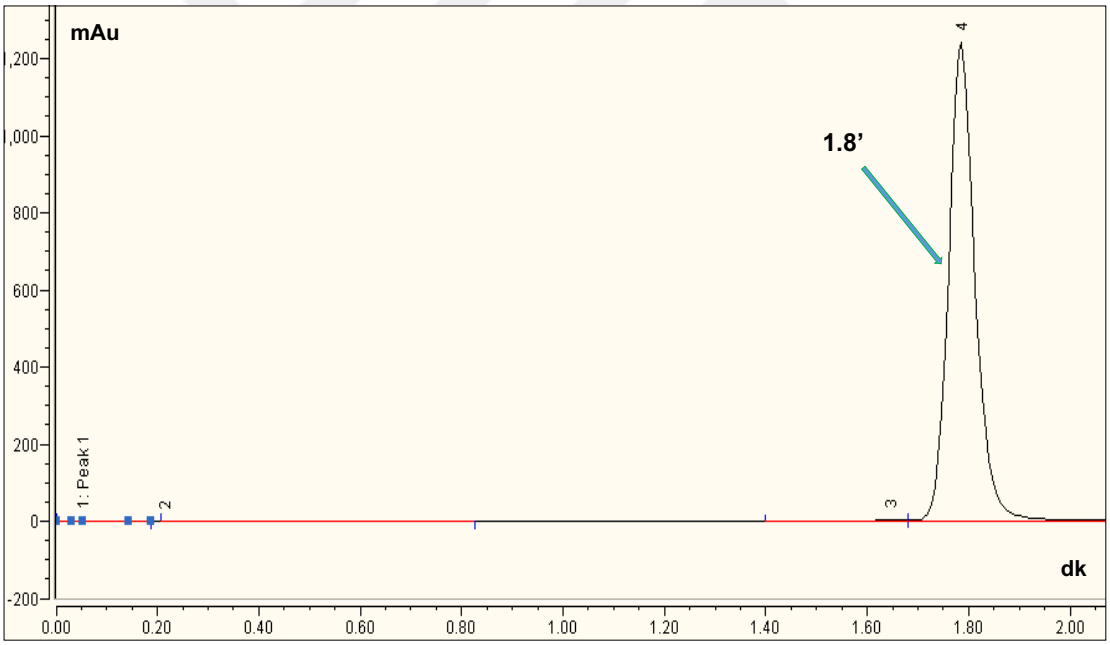
Deney No.	m_{PLGA}/m_{AMX} (w/w)	% PLGA (w/v)	% DMAB (w/v)
1	20	2	1
2	15	2	1

4.3. PLGA Nanopartiküllerin Karakterizasyonu

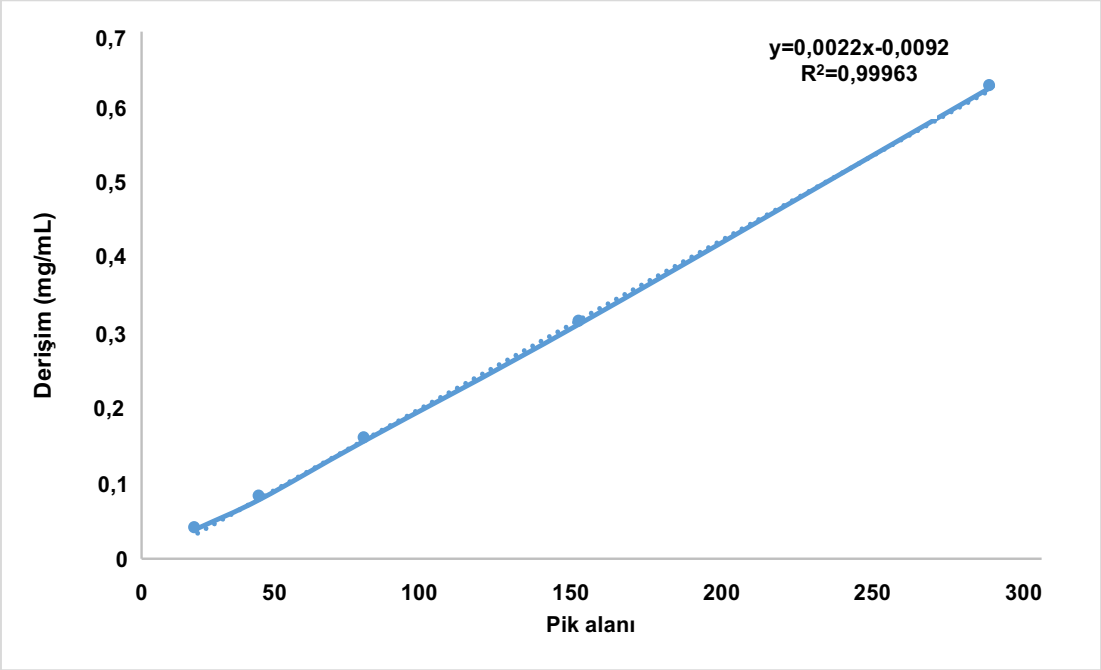
4.3.1. AMX Yüklü PLGA Nanopartiküllerin Enkapsülasyon Veriminin Belirlenmesi

AMX yüklü PLGA nanopartikül üretimi sırasında ortamda bulunan AMX'in ne kadarının PLGA nanopartiküller tarafından enkapsüle edildiğini belirlemek için **Bölüm 3.4.1**'de ayrıntılı olarak bahsedilen yöntem uygulanmıştır. Bu yöntemde, partiküller DCM içerisinde çözdürülerek enkapsüle olan AMX'in ortama salımı sağlanmıştır. Ardından HPLC sistemi kullanılarak pik alanları ölçülmüştür (AMX'in HPLC kromatogramı Şekil 4.2'de sunulmuştur). Şekil 4.3'te sunulan kalibrasyon grafiği yardımı ile pik alanından derişime geçiş yapılmıştır. Ardından Eşitlik 4.1 kullanılarak enkapsülasyon verimi hesaplanmıştır.

Enkapsülasyon verimi (%) = (Yüklenen AMX miktarı (mg)) / (Başlangıçtaki AMX miktarı (mg)) x 100 (4.1)



Şekil 4.2: AMX'in HPLC kromatogramı (dalga boyu: 230 nm; mobil fazlar: asetonitril:%0.1 (v/v)'lik orto-fosforik asit karışımı (60:40 oranında)).



Şekil 4.3: AMX'in kalibrasyon grafiği.

AMX yüklü PLGA nanopartiküllerin yüzde enkapsülasyon verimleri Çizelge 4.2'de sunulmaktadır. Xu ve ark.tarafından yapılan AMX yüklü mikrokürelerin üretimi ile ilgili çalışmada, w/o/w yöntemi ile stabilizatör olarak dioktil sodyum sülfosuksinat (DSS) kullanıldığında AMX'in enkapsülasyon verimi %35.3 olarak bulunmuştur [128]. Xu ve Czernuszka tarafından yapılan başka bir çalışmada ise hidroksiapatit kaplı PLGA mikrokürelerden AMX salımı incelenmiştir [137]. İlk olarak AMX yüklemesi ile PLGA mikroküreler negatif yüklü hale getirilmiş ardından da hidroksiapatit ile kaplanmıştır. Katı/yağ/su-çözücü buharlaştırma (s/o/w) yöntemi ve SDS (sodyum dodesil sülfat) stabilizatörü kullanılarak PLGA mikrokürelere AMX yüklemesi gerçekleştirilmiş ve enkapsülasyon verimi %40.6 olarak bulunmuştur. Sonuç olarak, tez çalışmasında elde edilen yüzde enkapsülasyon verimleri literatürle benzerlik göstermektedir.

Çizelge 4.2: AMX yüklü PLGA nanopartiküllerin enkapsülasyon verimleri.

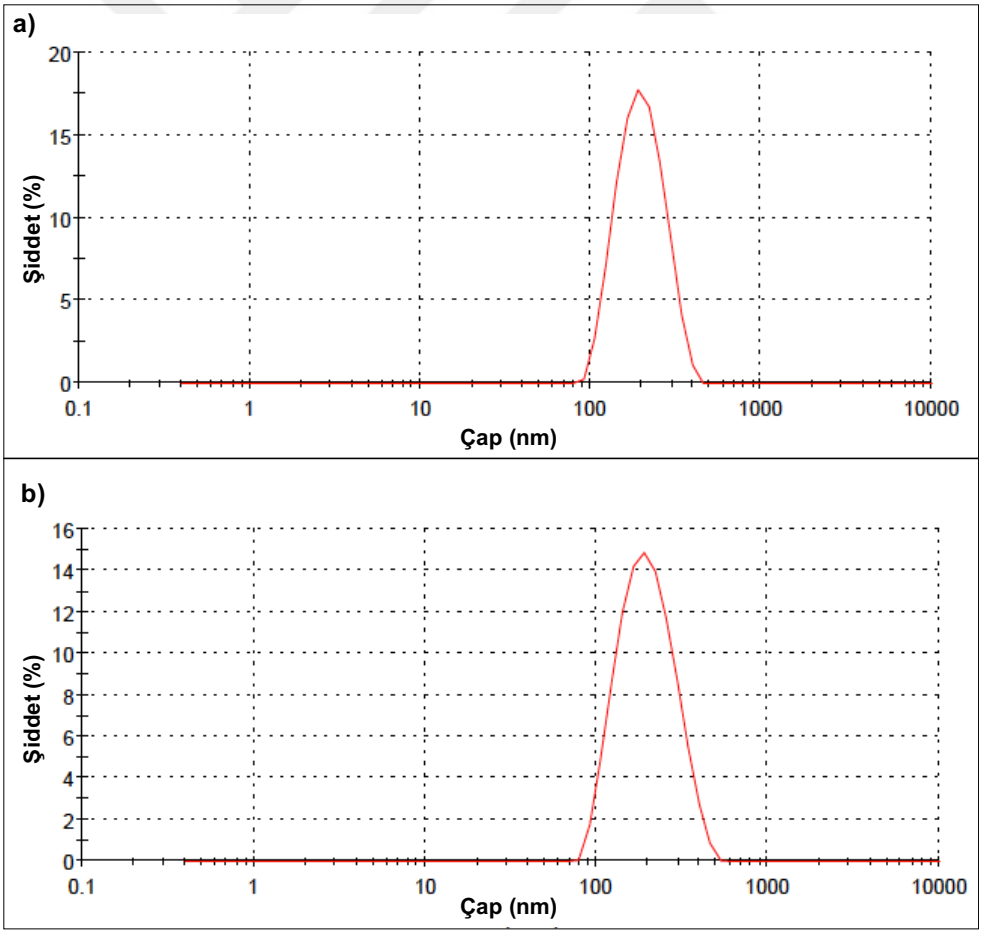
İlaçlı Sulu Faz Derişimi (mM)	m_{PLGA}/m_{AMX} (w/w)	Enkapsülasyon Verimi (%)
14	20	30.3 ± 4.04
19	15	36.5 ± 0.71

Çizelge 4.2'de görüldüğü gibi ilaçlı sulu faz derişimi 19 mM (m_{PLGA}/m_{AMX}, w/w: 15) olan AMX yüklü PLGA nanopartiküllerin yüzde enkapsülasyon verimleri daha yüksek bulunmuştur. Bu nedenle, çalışmaya 19 mM (m_{PLGA}/m_{AMX}, w/w: 15) derişime sahip ilaçlı sulu faz kullanılarak devam edilmiştir.

4.3.2. Boş ve AMX Yüklü PLGA Partiküllerin Boy ve Boy Dağılımı

Kontrollü salım sistemlerinde ilacın salımı ve ilacın hücreler tarafından alımı partikül boyutu ile doğrudan ilişkilidir. Bu nedenle, partikül boyutu nanopartiküler sistem tasarımı açısından önemli bir parametredir [138].

Emülsiyon hazırlama-çözücü buharlaştırma yöntemi ile üretilen boş PLGA nanopartiküllerin ve ikili-emülsiyon hazırlama-çözücü buharlaştırma yöntemi ile üretilen AMX yüklü PLGA nanopartiküllerin boy ve boy dağılımlarını belirlemek için "Dinamik Işık Saçılım (DLS) Analizi" gerçekleştirilmiştir. Analiz sonuçları Şekil 4.4'te sunulmuştur.



Şekil 4.4: DLS analiz sonuçları a) boş PLGA nanopartiküllerin boy ve boy dağılımına ait grafik, b) AMX yüklü PLGA nanopartiküllerin (m_{PLGA}/m_{AMX}, w/w: 15) boy ve boy dağılımı.

Boş PLGA nanopartiküllerin ve AMX yüklü PLGA nanopartiküllerin ortalama çapları ve çoklu dağılım endeksleri Şekil 4.4'te sunulan DLS analiz sonuçlarına göre belirlenerek Çizelge 4.3'te sunulmuştur.

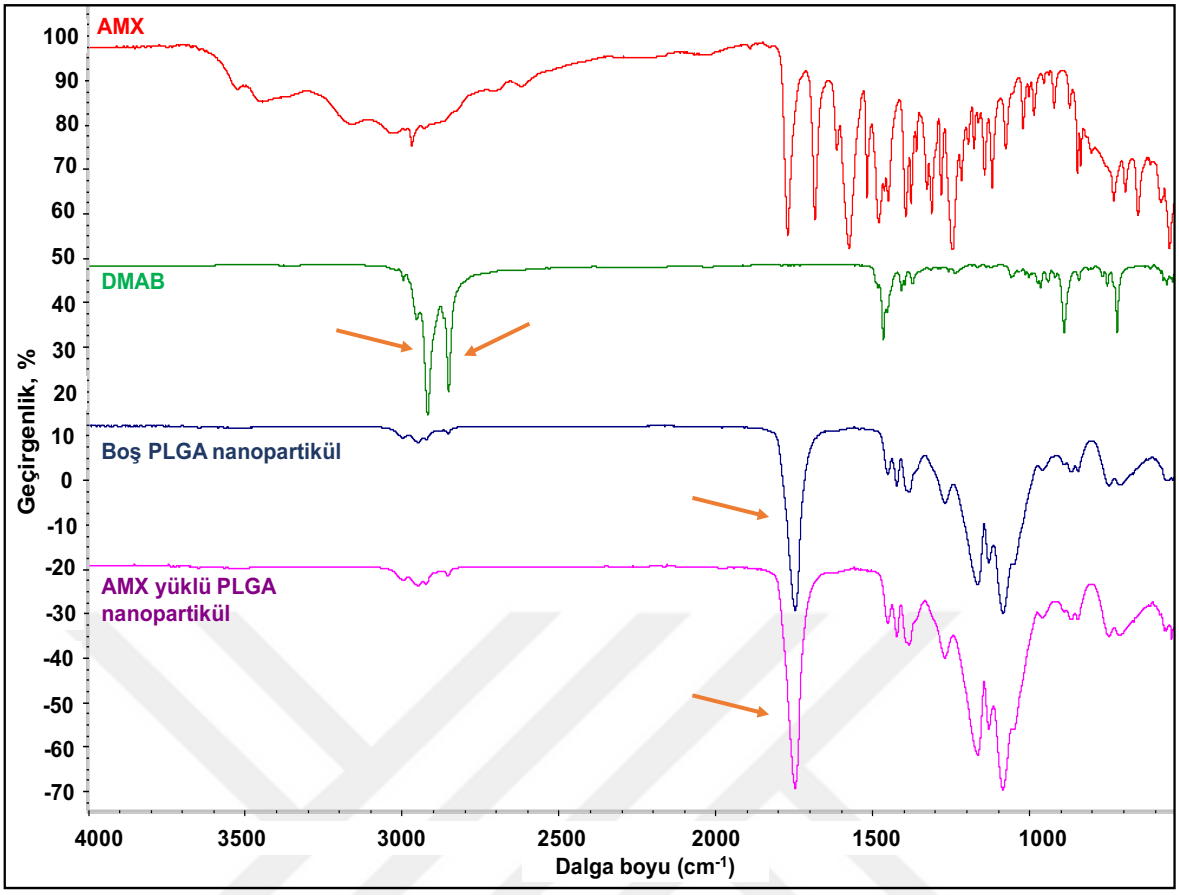
Çizelge 4.3: Çalışma kapsamında üretilen boş PLGA nanopartiküllerin ve AMX yüklü PLGA nanopartiküllerin (m_{PLGA}/m_{AMX}, w/w: 15) ortalama çapları ve çoklu dağılım endeksleri.

Nanopartikül	Ortalama Partikül Çapı (nm)	Çoklu Dağılım Endeksi (PDI)
Boş PLGA	187.6 ± 61.95	0.068
AMX yüklü PLGA	182.4 ± 75.87	0.106

Nanopartiküllerin boy dağılımları PDI değeri ile gösterilmektedir. PDI değerinin sıfıra yakın olması eş boy dağılımına sahip partiküllerin üretildiğini göstermektedir [29]. Çizelge 4.3'teki PDI değerleri incelendiğinde, çalışma kapsamında üretilen her iki partikül çeşidinin de oldukça uniform boy dağılımına sahip olduğu söylenebilmektedir.

4.3.3. FTIR Analizi

Çalışma kapsamında üretilen AMX yüklü PLGA nanopartiküllerin ve boş PLGA nanopartiküllerin kimyasal yapılarının incelenebilmesi için 400-4000 cm^{-1} dalga boyu aralığında FTIR analizi gerçekleştirilmiştir. Boş PLGA nanopartiküllere, AMX'e, AMX yüklü PLGA nanopartiküllere ve nanopartikül üretim aşamasında stabilizatör olarak kullanılan DMAB'a ait FTIR spektrumları Şekil 4.5'te sunulmuştur.



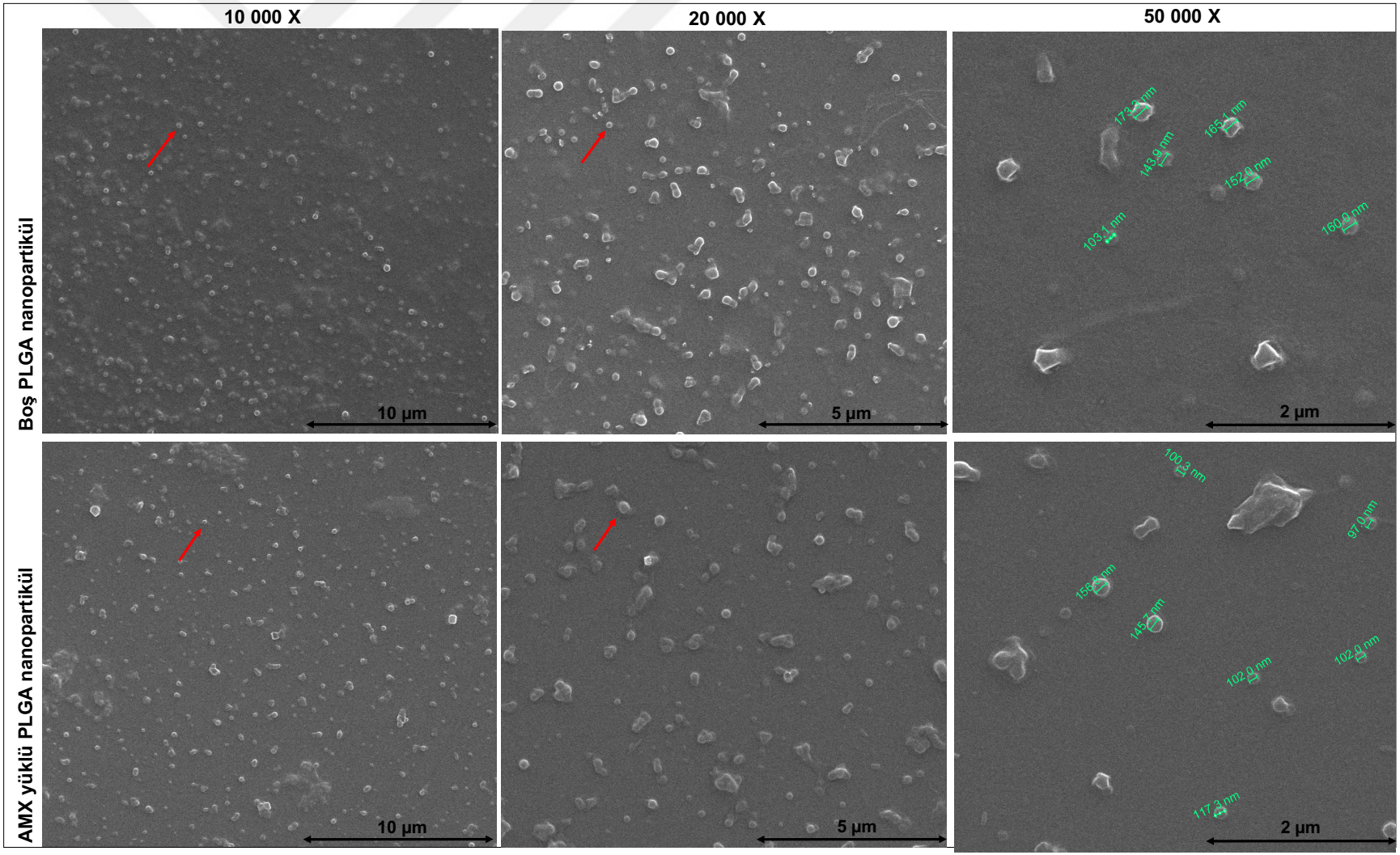
Şekil 4.5: AMX'e, DMAB stabilizatörüne, boş PLGA ve AMX yüklü PLGA nanopartiküllere(m_{PLGA}/m_{AMX}, w/w: 15) ait FTIR spektrumları.

