

**SALİNOMİSİN ve BnHAp YÜKLÜ DOKU İSKELELERİNİN
ANTİKANSEROJEN ve ANTİBAKTERİYEL ETKİNLİĞİNİN
ARAŞTIRILMASI**

**INVESTIGATION of ANTICANCEROGEN and
ANTIBACTERIAL EFFECTIVENESS of SALINOMYCIN and
BnHAp LOADED TISSUE SCAFFOLDS**

MELTEM GAMZE ÖZTÜRK

Prof. Dr. Menemşe GÜMÜŞDERELİOĞLU
Tez Danışmanı

Hacettepe Üniversitesi
Lisansüstü Eğitim-Öğretim ve Sınav Yönetmeliğinin
Biyomühendislik Anabilim Dalı için Öngördüğü
YÜKSEK LİSANS TEZİ olarak hazırlanmıştır.

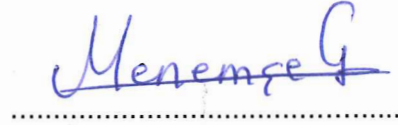
2018

MELTEM GAMZE ÖZTÜRK'ün hazırladığı "Salinomisin ve BnHAp Yüklü Doku İskelelerinin Antikanserojen ve Antibakteriyel Etkinliğinin Araştırılması" adlı bu çalışma aşağıdaki jüri tarafından **BİYOMÜHENDİSLİK ANABİLİM DALI**'nda **YÜKSEK LİSANS TEZİ** olarak kabul edilmiştir.

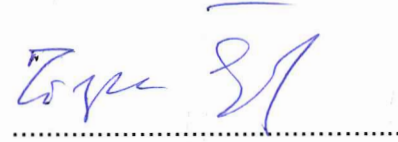
Prof. Dr. Şeniz ÖZALP YAMAN
Başkan



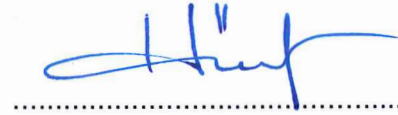
Prof. Dr. Menemşe GÜMÜŞDERELİOĞLU
Danışman



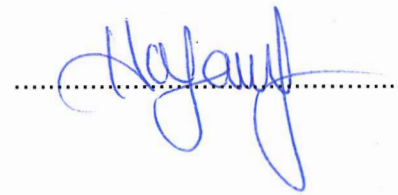
Prof. Dr. M. Tijen BOZDEMİR
Üye



Prof. Dr. Hülya Yavuz ERSAN
Üye



Prof. Dr. Handan YAVUZ ALAGÖZ
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 etmeniz ve kütüphane bu talebinizi yerine getirirse bile, tezinin arama motorlarının önbelleklerinde kalmaya devam edebilecektir.)

- ☒ **Tezimin/Raporumun 06.03.2020 tarihine kadar erişime açılmasını ve fotokopi alınmasını (İç Kapak, Özet, İçindekiler ve Kaynakça hariç) istemiyorum.**

(Bu sürenin sonunda uzatma için başvuruda bulunmadığım takdirde, tezimin/raporumun tamamı her yerden erişime açılabilir, kaynak gösterilmek şartıyla bir kısmı ve ya 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**

06/03/2018



Meltem Gamze ÖZTÜRK

ETİK

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

- 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: 07.02.2018

Meltem Gamze ÖZTÜRK

ÖZET

SALİNOMİSİN ve BnHAp YÜKLÜ DOKU İSKELELERİNİN ANTİKANSEROJEN ve ANTİBAKTERİYEL ETKİNLİĞİNİN ARAŞTIRILMASI

MELTEM GAMZE ÖZTÜRK

Yüksek Lisans, Biyomühendislik Anabilim Dalı

Tez Danışmanı: Prof. Dr. Menemşe GÜMÜŞDERELİOĞLU

Şubat 2018, 109 sayfa

Tez kapsamında, antikanserojen bir ilaç olan salinomisin yüklü poli (laktik-ko-glikolik asit) (PLGA 65:35) nanopartiküller ile hidroksiapatite katkılanmış antibakteriyel etkinliğe sahip olan borun sinerjik etkisinin incelenmesi hedeflenmiştir. Bu amaçla salinomisin yüklü PLGA nanopartiküllerin sentezlenmesinin ardından karakterizasyon çalışmaları yapılmış ve *in-vitro* salım çalışmaları yürütülmüştür. Bor katkılı hidroksiapatit (BnHAp) varlığında salinomisin yüklü PLGA nanopartiküller ile hücre kültür ve bakteri kültür çalışmaları gerçekleştirilmiştir.