İlgili literatürde PLGA kopolimerine özgü FTIR pikinin 1760 cm^{-1} dalga boyundaki C=O piki olduğu belirtilmektedir [139]. Şekil 4.5'te yer alan spektrumlar incelendiğinde, PLGA kopolimerine özgü pikin boş ve AMX yüklü PLGA nanopartiküllere ait spektrumlarda bulunduğu gözlenerek PLGA kopolimerinin kimyasal yapısının partikül üretim aşamasında herhangi bir değişime uğramadığı belirlenmiştir. Nanopartikül üretim aşamasında stabilizatör olarak kullanılan DMAB'a özgü FTIR piki olan 2835-2940 cm^{-1} dalga boylarındaki alifatik C-H piklerinin [140] boş ve AMX yüklü PLGA nanopartiküllere ait spektrumlarda bulunmadığı gözlenmiştir. Dolayısıyla, toksik etkiye sahip DMAB stabilizatörünün üretim sonrası uygulanan yıkama ile nanopartiküllerden tamamen uzaklaşıp yapıya katılmadığı belirlenmiştir. PLGA nanopartiküllere düşük miktarda AMX yüklendiği için AMX yüklü PLGA nanopartiküllerdeki AMX varlığı FTIR analizi ile belirlenememiştir.

4.3.4. SEM Analizi

Çalışma kapsamında üretilen boş PLGA nanopartiküllerin ve AMX yüklü PLGA nanopartiküllerin yüzey morfolojilerinin incelenebilmesi, nanopartiküllerin boy dağılımlarının ve çaplarının belirlenebilmesi için SEM analizi gerçekleştirilmiştir. Boş ve AMX yüklü PLGA nanopartiküllere ait farklı büyütmelerdeki SEM görüntüleri Şekil 4.6'da sunulmuştur.

SEM görüntüleri incelendiğinde boş ve AMX yüklü PLGA nanopartiküllerin küresel morfolojiye sahip oldukları, fakat homojen olarak dağılamadıklarından dolayı bazı bölgelerde yığın oluşturdukları gözlenmiştir. Ayrıca, PLGA partiküllere AMX yüklenmesi sonucu partikül çapında bir miktar artış olduğu belirlenerek boş ve AMX yüklü PLGA nanopartiküllerin boyutlarının Çizelge 4.3'te yer alan sonuçları desteklediği gözlenmiştir.



Şekil 4.6: Boş PLGA nanopartiküllere ve AMX yüklü PLGA nanopartiküllere (m_{PLGA}/m_{AMX}, w/w: 15) ait farklı büyütmelerde SEM görüntüleri.

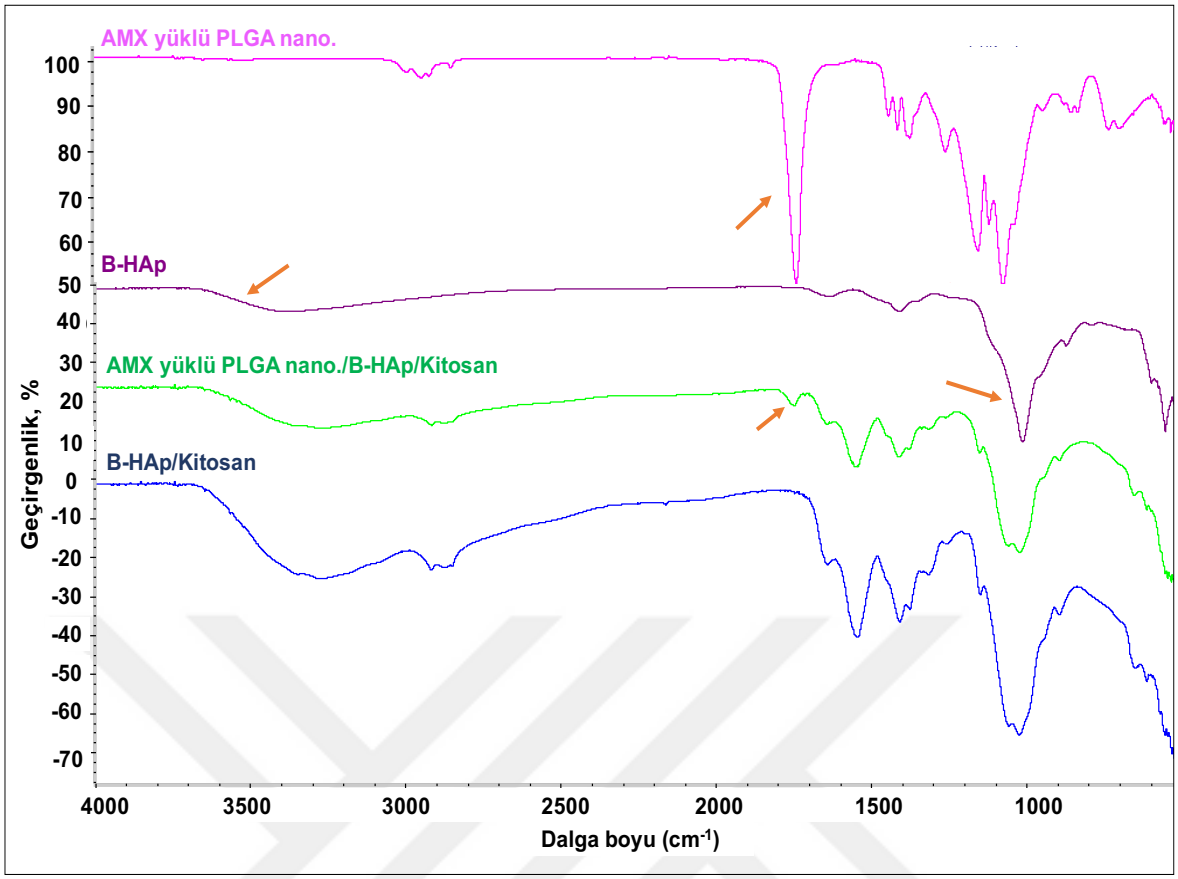
4.4. Doku İskelelerinin Üretimi

Kitosan bazlı doku iskeleleri dondurarak-kurutma yöntemi ile üretilmiştir. Dondurarak-kurutma yönteminin temel prensibi, dondurma esnasında oluşan buz kristallerinin liyofilizasyon ile gaz haline geçerek uzaklaşmasını sağlamak ve böylece içsel bağlantılı, gözenekli yapılar elde etmektir [129]. Bu yöntem ekonomik olması ve üretim koşullarının kolay olması gibi avantajlarından dolayı doku iskelelerinin üretiminde sıklıkla tercih edilmektedir. Doku iskelelerinin üretimi için, grubumuz tarafından önceden belirlenen koşullar kullanılmıştır [129]. İlgili literatürde partiküllerin doku iskelelerine emdirilerek yüklendiği durumlarda, partiküllerin doku iskelesinin iç kısımlarına homojen olarak dağılmadığı, yoğun olarak üst kısımlarda toplandıkları belirtilmektedir [29]. Bu nedenle, çalışma kapsamında hem AMX yüklü PLGA nanopartiküllerinin hem de HAp ve B-HAp nanopartiküllerinin doku iskelesi yapım aşamasında kitosan jel içerisine eklenerek yapıya katılması ile nanokompozit doku iskelelerinin üretimine karar verilmiştir. Çalışma kapsamında B-HAp ile AMX'in sinerjik etkisinin daha iyi değerlendirilmesi amacı ile AMX yüklü PLGA nanopartikül/B-HAp/kitosan doku iskelelerine ek olarak B-HAp/kitosan ve AMX yüklü PLGA nanopartikül/HAp/kitosan doku iskeleleri de üretilmiştir.

4.5. Nanokompozit Doku İskelelerinin Karakterizasyonu

4.5.1. FTIR Analizi

AMX yüklü PLGA nanopartikül içeren B-HAp/kitosan nanokompozit doku iskelelerinde B-HAp ve AMX yüklü PLGA nanopartiküllerin varlığını kalitatif olarak belirleyebilmek için FTIR analizi gerçekleştirilmiştir. Analiz sonucunda elde edilen AMX yüklü PLGA nanopartiküllere, B-HAp'a ve nanokompozit doku iskelelerine ait spektrumlar Şekil 4.7'de sunulmuştur.

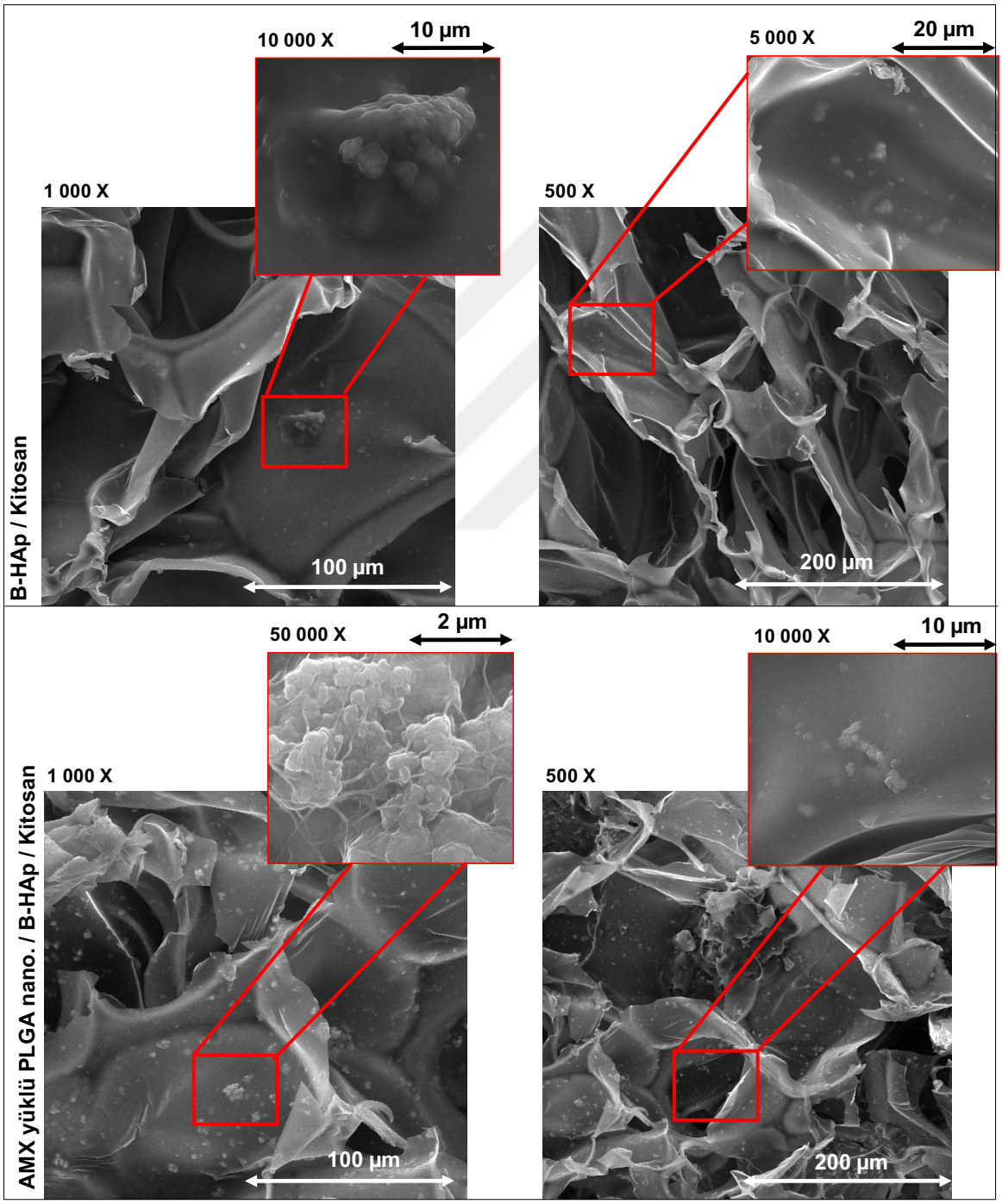


Şekil 4.7: AMX yüklü PLGA nanopartiküllerine (m_{PLGA}/m_{AMX}, w/w: 15), B-HAp nanopartiküllerine, AMX yüklü PLGA nanopartikül/B-HAp/kitosan doku iskelelerine ve B-HAp/kitosan doku iskelelerine ait FTIR spektrumları.

AMX yüklü PLGA nanopartiküllere ait spektrumda yer alan ve PLGA kopolimerine özgü olan FTIR pikinin 1760 cm^{-1} dalga boyundaki C=O pikinin AMX yüklü PLGA nanopartikül/B-HAp/kitosan nanokompozit doku iskelelerine ait spektrumda da bulunduğu gözlenmiştir. Ancak, AMX yüklü PLGA nanopartiküllerinin kitosan doku iskeleleri ile kullanılması ile birlikte pik şiddetinde azalma gözlenmiştir. İlgili literatürde, PLGA'nın yapısında bulunan $COOH^-$ grupları ile kitosanın yapısında bulunan NH_2^- grupları arasında elektrostatik bir etkileşim olduğu, bunun sonucunda da C=O pik şiddetinin azaldığı belirtilmiştir [141]. B-HAp nanopartiküllere ait spektrum incelendiğinde hidroksiapatite özgü bir pik olan 1015 cm^{-1} dalga boyundaki PO_4^{3-} pikinin [88] hem B-HAp/kitosan nanokompozit doku iskelelerinde hem de AMX yüklü PLGA nanopartikül/B-HAp/kitosan nanokompozit doku iskelelerinde bulunduğu gözlenmiştir. B-HAp nanopartiküllere ait spektrumda yer alan ve 3000-3600 cm^{-1} aralığında gözlenen yaygın pik ise yapıya absorlanan bağlı suyu ifade etmektedir. Gerçekleştirilen analizler sonucunda nanokompozit doku iskelelerindeki B-HAp ve AMX yüklü PLGA nanopartiküllerin varlığı belirlenmiştir.

4.5.2. SEM Analizi

Çalışma kapsamında üretilen B-HAp ve AMX yüklü PLGA nanopartiküllerin nanokompozit doku iskelelerindeki dağılımlarını ve morfolojilerini göstermek amacı ile SEM analizi gerçekleştirilmiştir. Analiz sonucunda elde edilen B-HAp/kitosan ve AMX yüklü PLGA nanopartikül (m_{PLGA}/m_{AMX}, w/w: 15)/B-HAp/kitosan nanokompozit doku iskelelerine ait SEM görüntüleri Şekil 4.8'de sunulmuştur.



Şekil 4.8: Nanokompozit doku iskelelerinin farklı büyütmelerde SEM görüntüleri.

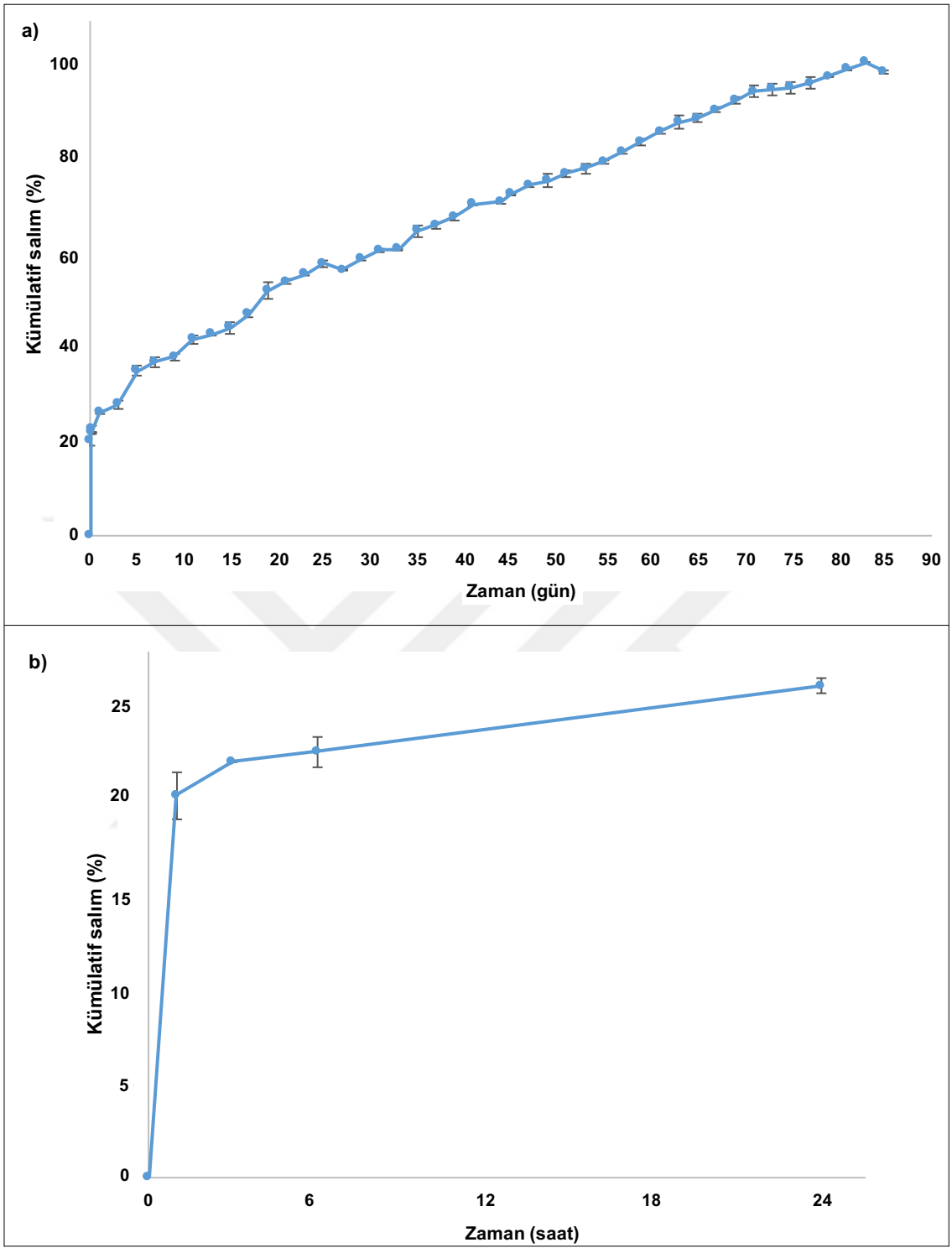
Analiz sonuçlarına göre, doku iskelesi yapım aşamasında yapıya katılan B-HAp ve AMX yüklü PLGA nanopartiküllerin iskelelerin iç kısımlarında homojen dağılım göstererek yapıya katıldığı, küresel morfolojilerini ve yapılarını korudukları gözlenmiştir. AMX yüklü PLGA nanopartiküllerin iskele içerisinde gözenek duvarlarında ve B-HAp üzerinde yoğunlaşacak şekilde dağılım gösterdikleri belirlenmiştir. İlgili literatür incelendiğinde, bu dağılımın sebebinin PLGA'nın yapısında bulunan $COOH^-$ grupları ile B-HAp yapısında bulunan OH^- arasındaki elektrostatik etkileşim olduğu ifade edilmektedir [29].

4.6. Salım Çalışmaları ve Salım Kinetiklerinin İncelenmesi

4.6.1. PLGA Nanopartiküllerden AMX Salımı

AMX yüklü PLGA nanopartiküllerden salınan AMX'in miktarını belirleyebilmek için 3 paralel örnek ile 85 gün boyunca *in-vitro* salım çalışmaları gerçekleştirilmiştir. Salım ortamından belirli aralıklarla örnekler alınarak HPLC kolonuna beslenmiştir. Her bir örnek için AMX'in 230 nm dalga boyundaki alıkonma süresi olan 1.8'inci dakikadaki pikin alanı bulunmuştur. Ardından kalibrasyon grafiği yardımı ile kümülatif salım grafiği elde edilmiştir (**bakınız** Şekil 4.2 ve Şekil 4.3).

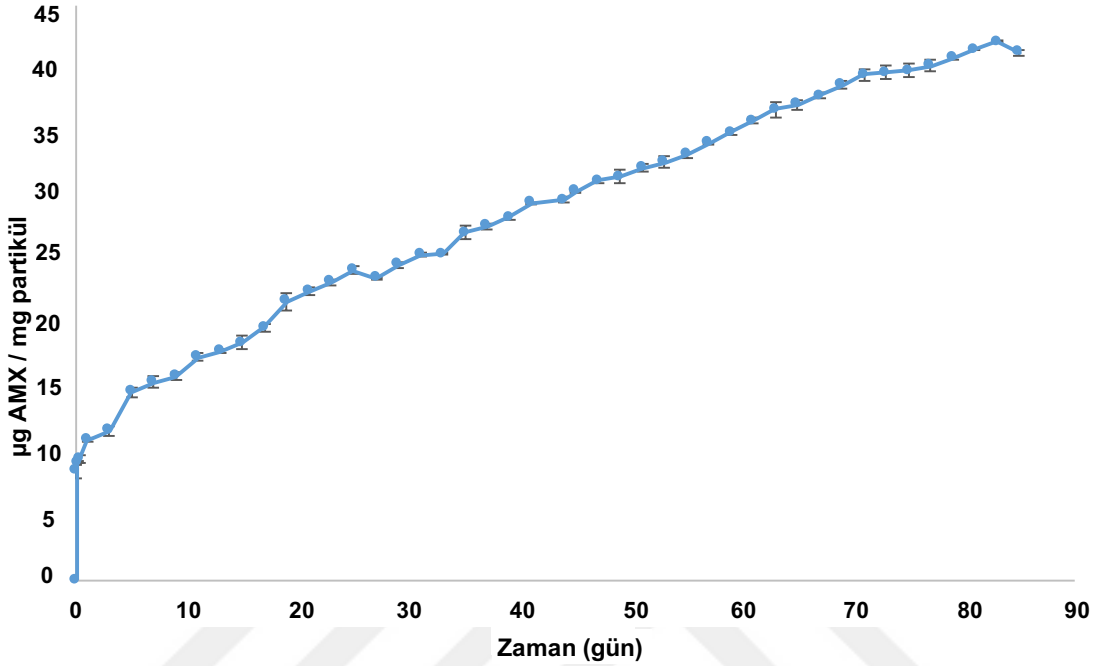
Salım çalışmaları sonucunda elde edilen PLGA nanopartiküllerden yüzde kümülatif AMX salımına ve mg partikül başına salınan kümülatif AMX salımına ait grafikler sırasıyla Şekil 4.9'da ve Şekil 4.10'da sunulmuştur.



Şekil 4.9: PLGA nanopartiküllerden (m_{PLGA}/m_{AMX}, w/w: 15) kümülatif (%) AMX salımının a) 85 gün ve b) 24 saat sonundaki sonuçları.

Şekil 4.9 (a) ve (b) incelendiğinde, AMX'in ilk saatte ani patlama etkisi (burst effect) ile %20'sinin salındığı gözlenmektedir. Ani patlama etkisi, PLGA nanopartiküllerin yüzeyine elektrostatik etkileşimlerle tutunan AMX'in nanopartiküllerden uzaklaşarak salım ortamına geçmesi sonucu gerçekleşmektedir [142]. İlk saatten sonraki

zamanlarda ise AMX salımının kontrollü bir şekilde arttığı gözlenmiştir. Seksen beş günlük salım çalışması sonunda, AMX'in %100'ünün kontrollü olarak salındığı gözlenerek PLGA nanopartiküllerde enkapsüle edilen AMX'in difüzyon mekanizması ve matris (polimer) bozunması ile salındığı belirlenmiştir.



Şekil 4.10: PLGA nanopartiküllerden (m_{PLGA}/m_{AMX}, w/w: 15) mg partikül başına salınan kümülatif AMX miktarı.

Miligram partikül başına salınan kümülatif AMX miktarına ait grafik incelenerek ilk saatte ani patlama etkisi ile salınan AMX miktarının yaklaşık 32 µg olduğu hesaplanmıştır. Seksen beş günlük salım çalışması sonunda ise toplam salınan AMX miktarının ortalama 170 µg olduğu hesaplanarak nanopartiküllerde enkapsüle olan AMX'in tamamının salındığı kanıtlanmıştır. Xu ve ark. tarafından yapılan bir çalışmada PLGA mikroküreelerden AMX salımı incelenerek PLGA mikroküreelerden günlük ortalama 4 µg AMX/mg salındığı belirtilmiştir [128]. Çalışma sonunda AMX salım hızının yüksek olması yüklenen AMX miktarının ve partikül boyutunun fazla olması ile ilişkilendirilmiştir. Sunulan tez çalışmasında ise PLGA nanopartiküllerden AMX salımının günlük ortalama 0.4 µg AMX/mg olduğu gözlenmiştir. Teorik olarak, nanopartiküllerin yüzey alanının mikroküreelerinkine göre daha fazla olmasından dolayı, eşit miktarlarda ilaç yüklendiği durumlarda, nanopartiküllerden salım çok daha hızlı bir şekilde gerçekleşecektir. Fakat, tez çalışması kapsamında nanopartiküllere yüklenen AMX miktarı düşük olmasından dolayı, tez kapsamında

bulunan AMX salım hızının (0.4 μg AMX/mg) Xu ve ark.'nın bulduğu sonuca göre (4 μg AMX/mg) düşük olduğu düşünülmüştür.

Çalışma kapsamında, PLGA nanopartiküllerden AMX'in salım verileri farklı salım kinetiği modellerine (sıfırıncı derece, birinci derece, Higuchi ve Hixson-Crowell) uygulanmıştır. Regresyon katsayısı (R^2) değeri 1'e en yakın olan model "en uygun model" olarak belirtilmiştir. Farklı salım kinetiği modelleri için bulunan AMX salımına ait veriler Çizelge 4.4'te sunulmuştur.

Çizelge 4.4: Salım kinetiği modelleri ve PLGA nanopartiküllerden AMX salımına ait veriler.

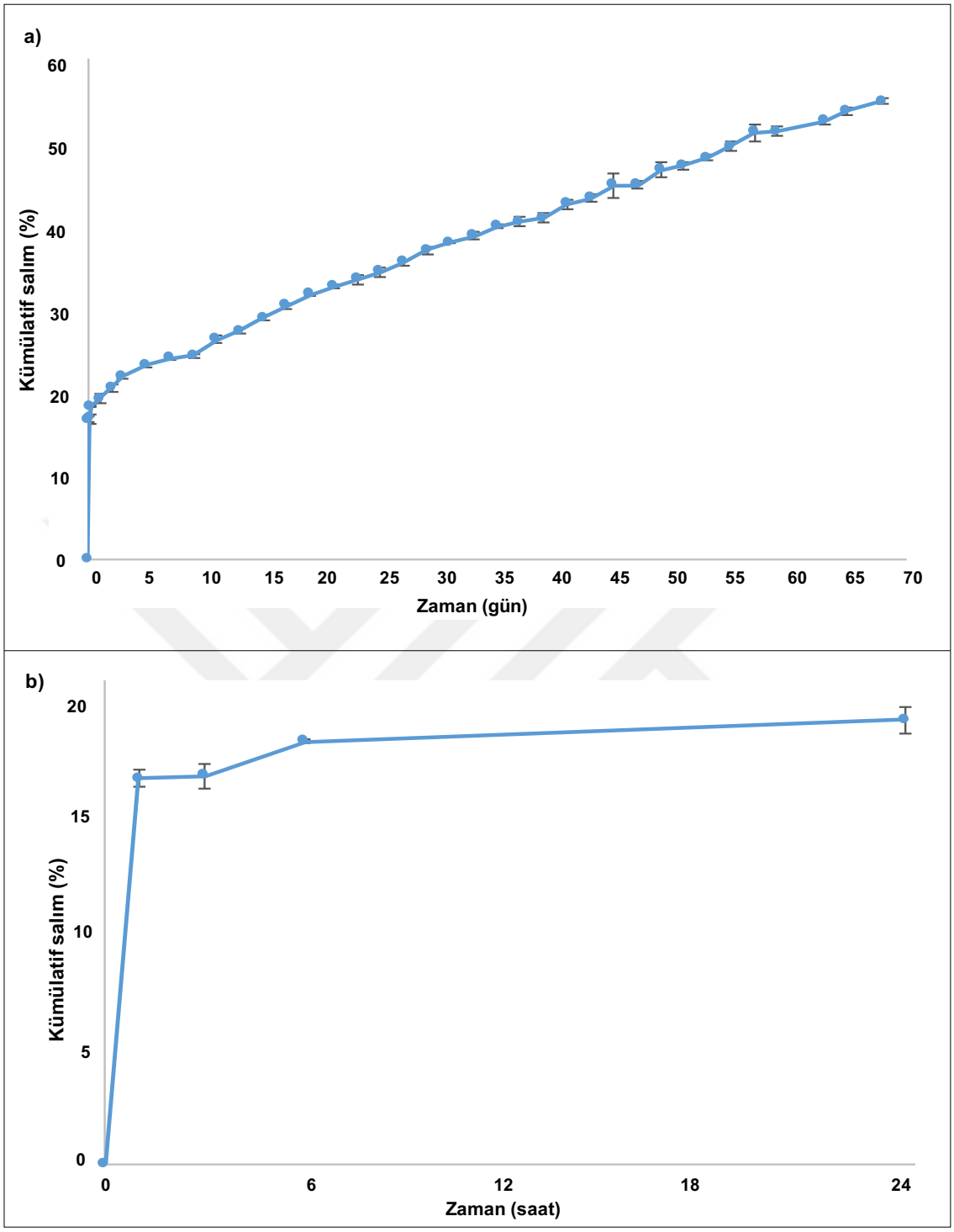
Örnek adı	Sıfırıncı derece		Birinci derece		Higuchi		Hixson-Crowell	
	R^2	K_0 ($\mu g.sa^{-1}$)	R^2	K_1 (sa^{-1})	R^2	K_H ($\mu g.sa^{-1/2}$)	R^2	K_{HC} ($sa^{-1/3}$)
PLGA nanopartikül m_{PLGA}/m_{AMX}, w/w: 15	0.9528	0.0387	0.8796	0.0003	0.9827	1.9215	0.9528	0.0387

Partiküller ve salınan biyoaktif ajan ile igili pek çok özellik partiküllerden gerçekleşen salımın kinetiğini ve mekanizmasını etkilemektedir. İlgili literatür incelendiğinde nanopartiküllerden gerçekleşen salımın genellikle difüzyon kontrollü bir mekanizmaya sahip olduğu belirtilmektedir [142]. Çizelge 4.4'te sunulan her bir modelin R^2 değerleri incelendiğinde, PLGA nanopartiküllerden AMX salımının Higuchi salım modeline uyduğu görülmektedir. Dolayısıyla, salımın ağırlıklı olarak difüzyon kontrollü bir mekanizma ile gerçekleştiği belirlenmiştir.

4.6.2. Kitosan Nanokompozit Doku İskelelerinden AMX Salımı

AMX yüklü PLGA/B-HAp/kitosan doku iskelelerinden salınan AMX'in miktarını belirleyebilmek için 3 paralel örnek ile 70 gün süren *in-vitro* salım çalışmaları yapılmıştır. Salım çalışmaları 6 mm x 1 mm boyutlarındaki AMX yüklü PLGA (m_{PLGA}/m_{AMX}, w/w: 15)/B-HAp/kitosan doku iskeleri ile 10 mL PBS içeren salım ortamında gerçekleştirilmiştir.

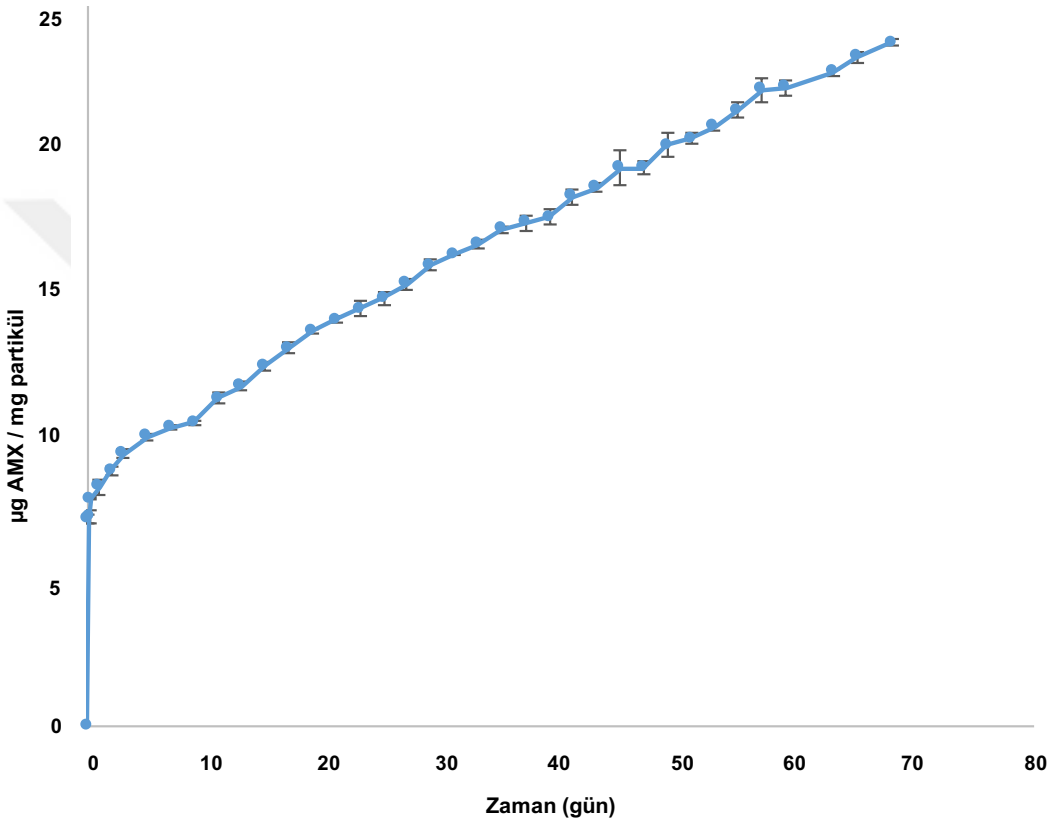
AMX'in HPLC kromatogramı (Şekil 4.2) ve kalibrasyon grafiği (Şekil 4.3) kullanılarak elde edilen nanokompozit doku iskelelerinden yüzde kümülatif AMX salımına ve mg partikül başına salınan kümülatif AMX salımına ait grafikler sırasıyla Şekil 4.11'de ve Şekil 4.12'de sunulmuştur.



Şekil 4.11: Nanokompozit doku iskelelerinden kümülatif (%) AMX salımının a) 85 gün ve b) 24 saat sonundaki sonuçları.

PLGA nanopartiküllerin nanokompozit doku iskelelerine yüklenmesi ile gerçekleşen AMX salımının, doğrudan PLGA nanopartiküllerinden gerçekleşen salıma oranla daha uzun süreli ve daha kontrollü bir şekilde gerçekleştiği görülmektedir. Teorik olarak, nanopartiküllerin yapım aşamasında iskelelere yüklenmesi ile partiküllerin sadece iskele yüzeyinde değil iskelelerin iç kısımlarında da bulunmalarından dolayı

difüzyon mesafesi artmaktadır. Ayrıca, iskele gözenekleri salım sırasında bariyer görevi görmektedir. Böylece, salım daha kontrollü ve yavaş olarak gerçekleşmektedir. Çalışma sonucunda, ilk saatte nanopartiküllerde enkapsüle olan AMX'in %17'sinin ani patlama etkisi ile salındığı ve sonrasında ise salımın kontrollü bir şekilde artarak 70'inci günde %55'e ulaştığı gözlenmiştir. Böylece, doku iskelelerinden AMX salımının ağırlıklı olarak difüzyon mekanizması ile gerçekleştiği belirlenmiştir.



Şekil 4.12: Kitosan nanokompozit doku iskelelerinden mg partikül başına salınan kümülatif AMX miktarı.

Nanokompozit doku iskelelerinden ilk saatte 7 µg AMX/mg salındığı belirlenmiştir. Dolayısıyla, ani patlama ile ilk saatte 1 doku iskelesinden salınan AMX miktarı 42 µg olarak hesaplanmıştır. Yetmiş günlük salım sonunda ise 1 doku iskelesinden toplam salınan AMX miktarı ortalama 138 µg olarak hesaplanmıştır. Ayrıca, iskelelerden AMX salımının günlük ortalama 0.23 µg AMX/mg olduğu gözlenmiştir.

Nanokompozit doku iskelelerinden AMX'in salımına ait veriler farklı salım kinetiği modellerine uygulanarak en uygun model belirlenmiştir. Farklı salım kinetiği modelleri için bulunan AMX salım verileri Çizelge 4.5'te sunulmuştur.

Çizelge 4.5: Salım kinetiği modelleri ve nanokompozit doku iskelelerinden AMX salımına ait veriler.

Örnek adı	Sıfırıncı derece		Birinci derece		Higuchi		Hixson-Crowell	
	R^2	K_0 ($\mu g.sa^{-1}$)	R^2	K_1 (sa^{-1})	R^2	K_H ($\mu g.sa^{-1/2}$)	R^2	K_{HC} ($sa^{-1/3}$)
PLGA/B-HAp kitosan iskele	0.9313	0.0240	0.9354	0.0003	0.9573	1.0275	0.9313	0.0240

Salım kinetiklerinin R^2 değerleri incelendiğinde, nanokompozit doku iskelelerinden AMX salımının Higuchi salım modeline uyduğu görülmektedir. Dolayısıyla, salımın ağırlıklı olarak difüzyon kontrollü bir mekanizma ile gerçekleştiği belirlenmiştir.

4.7. Bakteriyel Çalışmalar

Çalışma kapsamında, B-HAp ile beta-laktam antibiyotikleri arasındaki sinerjik etkiyi inceleyebilmek için farklı bakteri suşları (*E. coli* ATCC®25922, *S. aureus* ATCC®25922, *K. pneumoniae* ATCC®BAA1144 ve *K. pneumoniae* ATCC®700603) ile birlikte 3 farklı yöntem kullanılmıştır. Çalışmalar, CLSI (Clinical and Laboratory Standards Instıtute) kriterlerine göre gerçekleştirilmiştir. Bakteri kültüründen alınan tek düşmüş kolonilerden son derişim $1x10^8$ CFU/mL olacak şekilde her plak için 0.5 McFarland bulanıklığına eşdeğer olan bakteri süspansiyonları hazırlanmıştır.

4.7.1. Çift Disk Sinerji Yöntemi

Çift disk sinerji yöntemi, ucuz olması, kullanımının kolay ve pratik olması gibi avantajlarından dolayı beta-laktamaz enzim üretiminin saptanmasında sıklıkla tercih edilmektedir. Bu yöntem kullanılarak çok düşük seviyelerdeki beta-laktamaz enzim üretimi bile saptanabilmektedir [143].

Tez kapsamında, beta-laktamazların hem gram-negatif bakteri suşları hem de gram-pozitif bakteri suşları ile farklı antibiyogram diskleri birlikte kullanılarak çalışmalar gerçekleştirilmiştir. Antibiyogram diskleri ile B-HAp (veya HAp), plaklar üzerine yerleştirilerek 16-18 sa 37°C'deki etüvde bekletilmiştir. Ardından, antibiyotiklerin inhibisyon zon çaplarının B-HAp (veya HAp) yönünde sinerjik bir alan oluşturup oluşturmadıkları incelenmiştir.