Emülsiyon hazırlama-çözücü buharlaştırma tekniği ile %2.5 (w/v) salinomisin içeriğine sahip PLGA nanopartiküller üretilmiştir. Üretilen boş ve salinomisin yüklü PLGA nanopartiküller (PLGA-SAL) sırası ile 185.8 nm ve 187.4 nm ortalama çapa sahiptir. Sentezlenen PLGA-SAL nanopartiküllerin enkapsülasyon verimleri HPLC cihazı ile yapılan ölçümlere göre ortalama 97.4 ± 1.87 olarak hesaplanmıştır. PLGA-SAL nanopartiküllerden fosfat tamponlu tuz çözeltisi (PBS) ortamında *in-vitro* salım çalışmaları yürütülmüş olup salinomisin salımı 1. saatte ani patlama etkisi göstererek %43 değerine ulaşmıştır. Kontrollü ve düzenli artış göstererek devam eden PLGA nanopartiküllerden

salinomisin salımı 45. günün sonunda %100'e ulaşmıştır. Daha sonra, üretimleri sırasında yapısına PLGA-SAL nanopartiküller ve bor katkılı hidroksiapatit (BnHAp) katılan kitosan doku iskeleleri ile iskeleden salım çalışması gerçekleştirilmiş olup ilk 24 saatte ani patlama etkisi ile salinomisinin %44'ü salınmıştır. Salımın tamamlanması yaklaşık olarak 59 gün sürmüştür. Hem partikülden hem de iskeleden salinomisin salımının Hixson-Crowell salım kinetik modeline uyduğu belirlenmiştir.

Çalışmaların ikinci aşamasında, MG-63 osteosarkom hücreleri ile hücre kültürü çalışmaları gerçekleştirilmiştir. Bu amaçla kontrol grubu (MG-63 hücreleri), salinomisin, boş PLGA nanopartiküller, PLGA-SAL nanopartiküller, PLGA-SAL/BnHAp ve PLGA-SAL/nHAp gruplarına yer verilmiştir. Hücre kültür çalışmaları süresince hücre canlılıkları canlı-ölü boyama analizi ile, hücre iskeleti organizasyonu Alexa Fluor/DAPI boyamayla ve nanopartiküllerin hücre içi alımları kristal viyole boyama yapılarak incelenmiştir. PLGA-SAL nanopartiküllerin optimum doz olarak seçilen 0.2 mg miktarında kullanıldığında MG-63 osteosarkom hücrelerini apoptoza götürdüğü görülmüştür. Bununla birlikte; nHAp'ın MG-63 hücreleri üzerindeki proliferasyonu destekleyici etkileri sebebiyle BnHAp ve nHAp içeren gruplarda hücre canlılıklarının yüksek olduğu belirlenmiştir.

Son olarak metisiline dirençli *Staphylococcus aureus* (MRSA-ATCC 43300), metisiline duyarlı *Staphylococcus aureus* (MSSA-ATCC 29213) ve kontrol grubu olan *Staphylococcus aureus* (ATCC 25923) suşları ile bakteri kültür çalışmaları yapılmıştır. Salinomisin yüklü antibiyogram disklerin yanı sıra 19 farklı antibiyogram diskin BnHAp varlığında inhibisyon alanlarındaki değişimler incelenmiştir. Disk difüzyon yöntemi (normal antibiyogram), çift disk sinerji (panç) yöntemi ve agar dilüsyon yöntemi kullanılan kültür çalışmalarında; BnHAp varlığında oluşan sinerjik etki ile SAL yüklenen antibiyogram disklerin inhibisyon alanlarında artış gözlenmiştir.

Anahtar kelimeler: Salinomisin; antibakteriyel etki; nanohidroksiapatit; BnHAp, nanopartikül; PLGA; doku iskelesi.