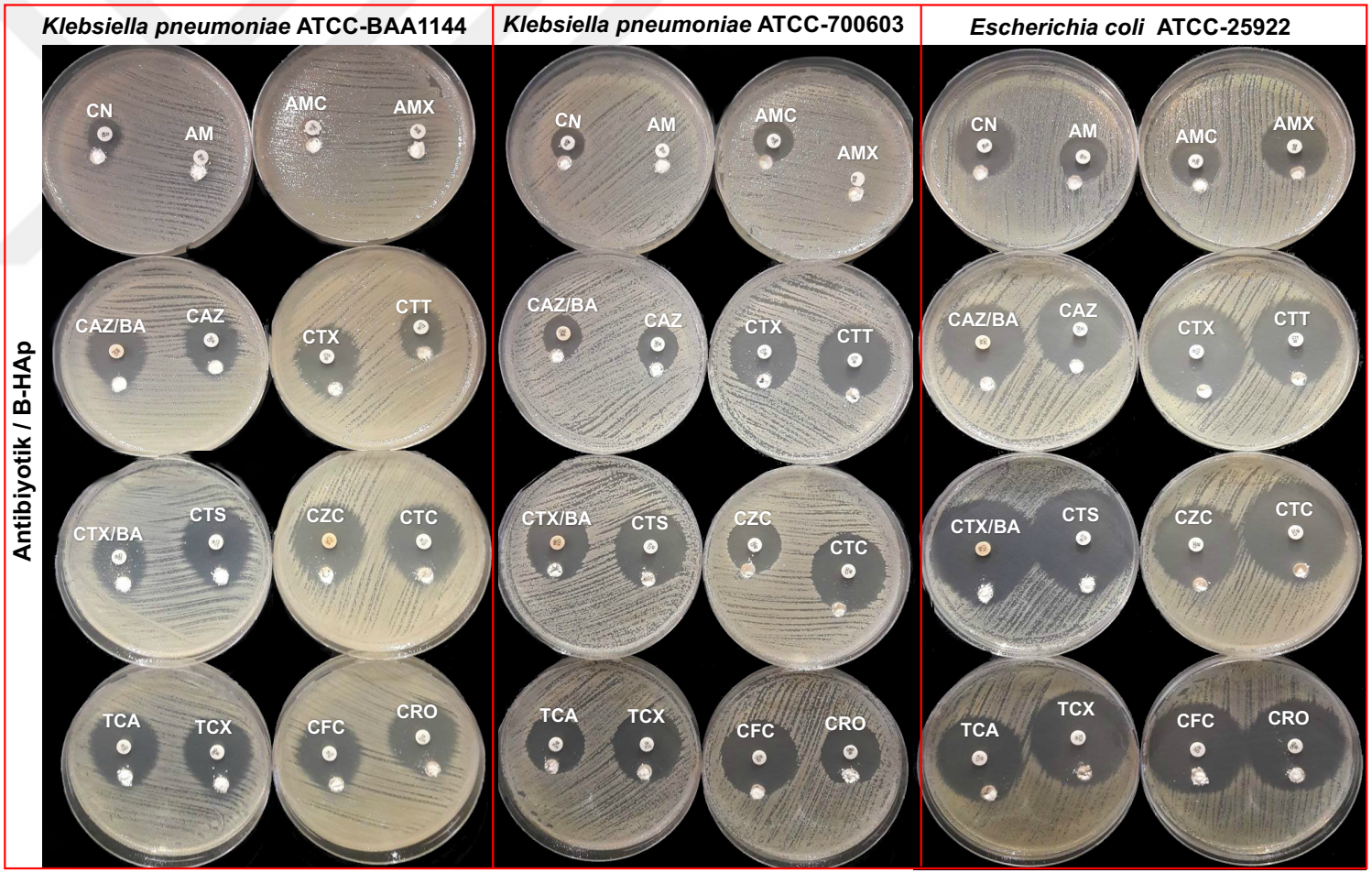
Çalışma kapsamında kullanılan beta-laktam antibiyotik içeren diskler, içerdikleri antimikrobiyal ajan ve miktarları ile birlikte, Çizelge 4.6'da sunulmuştur.

Çizelge 4.6: Antibiyogram diskleri, içerdikleri antimikrobiyal ajanlar ve miktarları.

ANTİBİYOGRAM DİSKİ	ANTİMİKROBİYAL AJAN	
	Ad	Miktar (μg)
AMX	Amoksisilin	25
AMC	Amoksisilin/klavulanik asit	20/10
AM	Ampisilin	10
CTX	Sefotaksim	30
CTX/BA	Sefotaksim/boronik asit	430
CTC	Sefotaksim/klavulanik asit	30/10
CTS	Sefotaksim/sulbaktam	30/10
TCX	Sefotaksim/tazobaktam	30/10
CTT	Sefotetan	30
CAZ	Seftazidim	30
CAZ/BA	Seftazidim/boronik asit	430
CZC	Seftazidim/klavulanik asit	30/10
TCA	Seftazidim/tazobaktam	30/10
CRO	Seftriakson	30
CFC	Seftriakson/klavulanik asit	40
CN	Gentamisin	10

Antimikrobiyal ajanlardan AMC ve AMX, beta-laktam antibiyotiklerin penisilinler grubunun üyesi; CN, aminoglikozidler grubunun üyesi; CTX, CTT, CAZ ve CRO ise sefalosporinler grubunun üyesidir. CTT ikinci kuşak selalosporin; CTX, CAZ ve CRO ise üçüncü kuşak sefalosporin grubundandır.

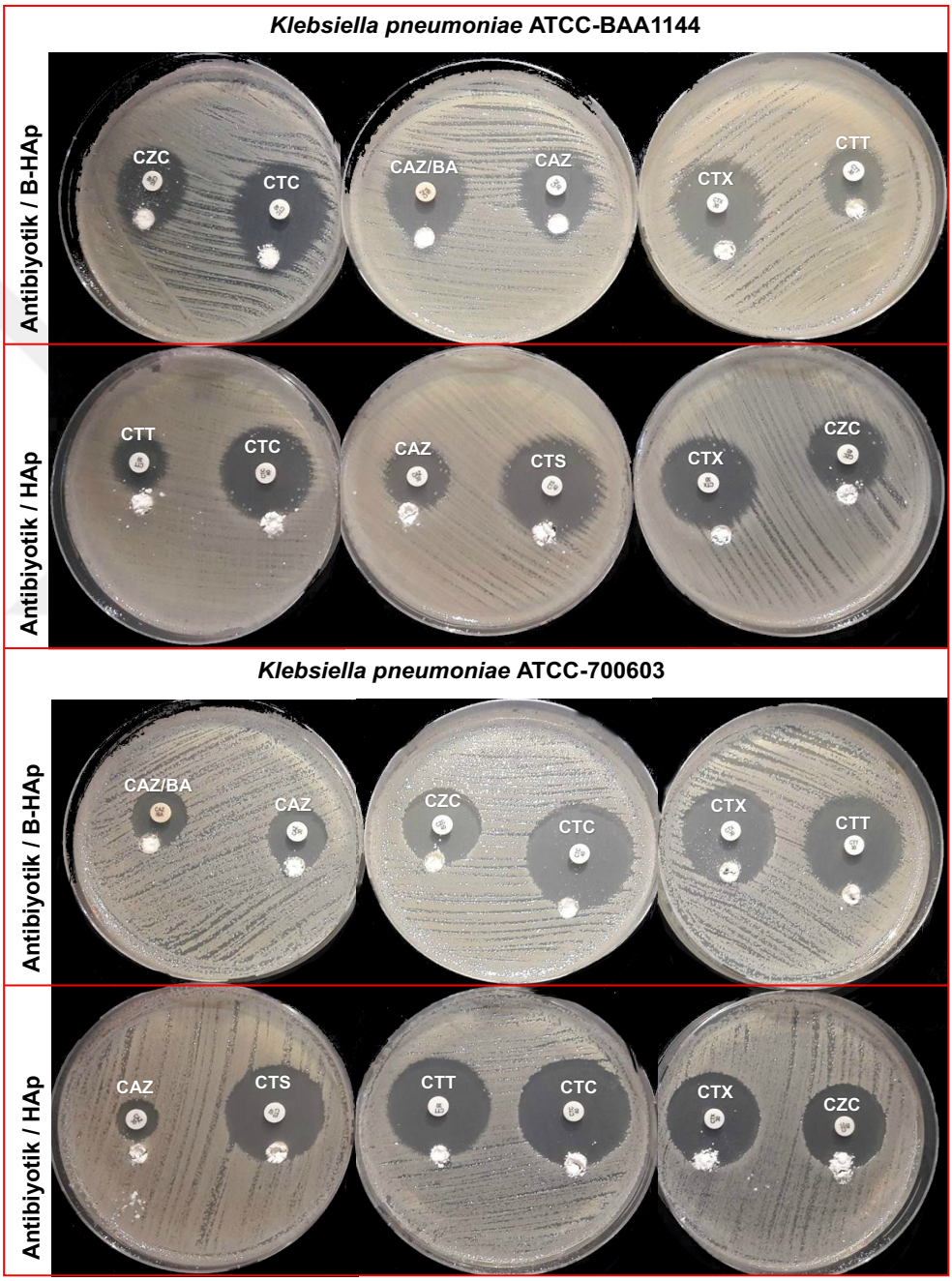
Çift disk sinerji yöntemi sonucunda, *K. pneumoniae* ATCC®BAA1144, *K. pneumoniae* ATCC®700603 ve *E. coli* ATCC®25922 suşları için antibiyotik/B-HAp kombinasyonlarına ait elde edilen görüntüler Şekil 4.13'te sunulmuştur. Ayrıca, *K. pneumoniae* ATCC®BAA-1144 ve *K. pneumoniae* ATCC®700603 suşları için antibiyotik/B-HAp ve HAp kombinasyonlarına ait görüntüler karşılaştırmalı olarak Şekil 4.14'te sunulmuştur.



AM: ampisilin; CRO: seftriakson; CAZ: seftazidim; CAZ/BA: ceftazidim/boronik asit; CZC: seftazidim/klavulanik asit; TCA: seftazidim/tazobaktam; CFC: seftriakson/klavulanik asit; CN: gentamisin; AMX: amoksisilin; AMC: amoksisilin/klavulanik asit; CTT: sefotetan; CTX: sefotaksim; CTX/BA: sefotaksim/boronik asit; CTC: sefotaksim/klavulanik asit; CTS: sefotaksim/sulbaktam; TCX: sefotaksim/tazobaktam

Şekil 4.13: *K. pneumoniae* ATCC®BAA-1144, *K. pneumoniae* ATCC®700603 ve *E. coli* ATCC®25922 bakteri suşları için antibiyotik/B-HAp kombinasyonlarına ait görüntüler.

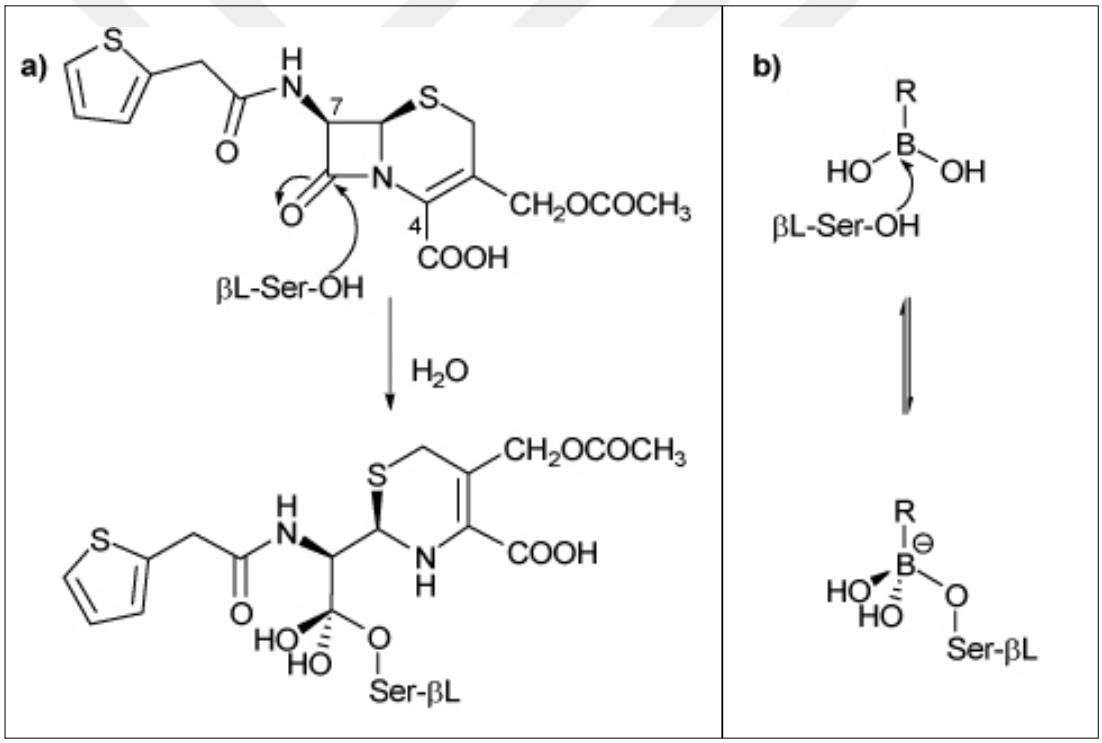
K. pneumoniae ATCC®BAA1144 ve *K. pneumoniae* ATCC®700603 bakteri suşları GSBL enzimi üreten gram-negatif bakterilerdir. GSBL enzimleri beta-laktam antibiyotik yapısında bulunan beta-laktam halkasının yapısını bozarak antibiyotiğin etkinliğini yok etmektedirler. Şekil 4.13 incelendiğinde, *K. pneumoniae* bakteri suşlarında antibiyotiklerin inhibisyon zonlarının B-HAp nanopartiküllere doğru sinerjik bir alan oluşturarak genişledikleri gözlenmiştir.



CAZ: seftazidim; CAZ/BA: seftazidim/boronik asit; CZC: seftazidim/klavulanik asit; CTT: sefotetan; CTX: sefotaksim; CTC: sefotaksim/klavulanik asit; CTS: sefotaksim/sulbaktam.

Şekil 4.14: *K. pneumoniae* ATCC®BAA-1144 ve *K. pneumoniae* ATCC®700603 bakteri suşları için antibiyotik/B-HAp ve HAp kombinasyonlarına ait görüntüler.

GSBL'ler serin-amidaz türü enzimlerdir ve beta-laktamların beta-laktam halkalarını hidrolize ederek bakterilere karşı etkinliklerini yok etmektedirler. Bu direnç mekanizmasına karşı beta-laktamların beta-laktamaz inhibitörleri ile birlikte kullanılması gündeme gelmiştir. İlgili literatür incelendiğinde, boronik asitlerin geçiş durumu inhibitörü olarak davrandığı ve en etkili tersinir inhibitör olduğu belirtilmiştir. Bor atomunun elektrofilik özelliğe sahip olmasından dolayı, beta-laktamlarda bulunan beta-laktam halkasının karbonil işlevselliğini taklit ettiği belirtilmiştir. Ayrıca, katalitik-serin ile birlikte tetrahedral geometri oluşturarak geçiş durumu enzim-substrat kompleksini taklit ettiği, böylece antibiyotiklerin aktif bölgelerini koruyarak etkinliklerini artırdığı belirtilmiştir [56]. Bir beta-laktamaz enziminin beta-laktam antibiyotiklerine ve borik aside karşı göstermiş olduğu etki mekanizması sırasıyla, Şekil 15 (a) ve (b)'de sunulmuştur [144].



Şekil 4.15: Beta-laktamaz enziminin a) beta-laktam antibiyotiklerine (örneğin; sefalotin) ve b) borik aside karşı etki mekanizması [144].

Şekil 4.14'de sunulan antibiyotik/B-HAp ve antibiyotik/HAp kombinasyonları incelendiğinde, antibiyotiklerin inhibisyon zon çaplarının B-HAp yönünde sinerjik bir alan oluşturarak arttığı gözlenirken HAp yönünde bir değişikliğin olmadığı gözlenmiştir. Bu durumun, tez çalışması kapsamında sentezlenen B-HAp'ın

yapısında bulunan borik asitin (H_3BO_3) GSBL enzimleri ile birlikte geçiş durumu enzim-substrat kompleksini taklit etmesinden kaynaklandığı düşünülmüştür.

HAp yapısına üretim aşamasında eklenen bakır (Cu^{2+}), demir (Zn^{2+}), gümüş (Ag^{+}), magnezyum (Mg^{2+}) gibi iyon katkılarının, HAp'ın mekanik özelliklerini ve antibakteriyel aktivitesini artırdığı, bor (B^{-}) katkısının ise kemik oluşumunu hızlandırdığı literatürde belirtilmektedir [145]. Tez çalışması kapsamında, bor katkısının GSBL üreten bakterilere karşı etkinliği incelenerek, antibakteriyel aktivite üzerinde de etkili olduğu belirlenmiştir. Sonuç olarak, B-HAp'ın beta-laktam antibiyotikleri ile birlikte kullanıldığında beta-laktamaz inhibitörü olarak değerlendirilebileceği düşünülmüştür.

4.7.2. Agar Difüzyon Yöntemi

Tez çalışması kapsamında, çift disk sinerji yöntemine ek olarak agar difüzyon yöntemi ile de çalışmalar yapılarak B-HAp ve beta-laktam antibiyotikleri arasındaki sinerjik etki incelenmiştir. Bu yöntemde, B-HAp (veya HAp), plakların hazırlanması esnasında MHA'ya eklenmiştir. Çizelge 4.5'te sunulan antibiyogram diskleri plaklara yerleştirildikten sonra 16-18 sa boyunca 37°C'deki etüvde bekletilmiştir. Ardından, inhibisyon zon çapları ölçülmüş ve standart antibiyotik sonuçları ile karşılaştırılarak inhibisyon zon çaplarında meydana gelen değişimler incelenmiştir. Elde edilen sonuçlar Çizelge 4.7'de sunulmuştur.

Çizelge 4.7: Standart antibiyotiklere, antibiyotik/B-HAp ve antibiyotik/HAp kombinasyonlarına ait inhibisyon zon çapları.

Suşlar	**Inhibisyon zon çapları (mm)**															
	Standart Antibiyotik (μg)[a]															
	AM	CRO	CAZ	CAZ/BA	CZC	TCA	CFC	CN	AMX	AMC	CTT	CTX	CTX/BA	CTC	CTS	TCX
	10	30	30	430	30/10	30/10	40	10	25	20/10	30	30	430	30/10	30/10	30/10
Staphylococcus aureus ATCC®25923	35	28	20	22	21	21	25	26	33	36	23	31	31	30	30	28
Escherichia coli ATCC®25922	18	35	32	32	30	30	35	22	24	21	34	35	37	32	39	35
Klebsiella pneumoniae ATCC®BAA-1144	0	29	21	26	23	28	29	15	0	11	18	30	30	29	31	30
Klebsiella pneumoniae ATCC®700603	0	22	16	16	24	22	30	15	0	19	30	27	23	32	29	26
	Antibiyotik/B-HAp (μg)[b]															
Staphylococcus aureus ATCC®25923	42	29	24	23	30	28	31	34	41	39	25	35	36	33	39	39
Escherichia coli ATCC®25922	20	39	37	37	36	33	39	28	29	26	36	42	40	44	40	40
Klebsiella pneumoniae ATCC®BAA-1144	0	32	30	30	33	NT	32	NT	NT	NT	25	32	34	38	36	NT
Klebsiella pneumoniae ATCC®700603	0	NT	19	19	25	NT	NT	NT	NT	NT	30	30	28	34	32	NT
	Antibiyotik/HAp (μg)[c]															
Staphylococcus aureus ATCC®25923	35	28	20	22	21	21	25	26	33	36	23	31	31	30	30	28
Escherichia coli ATCC®25922	18	35	32	32	30	30	35	22	24	21	34	35	37	32	39	35
Klebsiella pneumoniae ATCC®BAA-1144	0	29	21	26	23	28	29	15	0	11	18	30	30	29	31	30
Klebsiella pneumoniae ATCC®700603	0	22	16	16	24	22	30	15	0	19	30	27	23	32	29	26

AM: ampisilin; CRO: seftriakson; CAZ: seftazidim; CAZ/BA: seftazidim/boronik asit; CZC: seftazidim/klavulanik asit; TCA: seftazidim/tazobaktam; CFC: seftriakson/klavulanik asit; CN: gentamisin; AMX: amoksisilin; AMC: amoksisilin/klavulanik asit; CTT: sefotetan; CTX: sefotaksim; CTX/BA: sefotaksim/boronik asit; CTC: sefotaksim/klavulanik asit; CTS: sefotaksim/sulbaktam; TCX: sefotaksim/tazobaktam; NT: test edilmedi; (–) aktif değil.
[a] mg/6 mm antibiyogram diski, [b] 200μg bor/mL ; [c] B-HAp ile eşdeğer miktar.

Çalışma kapsamında, antibiyotik/B-HAp kombinasyonunun kontrol grupları olarak antibiyotik/HAp kombinasyonu ve standart antibiyotikler kullanılmıştır. Çizelge 4.7 incelendiğinde, beta-laktam antibiyotiklerinden penisilinler grubunun bir üyesi olan AMX'in *S. aureus* ATCC®25923 suşuna karşı gösterdiği inhibisyon zon çapı 33 mm olarak ölçülmüştür. Bu değer HAp'ın kullanıldığı durumda değişmez iken B-HAp'ın kullanıldığı durumda 41 mm olduğu ölçülmüştür. Sonuç olarak, B-HAp kullanımı ile AMX'in inhibisyon çap değerinin 8 mm arttığı belirlenmiştir. *S. aureus* ATCC®25923 standart bakteri suşunda GSBL enzimi üretilmediğinden dolayı, B-HAp kullanımı ile oluşan inhibisyon çapındaki artışın sinerjik etki yerine antibakteriyel etkiden kaynaklandığı düşünülmüştür. Ayrıca, aynı antibiyotiğin farklı bakterilere karşı farklı inhibisyon zon çaplarına sahip olmasının suşların hücresel yapılarının farklı olmasına bağlı olduğu düşünülmüştür.

Beta-laktamların sefalosporinler grubundan olan sefotetan (CTT)'ın inhibisyon zon çapları incelendiğinde ise, B-HAp kullanımı ile birlikte GSBL enzimi üreten *K. pneumoniae* ATCC®BAA-1144 suşuna karşı 7 mm arttığı, fakat *K. pneumoniae* ATCC®700603 suşuna karşı artışın olmadığı belirlenmiştir. Coudron tarafından yapılan bir çalışmada [146]. *K. pneumoniae* ATCC®700603 şusunun GSBL enzimi ürettiğini (GSBL[+]) fakat AmpC tipi beta-laktamaz üretmediği (AmpC[-]) gözlemlenerek, CTT ve CTT/bor disklerinin *K. pneumoniae* ATCC®700603 suşuna karşı inhibisyon zon çaplarının aynı olduğu belirtilmiştir [146].

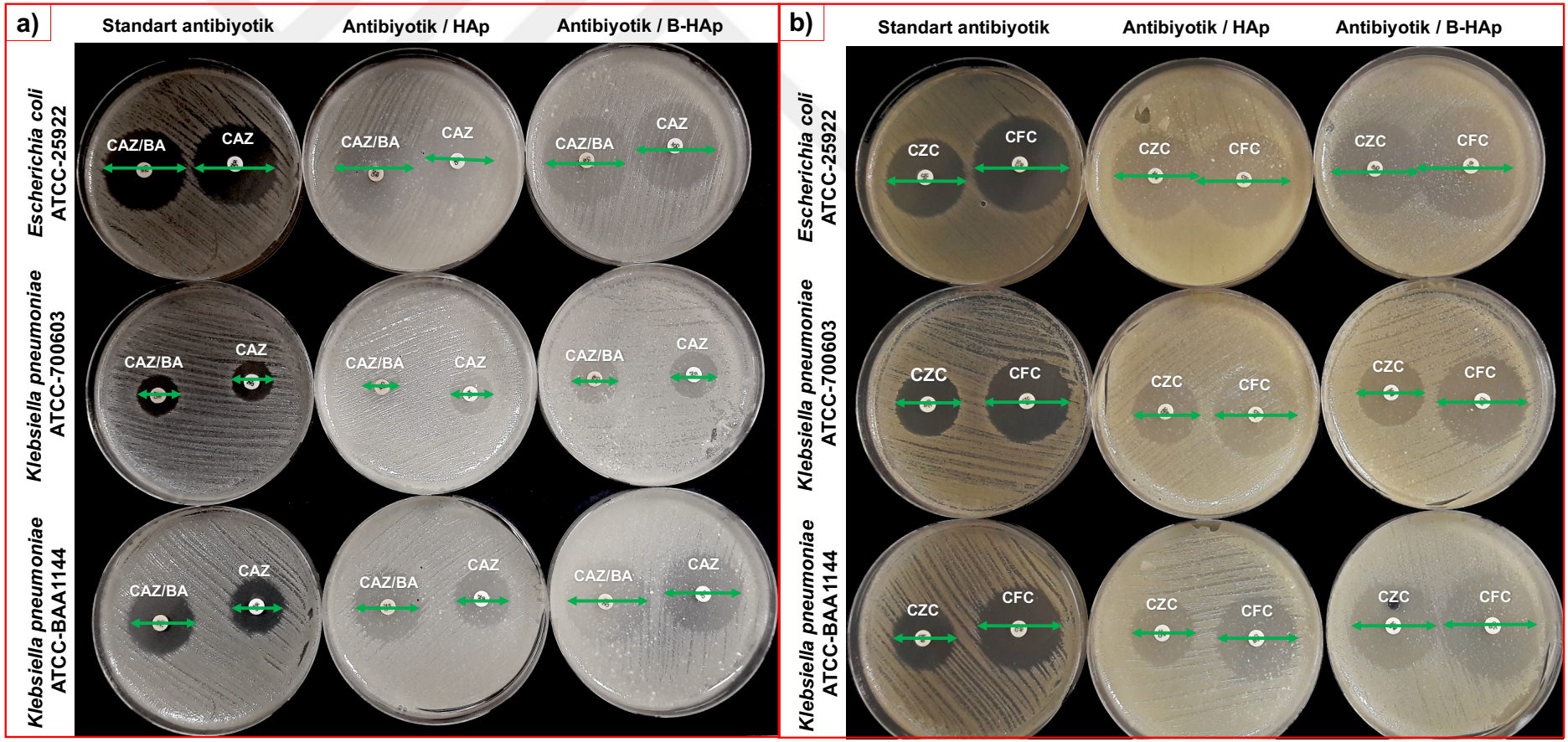
Çalışma kapsamında, B-HAp kullanımı ile standart antibiyotiklerin inhibisyon zon çaplarında meydana gelen değişiklikler Çizelge 4.8'de sunulmuştur. Sonuç olarak, beta-laktam antibiyotiklerinin B-HAp ile birlikte kullanımı sonucunda inhibisyon zon çaplarında artış gözlendiği ve bu artışın "çift disk sinerji yöntemi" sonuçlarını desteklediği görülmektedir.

Sunulan sonuçlardan seftazidim/boronik asit (CAZ/BA), seftazidim (CAZ), seftazidim/klavulanik asit (CZC) ve seftriakson/klavulanik asit (CFC) antibiyotiklerine ait görüntüler Şekil 4.16'da sunulmuşken sefotaksim/boronik asit (CTX/BA), sefotaksim/sulbaktam (CTS), CTT ve sefotaksim (CTX) antibiyotiklerine ait görüntüler Şekil 4.17'de sunulmuştur.

Çizelge 4.8: B-HAp kullanımı ile standart antibiyotiklerin inhibisyon zon çaplarında meydana gelen değişiklikler.

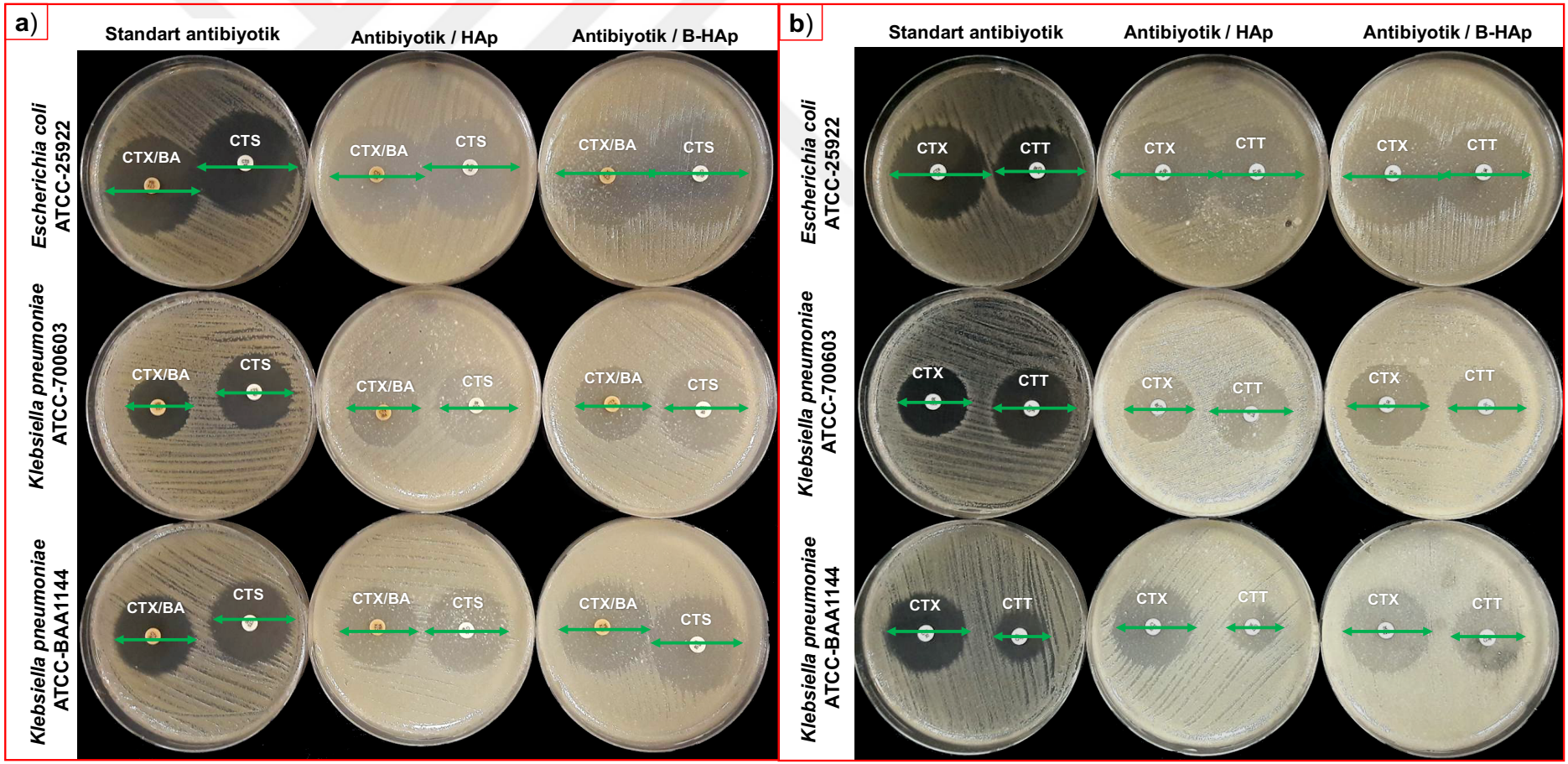
Suşlar	**Inhibisyon zon çaplarındaki değişiklikler (mm)**															
	Antibiyotik (μg)[a]															
	AM	CRO	CAZ	CAZ/BA	CZC	TCA	CFC	CN	AMX	AMC	CTT	CTX	CTX/BA	CTC	CTS	TCX
	10	30	30	430	30/10	30/10	40	10	25	20/10	30	30	430	30/10	30/10	30/10
Staphylococcus aureus ATCC®25923	+7	+1	+4	+1	+9	+7	+6	+8	+8	+3	+2	+4	+5	+3	+9	+11
Escherichia coli ATCC®25922	+2	+4	+5	+5	+6	+3	+4	+6	+5	+5	+2	+7	+3	+12	+1	+5
Klebsiella pneumoniae ATCC®BAA-1144	0	+3	+9	+4	+10	NT	+3	NT	NT	NT	+7	+2	+4	+9	+5	NT
Klebsiella pneumoniae ATCC®700603	0	NT	+3	+3	+1	NT	NT	NT	NT	NT	0	+3	+5	+2	+3	NT

AM: ampisilin; CRO: seftriakson; CAZ: seftazidim; CAZ/BA: seftazidim/boronik asit;
CZC: seftazidim/klavulanik asit; TCA: seftazidim/tazobaktam; CFC: seftriakson/klavulanik asit; CN: gentamisin;
AMX: amoksisilin; AMC: amoksisilin/klavulanik asit; CTT: sefotetan; CTX: sefotaksim;
CTX/BA: sefotaksim/boronik asit; CTC: sefotaksim/klavulanik asit; CTS: sefotaksim/sulbaktam; TCX: sefotaksim/tazobaktam;
NT: test edilmedi; (–) aktif değil.
[a] mg/6 mm antibiyogram diski,



CAZ: seftazidim; CAZ/BA: seftazidim/boronik asit; CZC: seftazidim/klavulanik asit; CFC: seftriakson/klavulanik asit.

Şekil 4.16: *K. pneumoniae* ATCC®BAA-1144, *K. pneumoniae* ATCC®700603 ve *E. coli* ATCC®25922 bakteri suşları için a) CAZ/BA ve CAZ, b) CZC ve CFC antibiyotik/B-HAp ve HAp kombinasyonlarına ait görüntüler.



CTX/BA: sefotaksim/boronik asit; CTS: sefotaksim/sulbaktam; CTT: sefotetan; CTX: sefotaksim.

Şekil 4.17: *K. pneumoniae* ATCC®BAA-1144, *K. pneumoniae* ATCC®700603 ve *E. coli* ATCC®25922 bakteri suşları için a) CTX/BA ve CTS, b) CTX ve CTT antibiyotik/B-HAp ve HAp kombinasyonlarına ait görüntüler.

4.7.3. Gradiyent Testi

Beta-laktam antibiyotikleri ile B-HAp arasındaki sinerjik etki "çift disk sinerji yöntemi" ve "agar difüzyon yöntemi"lerine ek olarak "gradiyent testi" ile de incelenmiştir. Bu yöntemde, plakların hazırlanması sürecinde B-HAp (veya HAp) MHA'ya eklenmiştir. Plaklara bakteri ekiminin yapılmasının ardından beta-laktam antibiyotik şeritleri yerleştirilerek MİK değerleri belirlenmiştir. Elde edilen sonuçlar Çizelge 4.9'da sunulmuştur.

Çizelge 4.9: Standart antibiyotiklere, antibiyotik/B-HAp ve HAp kombinasyonlarına ait MİK değerleri.

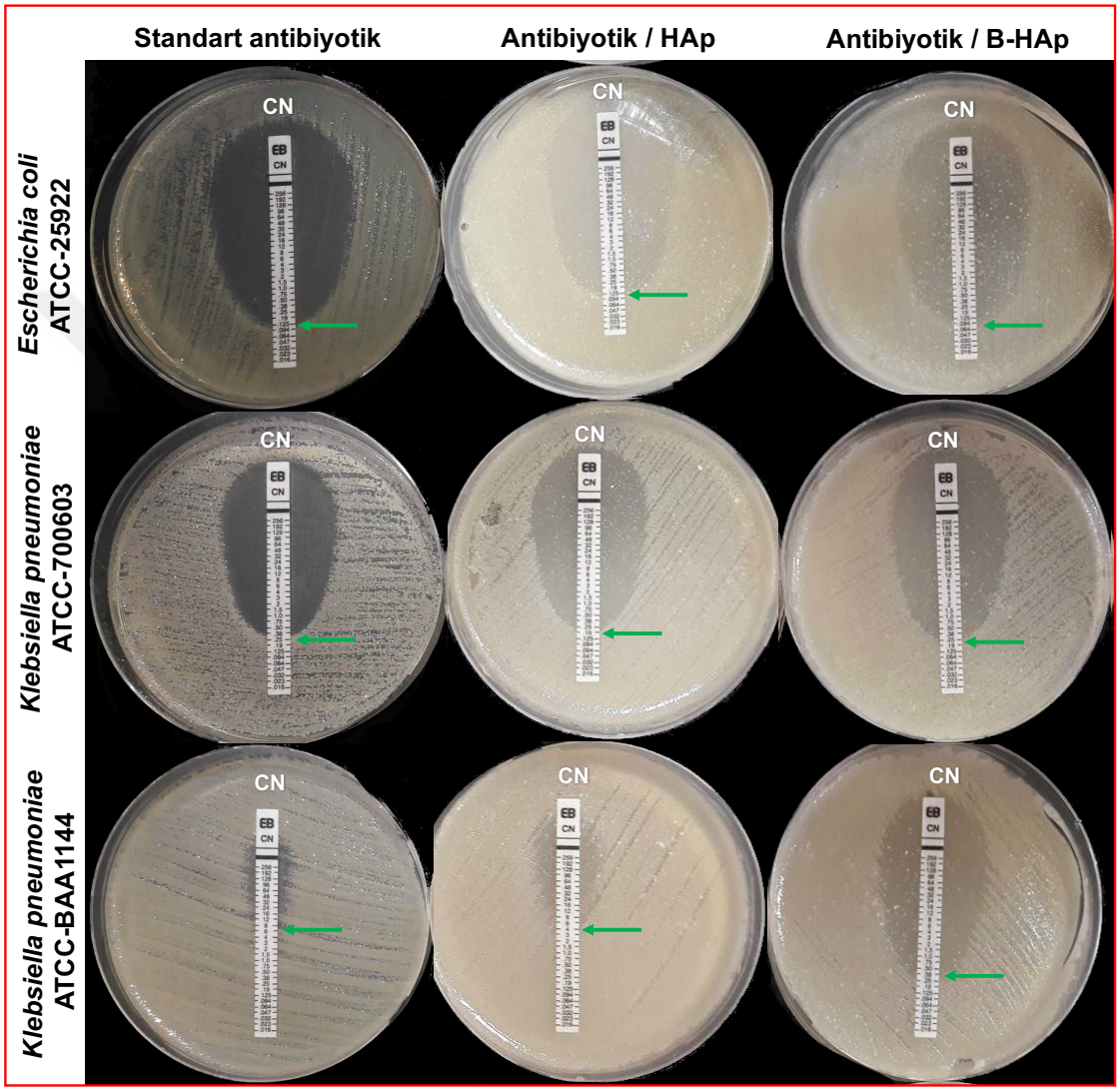
Suşlar	**MİK değerleri (μg/mL)**				
	Standart Antibiyotik				
	CN	TZ	TX	CT	FX
Escherichia coli ATCC®25922	0.125	0.470	0.230	0.230	NT
Klebsiella pneumoniae ATCC®BAA-1144	24.000	3.000	0.500	1.000	0.000
Klebsiella pneumoniae ATCC®700603	0.380	6.000	2.000	1.000	64.000
	Antibiyotik/B-HAp [a]				
Escherichia coli ATCC®25922	0.125	0.470	0.160	0.230	0.750
Klebsiella pneumoniae ATCC®BAA-1144	0.380	0.190	0.064	0.640	0.000
Klebsiella pneumoniae ATCC®700603	0.250	2.000	0.500	0.250	8.000
	Antibiyotik/HAp [b]				
Escherichia coli ATCC®25922	0.125	0.470	0.230	0.230	NT
Klebsiella pneumoniae ATCC®BAA-1144	24.000	3.000	0.500	1.000	0.000
Klebsiella pneumoniae ATCC®700603	0.380	6.000	2.000	1.000	64.000

CN: Gentamisin; TZ: Seftazidim; TX: Seftriakson; CT: Sefotaksim FX: Sefoksitin; NT: test edilmedi; (–) aktif değil.
[a] 200 μg bor/m; [b] B-HAp ile eşdeğer miktar.

Çalışma kapsamında kullanılan; CN, beta-laktam antibiyotiklerinin aminoglikozidler grubunun üyesi iken TZ, TX, CT ve FX sefalosporinler grubunun üyesidir. TZ, TX ve CT üçüncü kuşak sefalosporin; FX ise ikinci kuşak sefalosporin grubundandır. MİK değerleri incelendiğinde, GSBL enzimi üreten *K. pneumoniae* suşlarına karşı antibiyotik/B-HAp kombinasyonundaki MİK değerlerinin standart antibiyotik ve antibiyotik/HAp kombinasyonundaki değerlere göre daha küçük olduğu görülmektedir. MİK değerleri, enfeksiyona neden olan bakterileri inhibe etmek için kullanılması gereken ilaç derişimini vermektedir. Dolayısıyla, antibiyotik/B-HAp kombinasyonu kullanıldığında, K. *pneumoniae* suşlarını inhibe etmek için gerekli olan antibiyotik derişiminin, standart antibiyotik ve antibiyotik/HAp

kombinasyonunun kullanıldığı duruma göre daha düşük olduğu gözlenmiştir. Ayrıca, sonuçların “çift disk sinerji yöntemi” ve “agar difüzyon yöntemi” ile uyumlu olduğu belirlenerek B-HAp’ın beta-laktam antibiyotikleri ile sinerjik etkiye sahip olduğu gözlenmiştir.

Sunulan sonuçlardan CN antibiyotiğine ait görüntüler Şekil 4.18’de verilmiştir.



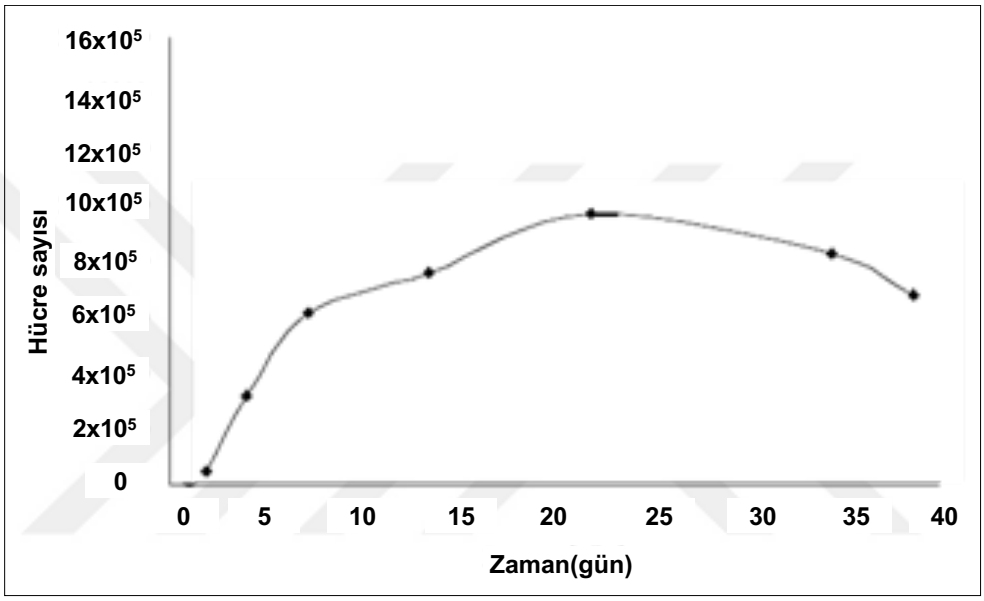
CN: Gentamisin

Şekil 4.18: Standart antibiyotiklere, antibiyotik/B-HAp ve HAp kombinasyonlarına ait görüntüler.

4.8. Hücre Kültür Çalışmaları

4.8.1. MC3T3-E1 Hücre Kültürü

Tez kapsamında bir beta-laktam antibiyotiği olan AMX ile B-HAp'ın bakteriyel çalışmalarla sinerjik etkinliğinin belirlenmesinin ardından preosteoblastik MC3T3-E1 hücreleri ile gerçekleştirilen hücre kültür çalışmaları gerçekleştirilmiştir. Grubumuz tarafından daha önce yapılan çalışmalarda MC3T3-E1 hücreleri karakterize edilerek fibroblastik morfolojide oldukları gözlenmiştir. Ayrıca, hemositometrik sayım yapılarak MC3T3-E1 hücresinin üreme grafiği elde edilmiştir (Şekil 4.19) [147].



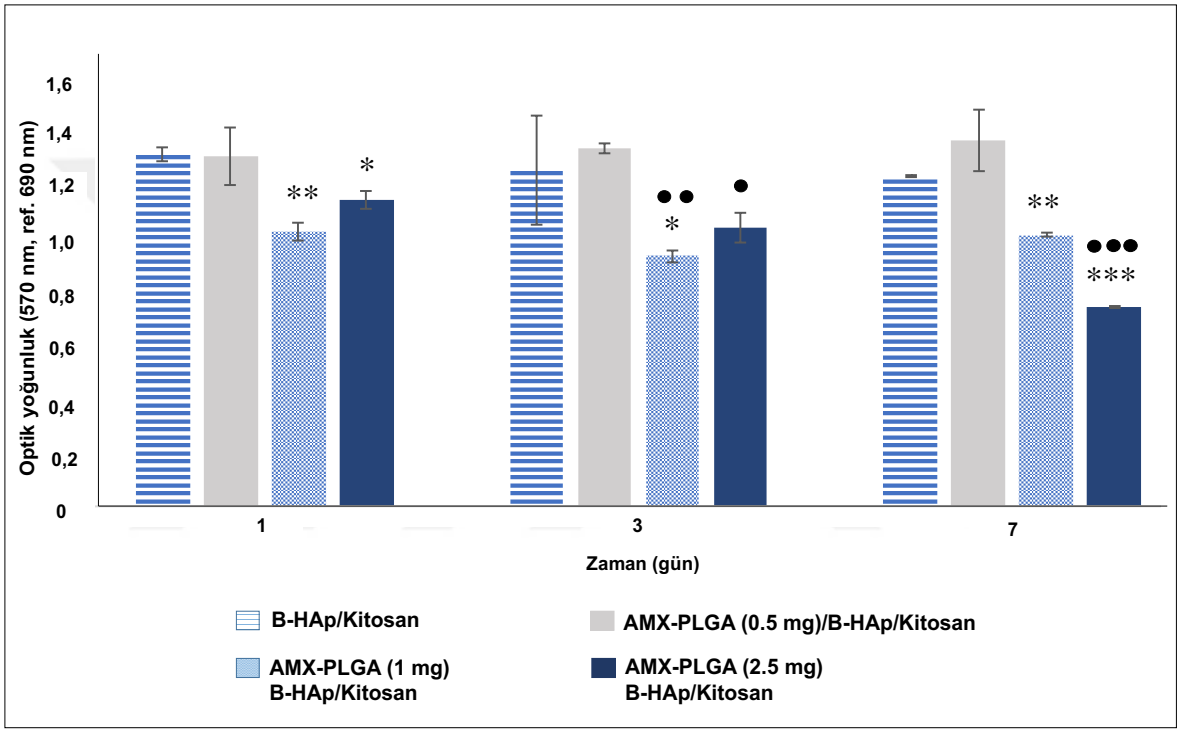
Şekil 4.19: MC3T3-E1 üreme grafiği [147].

MC3T3-E1 üreme grafiğinin belirlenmesinin ardından, hücrelerin ikilenme süreleri (t_d) 36 sa olarak ve özgül üreme hızları ise 0.019 sa^{-1} olarak belirtilmiştir [147]. Ayrıca, kültürün 4. gününde hücrelerin logaritmik faza ve 23. gününden ise durgun faza girdiği belirtilmiştir. Bu karakterizasyon sonuçları dikkate alınarak, sunulan tez çalışması kapsamında Pasaj-11'de bulunan hücreler her 4 günde bir 75 cm^2'lik hücre kültür flasklarında pasajlanmış ve çalışma için gerekli olan MC3T3-E1 hücre miktarı elde edilene kadar pasajlama işlemine devam edilmiştir.

4.8.2. Toksisite Çalışmaları

MC3T3-E1 hücreleri, yüzeye bağımlı olarak üreyen hücrelerdir. AMX yüklü farklı PLGA nanopartiküllerin (m_{PLGA}/m_{AMX}, w/w: 15) farklı miktarlarının MC3T3-E1 hücrelerinin proliferasyonu üzerindeki etkisi 6 mm x 1mm boyutlarındaki nanokompozit doku iskeleleri kullanılarak, 7 gün süren *in-vitro* hücre kültür

çalışmaları ile incelenmiştir. İskele başına $1x10^6$ hücre olacak şekilde hücre yoğunluğu kullanılarak 3 paralel örnek ile çalışmalar gerçekleştirilmiştir. Hücre canlılıkları kültürün 1., 3. ve 7. günlerinde MTT analizi ile belirlenmiştir. Çalışma kapsamında kontrol grubu olarak, AMX yüklü PLGA nanopartikül içermeyen nanokompozit doku iskeleleri (B-HAp/kitosan) ile etkileştirilen hücreler kullanılmıştır. MTT analizi sonucunda, hücrelerin mitokondriyal aktiviteleri ile doğrudan ilişkili olan optik yoğunluk değerleri elde edilmiştir. Analiz sonucunda belirlenen optik yoğunluk değerleri grafiksel olarak Şekil 4.20'de sunulmuştur.



Şekil 4.20: Nanokompozit doku iskeleleri üzerinde kültüre edilen MC3T3-E1 hücrelerine ait MTT sonuçları. (İstatistiksel olarak anlamlı farklar, B-HAp/Kitosan doku iskelesi kontrol grubu iken: n=3, * $p<0.05$, ** $p<0.01$, *** $p<0.001$; Her bir iskele grubunun 1'inci gün örnekleri kontrol grubu iken: n=3, • $p<0.05$, • • $p<0.01$, • • • $p<0.001$).

Şekil 4.20'de verilen MTT grafiği incelendiğinde, kontrol grubunun B-HAp/kitosan doku iskelesi olduğu durumda, kültürün tüm günleri için AMX-PLGA (1 mg)/B-HAp/kitosan nanokompozit doku iskelelerinin MTT değerlerinin kontrol grubuna göre kültürün başlangıç gününden itibaren istatistiksel olarak anlamlı derecede düşük olduğu belirlenmiştir. Benzer şekilde, AMX-PLGA (2.5 mg)/B-HAp/kitosan nanokompozit doku iskelelerinin MTT değerlerinin de kontrol grubuna göre kültürün 1'inci ve 7'nci günlerinde istatistiksel olarak düşük olduğu tespit edilmiştir. AMX-

PLGA (0.5 mg)/B-HAp/kitosan doku iskelelerine ait MTT değerleri incelendiğinde ise kültürün tüm günleri için kontrol grubu ile aralarında istatistiksel olarak anlamlı bir fark olmadığı gözlenmiştir ($p>0.05$). Her bir iskele grubunun 1'inci gün örnekleri kontrol grubu iken, AMX-PLGA (1 mg)/B-HAp/kitosan doku iskelelerinin 3'üncü gün MTT değerlerinin, AMX-PLGA (2.5 mg)/B-HAp/kitosan doku iskelelerinin ise 3'üncü ve 7'nci gün MTT değerlerinin kontrol gruplarına göre istatistiksel olarak düşük olduğu belirlenmiştir. Sonuç olarak, iskelelerden salınan AMX'in MC3T3-E1 hücrelerinin proliferasyonu üzerindeki etkisi net bir şekilde belirlenememiştir. Ancak, AMX'in düşük miktarlarının MC3T3-E1 hücreleri üzerinde toksik bir etkisinin olmadığı gözlenmiştir. Dolayısıyla, B-HAp ile birlikte kullanılan AMX'in düşük miktarlarının MC3T3-E1 hücre proliferasyonunu inhibe etmeyeceği, yüksek miktarlarının ise hücre proliferasyonunu inhibe edeceği düşünülmüştür.

Antibiyotiklerin, insan embriyonik böbrek hücresinin (HEK293) proliferasyonu ve hücre döngüsü üzerindeki etkisinin incelendiği bir çalışmada, 10-150 μM derişim aralığındaki AMX'in hücreler üzerindeki etkisi incelenmiştir. Bu kapsamda, distile su ile AMX stok çözeltisi hazırlanarak seyreltme işlemleri yapılmış ve yaklaşık $32x10^4$ hücre/cm^2 hücre yoğunluğuna sahip hücreler ile AMX çözeltileri etkileştirilmiştir. Farklı AMX derişimlerinin AMX'in hücre canlılığına etkisi MTT analizi ile belirlenmiştir. Altı gün süren *in-vitro* hücre kültür çalışmalarında, kültürün tüm günleri için 10-150 μM AMX derişim aralığının hücreler üzerinde toksik bir etkisinin olmadığı vurgulanmıştır [148]. Bir başka çalışmada ise, AMX'in alabalık hepatosit hücresi (PLHC-1) üzerinde toksik etkisinin olup olmadığı incelenmiş ve 0-500 μM derişim aralığındaki AMX'in hücreler üzerinde herhangi bir toksik etkisinin bulunmadığı belirtilmiştir [149]. Sunulan tez çalışması kapsamında ise 7 günlük *in-vitro* çalışmalarda hücre kültür ortamına salınan AMX derişimi 5-25 μM aralığında değişmektedir. İlgili literatürde AMX derişiminin bu değerlerde (5-25 μM) herhangi bir toksik etkisinin bulunmadığı belirtilmesine rağmen Şekil 4.20 incelendiğinde AMX-PLGA (2.5 mg)/B-HAp/kitosan doku iskelelerinin (25 μM AMX) MTT değerlerinin göre kültürün başlangıç gününden itibaren istatistiksel olarak anlamlı derecede azaldığı belirlenmiştir. Bu durumun, B-HAp ile AMX'in birlikte kullanıldığı durumlarda yüksek AMX derişimlerinin hücre proliferasyonunu inhibe etmesinden kaynaklandığı düşünülmüştür.

5. GENEL SONUÇLAR

Tez çalışması kapsamında, beta-laktam antibiyotikleri ile B-HAp arasındaki sinerjik etki hem bakteriyel hem de hücre kültürü çalışmaları ile incelenmiştir. Sinerjik etkinin incelenmesi amacıyla, klinikte sıklıkla tercih edilen ve beta-laktam antibiyotiklerin "penisilinler" grubundan olan AMX antibiyotiği kullanılmıştır. Sunulan çalışmada ilk olarak, biyomimetik yöntem ile HAp ve B-HAp üretimi gerçekleştirilmiştir. Ardından AMX yüklü PLGA nanopartiküller üretilerek B-HAp/kitosan nanokompozit doku iskelesi yapısına katılmıştır. *İn-vitro* salım çalışmaları ile PLGA nanopartiküllerinden ve nanokompozit doku iskelelerinden salınan AMX'in kümülatif salım profilleri oluşturularak salım kinetikleri belirlenmiştir. Ardından, *in-vitro* hücre kültür çalışmaları ile toksisite çalışmaları gerçekleştirilmiş ve AMX içeren PLGA nanopartikül yüklü B-HAp/kitosan doku iskelelerinin MC3T3-E1 hücreleri üzerindeki etkisi incelenmiştir. Çalışmanın son kısmında ise, bakteriyel çalışmalar ile AMX ile B-HAp arasındaki sinerjik etki 4 farklı bakteri suşu ve 3 farklı yöntem kullanılarak incelenmiştir. Tez çalışması kapsamında elde edilen sonuçlar aşağıda sunulmuştur.

- PLGA nanopartiküllerin ikili-emülsiyon hazırlama-çözücü buharlaştırma yöntemi ile üretiminde, ikinci sulu faza (w2) eklenen AMX miktarının enkapsülasyon verimi üzerinde belirleyici bir faktör olduğu görülmüştür.
- AMX yüklü PLGA nanopartiküllerin hazırlanmasında iki farklı derişimde kullanılarak w2 fazı hazırlanmıştır. Bu derişimler; 14 mM (m_{PLGA}/m_{AMX}, w/w: 15) ve 19 mM (m_{PLGA}/m_{AMX}, w/w: 15)'dır. Bu partiküllerin enkapsülasyon verimleri sırasıyla, % 30.3 $\pm$ 4.04 ve % 36.5 $\pm$ 0.71 olarak belirlenmiştir. Enkapsülasyon verimleri dikkate alınarak çalışmanın devamında 19 mM derişime sahip w2 fazı kullanılmıştır.
- Boş PLGA nanopartiküllerin ve AMX yüklü PLGA nanopartiküllerin ortalama partikül çapları sırasıyla, 187.6 $\pm$ 61.95 nm ve 182.4 $\pm$ 75.87 nm olarak belirlenmiştir.
- Nanokompozit doku iskeleleri dondurarak kurutma yöntemi ile üretilmiştir. İskelelerin sterilizasyonu etilen oksit gazı ile yapılmıştır.
- AMX yüklü PLGA nanopartiküller doku iskelesi üretim aşamasında kitosan çözeltisi içerisine eklenerek nanokompozit doku iskelelerinin yapısına katılmıştır.

- AMX içeren PLGA nanopartiküller ile gerçekleştirilen 85 günlük *in-vitro* salım çalışmaları sonucunda, AMX salımının kontrollü bir şekilde gerçekleştiği belirlenmiştir. Ayrıca, AMX salım profili matematiksel olarak incelenerek salım kinetiğinin Higuchi salım modeline uyduğu belirlenmiştir. Dolayısıyla, PLGA nanopartiküllerden AMX salımının difüzyon mekanizması ile gerçekleştiği gözlenmiştir.
- AMX içeren PLGA nanopartikül yüklü B-HAp/kitosan nanokompozit doku iskeleleri ile gerçekleştirilen 70 günlük *in-vitro* salım çalışmaları sonucunda, AMX salımının kontrollü bir şekilde gerçekleştiği belirlenerek salım profilinin Higuchi salım modeline uyduğu gözlenmiştir. Dolayısıyla AMX'in iskelelerden salımında difüzyon mekanizmasının etkili olduğu görülmüştür.
- AMX içeren PLGA nanopartikül yüklü B-HAp/kitosan nanokompozit doku iskelelerinin hücreler üzerindeki etkisinin incelenmesi amacı ile farklı miktarlarda PLGA nanopartikül içeren B-HAp/kitosan doku iskeleleri MC3T3-E1 fare kemik öncül hücreleri ile etkileştirilmiştir. Yedi gün süren *in-vitro* hücre kültürü çalışmaları sonucunda AMX'in hücre proliferasyonu üzerindeki etkisi tam olarak gözlenememiştir. Fakat, AMX'in düşük miktarlarının (iskele başına, 0.5 mg partikül=20 µg AMX) MC3T3-E1 hücreleri üzerinde toksik bir etkisinin olmadığı belirlenmiştir.
- AMX ile B-HAp arasındaki sinerjik etkinin gösterilmesi amacı ile gerçekleştirilen bakteriyel çalışmalarda, farklı beta-laktam antibiyotikleri ile farklı bakteri suşları 3 farklı yöntem kullanılarak etkileştirilmiştir. B-HAp'ın beta-laktam antibiyotiklerde bulunan beta-laktam halkasının karbonil işlevselliğini taklit etmesi sonucu, beta-laktamların beta-laktamazlara karşı etkinliklerini korudukları belirlenmiştir. Dolayısıyla, AMX ile B-HAp arasındaki sinerjik etki gözlemlenerek elde edilen sonuçların birbirlerini destekledikleri görülmüştür.

Tez çalışması kapsamında elde edilen sonuçlar ışığında, beta-laktam antibiyotiği salan ve bor içeren doku iskelelerinin kemik dokusunun yenilenmesinde hücresel ve antibakteriyel özellikleri ile etkin bir biçimde kullanılabilecekleri belirtilmiştir.

6. KAYNAKLAR

[1] Irmak, G., Demirtaş, T.T., Çetin-Altındal, D., Çalış, M., Gümüşderelioğlu, M., Sustained release of 17β-estradiol stimulates osteogenic differentiation of adipose tissue-derived mesenchymal stem cells on chitosan-hydroxyapatite scaffolds, *Cells Tissues Organs*, 199, 37–50, **2014**.

[2] Buckwalter, J.A., Glimcher, M.J., Cooper, R.R., Recker, R., Bone biology-Part II. Formation form, modeling, remodeling, and regulation of cell function, *Journal of Bone and Joint Surgery-Series A*, 77, 1276–1289, **1995**.

[3] Carano, R.A., Filvaroff, E. H., Angiogenesis and bone repair, *Drug Discovery Today*, 8, 980–989, **2003**.

[4] Akkan, H.A., Karaca, M., Veteriner iç hastalıklarında antibiyotiklerin kullanımı, *Yüzüncü Yıl Üniversitesi Veteriner Fakültesi Dergisi*, 14, 72–77, **2003**.

[5] Başoğlu, A*., Veteriner İç Hastalıklarında Genel Tedavi*, Selçuk Üniversitesi Basımevi, Konya, 109–160, **2000**.

[6] Kayaalp, S.O., *Rasyonel Tedavi Yönünden Tıbbi Farmakoloji*, 10. baskı. Hacettepe Taş Kitapçılık Limited Şti.,Ankara, **2002**.

[7] Şanlı, Y., Kaya, S., *Veteriner Farmakoloji ve İlaçla Sağıtım Seçenekleri*, Medisan Yayınevi*,* Ankara, 571–650, **1994**.

[8] Tenover, F.C., Hughes, J.M., The challenges of emerging infectious diseases: development and spread of multiply-resistant bacterial pathogens, *The Journal of the American Medical Association,* 275, 300–304, **1996**.

[9] Gold, H.S., Moellering Jr, R.C., Antimicrobial-drug resistance, *New England Journal of Medicine*, 335, 1445–1453, **1996**.

[10] Maiti, S.N., Phillips, O.A., Micetich, R.G., Livermore, D. M., Beta-lactamase inhibitors: agents to overcome bacterial resistance, *Current Medicinal Chemistry*, 5, 441–456, **1998**.

[11] Cohen, M.L., Epidemiology of drug resistance: implications for a post-antimicrobial era, *Science (Washington)*, 257, 1050–1055, **1992**.

[12] Stigter, M., De Groot, K., Layrolle, P., Incorporation of tobramycin into biomimetic hydroxyapatite coating on titanium, *Biomaterials*, 23, 4143–4153, **2002**.

[13] Laurencin, C.T., Ambrosio, A.M.A., Borden, M.D., Cooper Jr, J.A., Tissue engineering: orthopedic applications, *Annual Review Of Biomedical Engineering*, 1, 19–46, **1999**.

[14] Langer, R., Vacanti, J.P., Tissue engineering, *Science*, 260, 920–926, **1993**.

[15] Liu, X., Ma, P.X., Polymeric scaffolds for bone tissue engineering, *Annals of Biomedical Engineering*, 32, 477-486, **2004**.

[16] Huri, P.Y., Hasırcı, N., Hasırcı, V., Kemik doku mühendisliği, *Arşiv Kaynak Tarama Dergisi*, 19, 206-219, **2010**.

[17] Sommerfeldt, D., Rubin, C., Biology of bone and how it orchestrates the form and function of the skeleton, *European Spine Journal*, 10, S86–S95, **2001**.

[18] Liu, M., Zeng, X., Ma, C., Yi, H., Ali, Z., Mou, X., Li, S., Deng, Y., He, N., Injectable hydrogels for cartilage and bone tissue engineering, *Bone Research*, 5, 17014, **2017**.

[19] Salgado, A.J., Coutinho, O.P., Reis, R.L., Bone tissue engineering: state of the art and future trends, *Macromolecular Bioscience*, 4, 743–765, **2004**.

[20] Rezvani, Z., Venugopal, J.R., Urbanska, A.M., Mills, D.K., Ramakrishna, S., Mozafari, M., A bird's eye view on the use of electrospun nanofibrous scaffolds for bone tissue engineering: Current state-of-the-art, emerging directions and future trends, *Nanomedicine: Nanotechnology, Biology and Medicine*, 12, 2181–2200, **2016**.

[21] Gümüşderelioğlu M., Maviş B., Karakeçili A., Kahraman A. S., Çakmak S., Tığlı S., Demirtaş T. T. and Aday S., Doku mühendisliğinde nanoteknoloji, *Bilim ve Teknik: Yeni Ufuklara*,1–12, **2007**.

[22] Hutmacher, D.W., Schantz, J.T., Lam, C.X.F., Tan, K.C., Lim, T.C., State of the art and future directions of scaffold-based bone engineering from a biomaterials perspective, *Journal of Tissue Engineering and Regenerative Medicine*, 1, 245–260, **2007**.

[23] Chen, G., Ushida, T., Tateishi, T., Scaffold design for tissue engineering, *Macromolecular Bioscience*, 2, 67–77, **2002**.

[24] Khan, Y., Yaszemski, M.J., Mikos, A.G., Laurencin, C.T., Tissue engineering of bone: material and matrix considerations, *Journal of Bone and Joint Surgery*, 90, 36–42, **2008**.

[25] Seol, Y.J., Lee, J.Y., Park, Y.J., Lee, Y.M., Ku, Y., Rhyu, I.C., Lee, S.J., Han, S.B., Chung, C.P., Chitosan sponges as tissue engineering scaffolds for bone formation, *Biotechnology Letters*, 26, 1037–1041, **2004**.

[26] Thein-Han, W.W., Kitiyanant, Y., Misra, R.D.K., Chitosan as scaffold matrix for tissue engineering, *Materials Science and Technology*, 24, 1062–1075, **2008**.

[27] Tunçay, E.Ö., Demirtaş, T.T., Gümüşderelioğlu, M., Microwave-induced production of boron-doped HAp (B-HAp) and B-HAp coated composite scaffolds, *Journal of Trace Elements in Medicine and Biology*, 40, 72–81, **2017**.

[28] Gerçek-Beşkardeş, I., *Biyoseramik ve biyosinyal moleküllerle desteklenmiş poli(kaprolakton) doku iskeleleri: Sentez, karakterizasyon ve kemik doku mühendisliği uygulamaları*, Yüksek Lisans Tezi, Hacette Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü, Ankara, **2008**.

[29] Irmak, G., *β-Estradiol yüklü doku iskeleleri ile in-vitro kemik doku mühendisliği*, Yüksek Lisans Tezi, Hacettepe Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü, Ankara, **2013**.

[30] Gümüşderelioğlu, M., Tunçay, E.Ö., Kaynak, G., Demirtaş, T.T., Tığlı- Aydın, S., Hakkı, S.S., Encapsulated boron as an osteoinductive agent for bone scaffolds, *Journal of Trace Elements in Medicine and Biology*, 31, 120–128, **2015**.

[31] Topal, M., Şenel, G.U., Topal, I.A., Öbek, E., Antibiyotikler ve kullanım alanları, *Erciyes Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Dergisi*, 31, 121–127, **2015**.

[32] ANKEM :Antibiyotik ve Kemoterapi Derneği., http://www.ankemdernegi.org.tr/?dp=sizdengelenler&yaziID=66 (Eylül, **2017**).

[33] Bakır, M., Antibiyotik kullanımının temel ilkeleri, *Klimik Dergisi*, 14, 95–101, **2001**.

[34] Bilgin, Y., *Escherichia coli, Klebsiella pneumoniae, Pseudomonas aeruginosa, Acinetobacter baumannii ve Staphylococcus aureus suşlarında çeşitli aminoglikozidlerin duyarlılıklarının araştırılması*, Uzmanlık Tezi, Haseki Eğitim ve Araştırma Hastanesi, İstanbul, **2006**.

[35] Antibiyotiklerin etki mekanizmaları/Antibiyotikler, https://antibiyotikler.wordpress.com/antibiyotikler/antibiyotiklerin-etkimekanizmalari (Eylül, **2017**).

[36] Spanu, T., Santangelo, R., Andreotti, F., Cascio, G.L., Velardi, G., Fadda, G., Antibiotic therapy for severe bacterial infections: correlation between the inhibitory quotient and outcome, *International Journal of Antimicrobial Agents*, 23, 120–128, **2004**.

[37] Klinik mikrobiyolojide antibiyotik kullanımı, Doç. Dr. Meltem Yalınay Çırak, http://www.azkurs.org/klinik-mikrobiyolojide-antibiyotik-kullanimi-doc-dr-meltem-yal.html (Eylül, **2017**).

[38] Akkan, A.G., Antibiyotiklerin Sınıflandırılmaları, *Pratikte Antibiyotik Kullanımı Sempozyumu*, 53-62, **1997**.

[39] Béahdy, J., Recent developments of antibiotic research and classification of antibiotics according to chemical structure, *Advances in Applied Microbiology*, 18, 309–406, **1974**.

[40] Öncül, O., Antibiyotik I, *Akılcı Antibiyotik Kullanımı Ve Erişkinde Toplumdan Edinilmiş Enfeksiyonlar Sempozyum Dizisi*, 31, **2002**.

[41] TUSOM-Pharmwiki,.http://tmedweb.tulane.edu/pharmwiki/lib/exe/detail.php/betalactam_structure.png?id=betalactam_pharm. (Ekim, **2017**).

[42] Gılman, A.G., Molınoff, P.B., Ruddon, R.W., *The Pharmacological Basis Of Therapeutics*, 9. baskı. New York: Mc Graw Hill, **1996**.

[43] Katzung, B.G., *Basic And Clinical Pharmacology*, 7. baskı. Connecticut: Appleton and Lange, **1998**.

[44] Kayaalp, O., *Tıbbi Farmakoloji*, 8. baskı, Hacettepe Taş Kitapçılık Limited Şti., Ankara, **1998**.

[45] Matagne, A., Lamotte-Brasseur, J., Frère, J.M., Catalytic properties of class A β-lactamases: efficiency and diversity, *Biochemical Journal*, 330, 581–598, **1998**.

[46] Şimşek, F.Ç., *Deneysel konvülsif nöbetlere ketaminin etkisi*, Yüksek Lisans Tezi, Trakya Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü, Edirne, **1995**.

[47] Çelik, H.D., *Amoksisilinin insan plazmasında HPLC ile miktar tayini yöntemi ve validasyonu*, Yüksek Lisans Tezi, Gazi Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü, Ankara, **2007**.

[48] Saraç, S., *Amoksisilinden hareketle tetrahidro-2H-1,3,5-tiadiazin-2-tion türevi bileşiklerin sentezleri ve antibakteriyel etkileri*, Doktora tezi, Hacettepe üniversitesi, Sağlık Bilimleri Enstitüsü, Ankara, **1988**.

[49] Amoxicillin-Sigma-Aldrich, http://www.sigmaaldrich.com/catalog/substance/amoxicillin365402678778011?lang=en&region=TR. (Ekim, **2017**).

[50] Finberg, R.W., Moellering, R.C., Tally, F.P., Craig, W.A., Pankey, G.A., Dellinger, E.P., West, M.A., Joshi, M., Linden, P.K., Rolston, K.V., Rotschafer, J.C., Rybak, M.J. The importance of bactericidal drugs: future directions in infectious disease, *Clinical Infectious Diseases*, 39, 1314–1320, **2004**.

[51] Hou, J.P., Poole, J.W., The amino acid nature of ampicillin and related penicillins, *Journal of Pharmaceutical Sciences*, 58, 1510–1515, **1969**.

[52] Hou, J.P., Poole, J.W., Kinetics and mechanism of degradation of ampicillin in solution, *Journal of Pharmaceutical Sciences*, 58, 447–454, **1969**.

[53] Hou, J.P., Poole, J.W., Measurement of β-lactamase activity and rate of inactivation of penicillins by a pH-stat alkalimetric titration method, *Journal of Pharmaceutical Sciences*, 61, 1594–1598, **1972**.

[54] Acartürk, F., Amoksisilin sodyum'un katı hal stabilitesi üzerine bir çalışma, *Marmara Üniversitesi Eczacılık Fakültesi Dergisi*, 5, 31-41, **1989**.

[55] Livermore, D.M., Of Pseudomonas, porins, pumps and carbapenems, *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, 47, 247–250, **2001**.

[56] Trippier, P.C., McGuigan, C., Boronic acids in medicinal chemistry: anticancer, antibacterial and antiviral applications, *Medicinal Chemistry Communications*, 1, 183–198, **2010**.

[57] Mayer, K.H., Opal, S.M., Medeiros, A.A., Mechanisms of antibiotic resistance. *Principles and Practice of Infectious Diseases, (eds: Mandell, G.L., Douglas, R.G.Jr., Bennett, J.E.),* New York: Churchill Livinsgtone, 212–224, **1995**.

[58] Medeiros, A.A., Evolution and dissemination of β-lactamases accelerated by generations of β-lactam antibiotics, *Clinical Infectious Diseases*, 24, S19–S45, **1997**.

[59] Yüce-Fırat P., *Genişlemiş spektrumlu beta-laktamaz üreten Escherichia coli ve Klebsiella sp. suşlarının karbapenem ve beta-laktamaz inhibitörlü kombinasyonlara karşı duyarlılıklarının araştırılması*, Uzmanlık Tezi, Fırat Üniversitesi Tıp Fakültesi, Elazığ, **2005**.

[60] Özsoy, M.F., Öncül, O., Yıldırım, A., Pahsa, A., Genişlemiş spektrumlu beta-laktamazlar: klinik önemi ve getirdiği sorunlar, *Flora*, 6, 3–23, **2001**.

[61] Poirel, L., Nordmann, P., Acquired carbapenem-hydrolyzing beta-lactamases and their genetic support, *Current Pharmaceutical Biotechnology*, 3, 117–127, **2002**.

[62] Rawat, D., Nair, D., Extended-spectrum β-lactamases in Gram-negative bacteria, *Journal of Global İnfectious Diseases*, 2, 263–274, **2010**.

[63] Gür, D., Pitt, T.L., Hall, L.M.C., Akahn, H.E., Livermore, D.M., Diversity of *klebsiellae* with extended-spectrum β-lactamases at a Turkish university hospital, *Journal of Hospital Infection*, 22, 163–167, **1992**.

[64] Günseren, F., Mamikoğlu, L., Öztürk, S., Yücesoy, M., Biberoğlu, K., Yulug, N., Doğanay, M., Sümerkan, B,, Kocagoz, S., Unal, S.A., Surveillance study of antimicrobial resistance of Gram-negative bacteria isolated from intensive care units in eight hospitals in Turkey, *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, 43, 373-378, **1999**.

[65] Jacoby, G.A., Medeiros, A.A., More extended-spectrum beta-lactamases, *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 35, 1697-1704, **1991**.

[66] Quinn, J.P., Clinical significance of extended-spectrum beta-lactamases, *European Journal of Clinical Microbiology and Infectious Diseases*, 13, S39–S42, **1994**.

[67] Lin, M.F., Huang, M.L., Lai, S.H., Risk factors in the acquisition of extended-spectrum β-lactamase *Klebsiella pneumoniae*: a case–control study in a district teaching hospital in Taiwan, *Journal of Hospital Infection*, 53, 39–45, **2003**.

[68] Nordmann, P., Guibert, M., Extended-spectrum β-lactamases in *Pseudomonas aeruginosa*, *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, 42, 128–131, 1**998**.

[69] TUSOM-Pharmwiki, http://tmedweb.tulane.edu/pharmwiki/doku.php/betalactam_pharm. (Kasım, **2017**)

[70] Özdemir, T., *Yara yerinden izole edilen Staphylococcus aureus suşlarının biyofilm oluşumunun konvansiyonel ve moleküler yöntemlerle incelenmesi*, Yüksek Lisans Tezi, Gazi Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü, Ankara, **2014**.

[71] Şen, E., Özdemir, H., *Staphylococcus aureus*'un antibiyotik dirençliliği ve halk sağlığı açısından önemi, *Elektronik Mikrobiyoloji Dergisi*, 14, 20–35, **2016**.

[72] Sancak, B., *Staphylococcus aureus* ve antibiyotik direnci, *Mikrobiyoloji Bülteni*, 45, 565–576, **2011**.

[73] Bilgehan, H., *Enterobacteriaceae, Klinik Mikrobiyolojik Tanı,* Fakülteler Kitabevi, Ankara, **1992**.

[74] Medeiros, A. A., Beta-lactamases, *British Medical Bulletin*, 40, 18–27, **1984**.

[75] Datta, N., Kontomichalou, P., Penicillinase synthesis controlled by infectious R factors in *Enterobacteriaceae*, *Nature*, 208, 239–241, **1965**.

[76] Sirot, D., Extended-spectrum plasmid-mediated β-lactamases, *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, 36, 19–34, **1995**.

[77] Podschun, R,. Ullmann, U., *Klebsiella spp.* as nosocomial pathogens: epidemiology, taxonomy, typing methods, and pathogenicity factors, *Clinical Microbiology Reviews*, 11, 589–603, **1998**.

[78] Morgan, M.E.I., Hart, C.A., Cooke, R.W.I., *Klebsiella* infection in a neonatal intensive care unit: role of bacteriological surveillance, *Journal of Hospital Infection*, 5, 377–385, **1984**.

[79] Knothe, H., Shah, P., Krcmery, V., Antal, M., Mitsuhashi, S., Transferable resistance to cefotaxime, cefoxitin, cefamandole and cefuroxime in clinical isolates of *Klebsiella pneumoniae* and *Serratia marcescens*, *Infection*, 11, 315–317, **1983**.

[80] Quinn, J.P., Miyashiro, D., Sahm, D., Flamm, R., Bush, K., Novel plasmid-mediated beta-lactamase (TEM-10) conferring selective resistance to ceftazidime and aztreonam in clinical isolates of *Klebsiella pneumoniae*", *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 33, 1451–1456, **1989**.

[81] Bush, K., Beta-lactamase inhibitors from laboratory to clinic, *Clinical Microbiology Reviews*, 1, 109–123, **1988**.

[82] Babic, M., Hujer, A.M., Bonomo, R.A., What's new in antibiotic resistance? Focus on beta-lactamases, *Drug Resistance Updates*, 9, 142–156, **2006**.

[83] Rudgers, G.W., Palzkill, T., Protein minimization by random fragmentation and selection, *Protein Engineering*, 14, 487–492, **2001**.

[84] Hecker, S.J., Reddy, K.R., Totrov, M., Hirst, G.C., Lomovskaya, O., Griffith, D.C., King, P., Tsivkovski, R., Sun, D., Sabet, M., Tarazi, Z., Clifton, M.C., Atkins, K., Raymond, A., Potts, K.T., Abendroth, J., Boyer, S.H., Loutit, J.S., Morgan, E.E., Durso, S., Dudley, M.N., Discovery of a cyclic boronic acid β-lactamase inhibitor (RPX7009) with utility vs class A serine carbapenemases, *Journal of Medicinal Chemistry*, 58, 3682-3692, **2015**.

[85] Kiener, P.A., Waley, S.G., Reversible inhibitors of penicillinases, *Biochemical Journal*, 169, 197–204, **1978**.

[86] Murugan, R., Ramakrishna, S., Development of nanocomposites for bone grafting, *Composites Science and Technology*, 65, 2385–2406, **2005**.

[87] Uysal, U., *Nano ve mikron boyutta hidroksiapatit üretimine proses parametrelerinin etkisinin incelenmesi*, Doktora Tezi, Yıldız Teknik Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü, İstanbul, **2012**.

[88] Tunçay, Ö.E., *Biyomimetik yöntemle bor katkılı doku iskelelerinin geliştirilmesi ve kemik doku mühendisliğindeki etkinliklerinin araştırılması*, Yüksek Lisans Tezi, Hacettepe Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü, Ankara, **2013**.

[89] Shepherd, J.H., Shepherd, D.V., Best, S.M., Substituted hydroxyapatites for bone repair, *Journal of Materials Science: Materials in Medicine*, 23, 2335–2347, **2012**.

[90] Aday, S., Gümüşderelioğlu, M., Bone-like apatite-coated chitosan scaffolds: Characterization and osteoblastic activity, *Polymer Composites*, 31, 1418–1426, **2010**.

[91] Barrere, F., Van Blitterswijk C.A., De Groot, K., Layrolle, P., Influence of ionic strength and carbonate on the Ca-P coating formation from SBFx5 solution, *Biomaterials*, 23, 1921–1930, **2002**.

[92] Maviş, B., Demirtaş, T.T., Gümüşderelioğlu, M., Gündüz, G., Çolak, Ü., Synthesis, characterization and osteoblastic activity of polycaprolactone nanofibers coated with biomimetic calcium phosphate, *Acta Biomaterialia*, 5, 3098–3111, **2009**.

[93] Kaynak, G., *Mikrodalga destekli çapraz bağlanma/çökeltme reaksiyonları ile kitosan-HA doku iskelelerinin hazırlanması ve kemik doku mühenlisliğinde kullanımının araştırılması*, Yüksek Lisans Tezi, Hacettepe Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü, *Ankara*, **2012**.

[94] Demirtaş, T.T., Kaynak, G., Gümüşderelioğlu, M., Bone-like hydroxyapatite precipitated from 10xSBF-like solution by microwave irradiation, *Materials Science and Engineering: C*, 49, 713–719, **2015**.

[95] Devirian, T.A., Volpe, S.L., The physiological effects of dietary boron, *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 43, 219-231, **2003**.

[96] Naghii, M.R., Torkaman, G., Mofid, M., Effects of boron and calcium supplementation on mechanical properties of bone in rats, *Biofactors*, 28, 195–201, **2006**.

[97] Şengül, E., *Kemik rejenerasyonu için bor-katkılı doku iskelelerinin geliştirilmesi*, Yüksek Lisans Tezi, Hacette Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Ankara, **2012**.

[98] Bakirdere, S., Orenay, S., Korkmaz, M., Effect of boron on human health, *The Open Mineral Processing Journal*, 3, 54-59, **2010**.

[99] Penland, J.G., Dietary boron, brain function, and cognitive performance, *Environmental Health Perspectives*, 102, 65-72, **1994**.

[100] Gorustovich, A.A., Steimetz, T., Nielsen, F.H., Guglielmotti, M.B., A histomorphometric study of alveolar bone modelling and remodelling in mice fed a boron-deficient diet, *Archives of Oral Biology*, 53, 677–682, **2008**.

[101] Hakki, S.S., Bozkurt, B.S., Hakki, E.E., Boron regulates mineralized tissue-associated proteins in osteoblasts (MC3T3-E1), *Journal of Trace Elements in Medicine and Biology*, 24, 243–250, **2010**.

[102] Ternane, R., Cohen-Adad, M. T., Panczer, G., Goutaudier, C., Kbir-Ariguib, N., Trabelsi-Ayedi, M., Florian P., Massiot, D., Introduction of boron in hydroxyapatite: synthesis and structural characterization, *Journal of Alloys and Compounds*, 333, 62-71, **2002**.

[103] Kalelioğlu, D., *Kemik doku implant malzemeleri: osseointegrasyon ve antibakteriyel etkinlik*, Yüksek Lisans Tezi, Hacettepe Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü, Ankara, **2015**.

[104] Shıkhaliyeva, İ., Mezenkimal kök hücrelerin osteojenik farklılaşmasının bor katkılı HAp-kaplı kitosan doku iskelelerinde incelenmesi, Yüksek Lisans Tezi, Hacettepe Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü, Ankara, **2015**.

[105] Sağlam, M., Köseoğlu, S., Enhoş, Ş., Periodontolojide Bor, *Sağlık Bilimleri* Dergisi, 22, 70-75, **2013**.

[106] Arslan, U., Bozkurt, S.B., Hakki, E.E., Findik, D., Hakki, S.S., Boric acid as a promising antibacterial agent for clinical usage, *4th International Symposium on Trace Elements and Minerals in Medicine and Biology*, 9-12 June, Russia, 11, 86–86, **2010**.

[107] Park, K., Controlled drug delivery systems: past forward and future back, *Journal of Controlled Release*, 190, 3–8, **2014**.

[108] Wong, P.T., Choi, S.K., Mechanisms of drug release in nanotherapeutic delivery systems, *Chemical Reviews*, 115, 3388–3432, **2015**.

[109] Pushpamalar, J., Veeramachineni, A.K., Owh, C., Loh, X.J., Biodegradable polysaccharides for controlled drug delivery, *ChemPlusChem*, 81, 504–514, **2016**.

[110] Tamahkar, E., *Poli(Bütilenadipat-ko-Tereftalat) (PBAT) Mikro ve Nanopartiküller: Sentez, Karakterizasyon ve Kurkumin Salım Kinetiğinin İncelenmesi*, Yüksek Lisans Tezi, Hacettepe Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü, **2017**.

[111] Yeo, Y., Park, K., Control of encapsulation efficiency and initial burst in polymeric microparticle systems, *Archives of Pharmacal Research*, 27, 1–12, **2004**.

[112] Huang, X., Brazel, C.S., On the importance and mechanisms of burst release in matrix-controlled drug delivery systems, *Journal of Controlled Release*, 73, 121–136, **2001**.

[113] Zimmer, A., Kreuter, J., Microspheres and nanoparticles used in ocular delivery systems, *Advanced Drug Delivery Reviews*, 16, 61–73, **1995**.

[114] Bramwell, V.W., Perrie, Y., Particulate delivery systems for vaccines, *Critical Reviews in Therapeutic Drug Carrier Systems*, 22, 151–214, **2005**.

[115] Anselmo, A.C., Mitragotri, S., An overview of clinical and commercial impact of drug delivery systems, *Journal of Controlled Release*, 190, 15–28, **2014**.

[116] Mohanraj, V.J., Chen, Y., Nanoparticles-a review, *Tropical Journal of Pharmaceutical Research*, 5, 561–573, **2006**.

[117] Iqbal, M., Zafar, N., Fessi, H., Elaissari, A., Double emulsion solvent evaporation techniques used for drug encapsulation, *International Journal of Pharmaceutics*, 496, 173–190, **2015**.

[118] Derman, S., Kızılbey, K., Akdeste, Z.M., Polymeric nanoparticles, *Sigma*, 31, 107–120, **2013**.

[119] Akagi, T., Baba, M., Akashi, M., Biodegradable nanoparticles as vaccine adjuvants and delivery systems: regulation of immune responses by nanoparticle-based vaccine, *Polymers in nanomedicine* (eds: Kunugi, S., Yamaoka, T.), Heidelberg: Springer, Berlin, 31–64, **2011**.

[120] Nagavarma, B.V.N., Yadav, H.K., Ayaz, A., Vasudha, L.S., Shivakumar, H.G., *Different techniques for preparation of polymeric nanoparticles-a review*, *Asian Journal Pharmaceutical Clinical Research*, 5, 16–23, **2012**.

[121] Staff, R.H., Schaeffel, D., Turshatov, A., Donadio, D., Butt, H.J., Landfester, K., Koynov, K., Crespy, D., Particle formation in the emulsion-solvent evaporation process, *Small*, 9, 3514–3522, **2013**.

[122] Felice, B., Prabhakaran, M.P., Rodríguez, A.P., Ramakrishna, S., Drug delivery vehicles on a nano-engineering perspective, *Materials Science and Engineering: C*, 41, 178–195, **2014**.

[123] Eberhard, N.W., Synthetic polymers as drug-delivery vehicles in medicine, *Metal-Based Drugs*, **2008**, http://doi.org/10.1155/2008/469531

[124] Makadia, H.K., Siegel, S.J., Poly lactic-co-glycolic acid (PLGA) as biodegradable controlled drug delivery carrier, *Polymers*, 3, 1377–1397, **2011**.

[125] Kamaly, N., Yameen, B., Wu, J., Farokhzad, O.C., Degradable controlled-release polymers and polymeric nanoparticles: mechanisms of controlling drug release, *Chemical Rev*iews, 116, 2602–2663, **2016**.

[126] Ivanova, E.P., Bazaka, K., Crawford Natural polymer biomaterials: advanced applications. *New Functional Biomaterials for Medicine and Healthcare*, Woodhead Publishing Limited, UK, **2014**.

[127] Dash, S., Murthy, P.N., Nath, L., Chowdhury, P., Kinetic modeling on drug release from controlled drug delivery systems, *Acta Poloniae Pharmaceutica* 67, 217–23, **2010**.

[128] Xu, Q., Crossley, A., Czernuszka, J., Preparation and characterization of negatively charged poly (lactic-co-glycolic acid) microspheres, *Journal of Pharmaceutical Sciences*, 98, 2377–2389, **2009**.

[129] Tığlı, R.S., Karakeçili, A., Gümüşderelioğlu, M., In vitro characterization of chitosan scaffolds: influence of composition and deacetylation degree, *Journal of Materials Science: Materials in Medicine*, 18, 1665–1674, **2007**.

[130] Habibovic, P., Barrere, F., Blitterswijk, C.A., Groot, K., Layrolle, P., Biomimetic hydroxyapatite coating on metal implants, *Journal of the American Ceramic Society*, 85, 517–522, **2002**.

[131] Farzadi, A., Solati-Hashjin, M., Bakhshi, F., Aminian, A., Synthesis and characterization of hydroxyapatite/β-tricalcium phosphate nanocomposites using microwave irradiation, *Ceramics International*, 37, 65–71, **2011**.

[132] Tadic, D., Epple, M., A thorough physicochemical characterisation of 14 calcium phosphate-based bone substitution materials in comparison to natural bone, *Biomaterials*, 25, 987–994, **2004**.

[133] Bezerra, I.M., Chiavone-Filho, O., Mattedi, S., Solid-liquid equilibrium data of amoxicillin and hydroxyphenylglycine in aqueous media, *Brazilian Journal of Chemical Engineering*, 30, 45–54, **2013**.

[134] Kutlu, C., *Beyin tümörlerinin tedavisi için çift etkili doku iskelesi-nanopartikül sistemlerinin geliştirilmesi*, Yüksek Lisans Tezi, Hacettepe Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü, Ankara, **2011**.

[135] Soppimath, K.S., Aminabhavi, T.M., Kulkarni, A.R., Rudzinski, W.E., Biodegradable polymeric nanoparticles as drug delivery devices, *Journal of Controlled Release*, 70, 1–20, **2001**.

[136] Lee, S.H., Shin, H., Matrices and scaffolds for delivery of bioactive molecules in bone and cartilage tissue engineering, *Advanced Drug Delivery Reviews*, 59, 339–359, **2007**.

[137] Xu, Q., Czernuszka, J.T., Controlled release of amoxicillin from hydroxyapatite-coated poly (lactic-co-glycolic acid) microspheres, *Journal of Controlled Release*, 127, 146–153, **2008**.

[138] Mittal, G., Sahana, D.K., Bhardwaj, V., Kumar, M.R., Estradiol loaded PLGA nanoparticles for oral administration: effect of polymer molecular weight and

copolymer composition on release behavior *in vitro* and *in vivo*, *Journal of Controlled Release*, 119, 77–85, **2007**.

[139] Marques, D.R., Dos Santos, L.A., Schopf, L. F., De Fraga, J.C.S., Analysis of poly (lactic-co-glycolic acid)/poly (isoprene) polymeric blend for application as biomaterial, *Polímeros*, 23, 579–584, **2013**.

[140] Testereci, H.N., Akın-Öktem, G., Öktem, Z., Electrochemical polymerization of 4-allyl-1, 2-dimethoxybenzene, *Reactive and Functional Polymers*, 61, 183–189, **2004**.

[141] Niu, X., Feng, Q., Wang, M., Guo, X., Zheng, Q., *In vitro* degradation and release behavior of porous poly (lactic acid) scaffolds containing chitosan microspheres as a carrier for BMP-2-derived synthetic peptide, *Polymer Degradation and Stability*, 94, 176–182, **2009**.

[142] Çetin-Altındal D., Kemik doku mühendisliği yaklaşımında melatoninin rolü: *İn vitro* çalışmalar, Doktora Tezi, Hacettepe Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü, **2017**.

[143] Sirot, J., Detection of extended-spectrum plasmid-mediated β-lactamases by disk diffusion, *Clinical Microbiology and Infection*, 2, S35-S39, **1996**.

[144] Morandi, S., Morandi, F., Caselli, E., Shoichet, B.K., Prati, F., Structure-based optimization of cephalothin-analogue boronic acids as β-lactamase inhibitors, *Bioorganic & Medicinal Chemistry*, 16, 1195–1205, **2008**.

[145] Albayrak, Ö., Uğurlu, M., Bor katkılı hidroksiapatit üretimi ve karakterizasyonu: Bor oranı ve sinterleme sıcaklığının yapı ve mekanik özellikler üzerindeki etkisi, *Journal of the Faculty of Engineering and Architecture of Gazi University*, 31, 749–761, **2016**.

[146] Coudron, P.E., Inhibitor-based methods for detection of plasmid-mediated AmpC β-lactamases in *Klebsiella spp*., *Escherichia coli*, and *Proteus mirabilis*, *Journal of Clinical Microbiology*, 43, 4163–4167, **2005**.

[147] Aday, S., *Biyomimetik apatit kaplı ve heparin fonksiyonalitesine sahip kitosan doku iskelelerinde kondrosit ve osteoblast aktivitelerinin incelenmesi*, Yüksek Lisans Tezi, Hacettepe Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü, Ankara, **2008**.

[148] Kim, H.Y., Kim, K.T., Kim, S.D., Biochemical effects of veterinary antibiotics on proliferation and cell cycle arrest of human HEK293 cells, *Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology*, 89, 234–239, **2012**.

[149] Laville, N., Aıt-Aıssa, S., Gomez, E., Casellas, C., Porcher, J.M., Effects of human pharmaceuticals on cytotoxicity, EROD activity and ROS production in fish hepatocytes, *Toxicology*, 196, 41–55, **2004**.

7. EKLER

KİTOSAN BAZLI NANOKOMPOZİT DOKU İSKELELERİNDEN SALINAN AMX'İN KÜMÜLATİF SALIM DEĞERLERİNİN HESAPLANMASI

AMX içeren PLGA nanopartikül yüklü B-HAp/kitosan nanokompozit doku iskelelelerinden kümülatif AMX salımının hesaplanması amacıyla *in-vitro* salım deneyleri gerçekleştirilmiştir. Salım deneyleri 10 mL PBS (pH: 7.4) rezervuar ortamı içerisinde yürütülmüştür. Salım ortamı belirli sürelerle taze PBS ortamı ile değiştirilmiştir. Böylece, AMX içeren doku iskelesi ile rezervuar ortamı arasındaki derişim farkı sabit tutulmaya çalışılmıştır. Örnek olarak, ikinci paralel olarak kullanılan nanokompozit doku iskelesinden salınan AMX'e ait kümülatif salım hesaplamaları aşağıda verilmiştir.

Salım ortamı:10 mL PBS,
Yenilenen hacim: 900 µL
Örnek t=1.gün
C=0.0039 mg/mL
Salınan AMX miktarı= 0.0039 mg/mL x 10 mL= 0.039 mg
Atılan AMX miktarı= 0.0039 mg x 0.09=0.0035 mg
Toplam AMX miktarı= 0.039 mg + 0.011 mg =0.050 mg

Önceden atılan AMX miktarı

Kümülatif salım (%)= (0.050 mg/0.25 mg) x 100= %20

İskele başına yüklenen AMX miktarı

Salınan miktar (µg AMX/mg partikül)= (0.050 x 1000) µg/6 mg
=8.7 µg AMX/mg partikül

AMX yüklü PLGA nanopartiküllerin yüklendiği B-HAp/kitosan doku iskelelerinden AMX salımına ait değerler Çizelge 7.1'de verilmiştir.

Çizelge 7.1: AMX yüklü PLGA nanopartiküllerin yüklendiği B-HAp/kitosan doku iskelelerinden AMX salımına ait değerler.

Zaman (gün)	Alan	C (mg/mL)	Salınan AMX (mg)	Atılan AMX (mg)	Toplam AMX (mg)	Kümülatif salım (%)	Salınan Miktar (μg AMX/mg partikül)
0	0.00	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0	0.0000
0.04	2.70	0.0043	0.0426	0.0038	0.0426	17	7.1000
0.12	2.53	0.0040	0.0395	0.0036	0.0434	17	7.2290
0.25	2.47	0.0038	0.0385	0.0035	0.0459	18	7.6421
1	2.51	0.0039	0.0392	0.0035	0.0500	20	8.3390
2	2.44	0.0038	0.0379	0.0034	0.0523	21	8.7167
3	2.44	0.0038	0.0379	0.0034	0.0557	22	9.2855
5	2.40	0.0037	0.0372	0.0033	0.0584	23	9.7343
7	2.35	0.0036	0.0363	0.0033	0.0609	24	10.1423
9	2.20	0.0034	0.0336	0.0030	0.0614	24	10.2368
11	2.36	0.0036	0.0365	0.0033	0.0673	27	11.2208
13	2.31	0.0036	0.0356	0.0032	0.0697	28	11.6180
15	2.34	0.0036	0.0361	0.0033	0.0735	29	12.2417
17	2.39	0.0037	0.0370	0.0033	0.0776	31	12.9335
19	2.33	0.0036	0.0359	0.0032	0.0799	32	13.3088
21	2.31	0.0036	0.0356	0.0032	0.0827	33	13.7879
23	2.32	0.0036	0.0358	0.0032	0.0861	34	14.3516
25	2.26	0.0035	0.0347	0.0031	0.0882	35	14.7080
27	2.20	0.0034	0.0336	0.0030	0.0903	36	15.0482
29	2.28	0.0035	0.0350	0.0032	0.0948	38	15.7922
31	2.17	0.0033	0.0331	0.0030	0.0959	38	15.9878
33	2.16	0.0033	0.0329	0.0030	0.0987	39	16.4537
35	2.13	0.0032	0.0323	0.0029	0.1011	40	16.8569
37	2.10	0.0032	0.0318	0.0029	0.1035	41	17.2520
39	2.00	0.0030	0.0300	0.0027	0.1046	41	17.4290
41	2.10	0.0032	0.0318	0.0029	0.1091	43	18.1790
43	2.00	0.0030	0.0300	0.0027	0.1101	44	18.3560
45	2.24	0.0034	0.0343	0.0031	0.1172	46	19.5260
47	1.92	0.0029	0.0286	0.0026	0.1145	45	19.0808
49	2.10	0.0032	0.0318	0.0029	0.1203	48	20.0492
51	1.93	0.0029	0.0287	0.0026	0.1201	48	20.0162
53	1.89	0.0028	0.0280	0.0025	0.1220	48	20.3273
55	1.99	0.0030	0.0298	0.0027	0.1263	50	21.0476
57	2.13	0.0032	0.0323	0.0029	0.1315	52	21.9149
59	1.94	0.0029	0.0289	0.0026	0.1310	52	21.8300
63	1.92	0.0029	0.0286	0.0026	0.1332	53	22.2038
65	1.97	0.0029	0.0295	0.0027	0.1367	54	22.7822
70	1.94	0.0029	0.0289	0.0026	0.1388	55	23.1341

ÖZGEÇMİŞ

Kimlik Bilgileri

Adı Soyadı : Demet ÇAKIR

Doğum Yeri : KAYSERİ

Medeni Hali : Bekar

E-posta : demet.cakir@hacettepe.edu.tr

Adresi : Koru Mahallesi 2587. Sokak Otuzevler Sitesi 1. Blok Daire no:7 Çayyolu ÇANKAYA/ANKARA

Eğitim

Lise : Ahmet Eren Anadolu Lisesi (2010)

Lisans : Hacettepe Üniversitesi Kimya Mühendisliği Bölümü (İng.) (2015)

Yüksek Lisans : Hacettepe Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Kimya Mühendisliği Ana Bilim Dalı

Yabancı Dil ve Düzeyi

İngilizce (ileri), Almanca (başlangıç).

İş Deneyimi

Araştırma Görevlisi - Hacettepe Üniversitesi Kimya Mühendisliği Bölümü Kimyasal Teknolojiler Anabilim Dalı, Ankara, Türkiye (2017-halen)

Deneyim Alanları

- Hücre ve doku kültürü
- İlaç salım sistemleri
- Biyobozunur polimerler

Tezden Üretilmiş Projeler ve Bütçesi

-

Tezden Üretilmiş Yayınlar

-

Tezden Üretilmiş Tebliğ ve/veya Poster Sunumu ile Katıldığı Toplantılar

Çakır, D., Asghari-Sana F., Gümüşderelioğlu, M., “Synergistic Effect of Beta-Lactam Antibiotics with Boron-Doped Nanohydroxyapatites”, 22nd International Biomedical Science and Technology Symposium, Ankara, Türkiye, 12-14 Mayıs 2017 (Poster sunumu).

Diğer Sunumlar

-

HACETTEPE ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ
YÜKSEK LİSANS/DOKTORA TEZ ÇALIŞMASI ORJİNALLİK RAPORU

HACETTEPE ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLER ENSTİTÜSÜ
KİMYA MÜHENDİSLİĞİ ANABİLİM DALI BAŞKANLIĞI'NA

Tarih: 09/01/2018

Tez Başlığı / Konusu: BETA-LAKTAM ANTİBİYOTİKLERLE SİNERJİK ETKİYE SAHİP BOR KATKILI DOKU İSKELELERİNİN GELİŞTİRİLMESİ

Yukarıda başlığı/konusu gösterilen tez çalışmamın a) Kapak sayfası, b) Giriş, c) Ana bölümler d) Sonuç kısımlarından oluşan toplam 97 sayfalık kısmına ilişkin, 09/01/2018 tarihinde şahsım/tez danışmanım tarafından *Turnitin* adlı intihal tespit programından aşağıda belirtilen filtrelemeler uygulanarak alınmış olan orijinallik raporuna göre, tezimin benzerlik oranı % 4 'tür.

Uygulanan filtrelemeler:
1- Kaynakça hariç
2- Alıntılar hariç/dâhil
3- 5 kelimeden daha az örtüşme içeren metin kısımları hariç

Hacettepe Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Tez Çalışması Orjinallik Raporu Alınması ve Kullanılması Uygulama Esasları'nı inceledim ve bu Uygulama Esasları'nda belirtilen azami benzerlik oranlarına göre tez çalışmamın herhangi bir intihal içermediğini; aksinin tespit edileceği muhtemel durumda doğabilecek her türlü hukuki sorumluluğu kabul ettiğimi ve yukarıda vermiş olduğum bilgilerin doğru olduğunu beyan ederim.

Gereğini saygılarımla arz ederim.

Tarih ve İmza

09.01.2018

Adı Soyadı:	DEMET ÇAKIR
Öğrenci No:	N14327871
Anabilim Dalı:	KİMYA MÜHENDİSLİĞİ
Programı:	YÜKSEK LİSANS
Statüsü:	☒ Y.Lisans ☐ Doktora ☐ Bütünleşik Dr.

DANIŞMAN ONAYI

UYGUNDUR.

Prof. Dr. Menemşe Gümüşderelioğlu

Menemşe G.

(Unvan, Ad Soyad, İmza)