ABSTRACT

INVESTIGATION of ANTICANCEROGEN and ANTIBACTERIAL EFFECTIVENESS of SALINOMYCIN and BnHAp LOADED TISSUE SCAFFOLDS

MELTEM GAMZE ÖZTÜRK

Master of Science, Bioengineering Division

Supervisor: Prof. Dr. Menemşe GÜMÜŞDERELİOĞLU

February 2018, 109 pages

In the scope of the thesis, it is aimed to investigate the synergistic effect of an anticancer drug, salinomycin, loaded poly (lactic-co-glycolic acid) (PLGA 65:35) nanoparticles with the boron doped nanohydroxyapatite (BnHAp) that has antibacterial activity. For this purpose, following the synthesis of salinomycin loaded PLGA nanoparticles, characterization studies and *in vitro* release studies were carried out. Cell culture and bacterial culture studies were performed with salinomycin loaded PLGA nanoparticles in the presence of BnHAp.

PLGA nanoparticles with salinomycin content of 2.5% (w/v) were produced by emulsion preparation-solvent evaporation technique. The empty and salinomycin loaded PLGA nanoparticles (PLGA-SAL) produced have an average diameter of 185.8 nm and 187.4 nm, respectively. The encapsulation efficiencies of the PLGA-SAL nanoparticles were calculated to be $97.4 \pm 1.87\%$ according to the measurements done with the HPLC. *In vitro* release studies were carried out on PLGA-SAL nanoparticles in phosphate buffered saline (PBS) and the release of salinomycin reached 43% with a burst effect at the 1st

hour. The sustained release of salinomycin from PLGA nanoparticles with controlled and regular increase reached 100% at the end of the 45th day. Subsequently, a release study was initiated with chitosan tissue scaffolds incorporating PLGA-SAL nanoparticles and BnHAp, and 44% of the salinomycin was released with a burst effect in the first 24 hours. The release lasted approximately 59 days. It was determined that the release of salinomycin from both particles and scaffold was consistent with the Hixson-Crowell release kinetic model.

In the second phase of the studies, cell culture studies with MG-63 osteosarcoma cells were performed. For this purpose, the control group (MG-63 cells), salinomycin, empty PLGA nanoparticles, PLGA-SAL nanoparticles, PLGA-SAL/BnHAp and PLGA-SAL/nHAp groups were included. During the cell culture studies, cell viability was examined by live-dead staining analysis, cytoskeletal organization of nanoparticles by Alexa Fluor/DAPI staining and intracellular uptake of nanoparticles by crystal violet staining. When PLGA-SAL nanoparticles were used at the optimal dose of 0.2 mg, apoptosis was seen in MG-63 osteosarcoma cells. However, cell viability was determined to be high in groups which are containing BnHAp and nHAp due to the proliferative effects of nHAP and BnHAP on the MG-63 cells.

Finally, bacterial culture studies were performed with methicillin resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA-ATCC 43300), methicillin sensitive *Staphylococcus aureus* (MSSA-ATCC 29213) and control group *Staphylococcus aureus* (ATCC 25923) strains. In addition to salinomycin loaded antibiotic discs; the changes in inhibition areas in the presence of BnHAp were examined for 19 different antibiogram discs. In the culture studies using disc diffusion method (normal antibiogram), double disc synergy (punch) method and agar dilution method; the synergistic effect in the presence of BnHAp and the increase of inhibition area of salinomycin loaded antibiogram discs were observed.

Key words: Salinomycin, antibacterial effect, nanohydroxyapatite, BnHAp, nanoparticle, PLGA, tissue scaffold.

TEŞEKKÜR

Hacettepe Üniversitesi'ne adım attığım ilk andan bugüne kadar desteğini ve sevgisini bana her zaman hissettiren, değerli bilgi birikimi, tecrübesi ve fikirleriyle ufkumu açan, ikinci ailem gibi hissettiğim ekibinde yer almaktan mutluluk duyduğum, bilimsel yaklaşımlarının yanı sıra nezaketi, disiplini ve prensipleriyle daima kendime örnek alacağım sevgili hocam Prof. Dr. Menemşe Gümüşderelioğlu'na verdiği emekler ve sağladığı tüm olanaklar için saygı ve teşekkürlerimi sunarım.

Çalışmalarımın her aşamasına gece gündüz demeden benimle birlikte emek veren, deneyimleri ve bilgileriyle yoluma ışık tutan, çözüme odaklı ve pratik bakış açısı ile deneysel çalışmalarına hız kazandıran, pozitifliği, samimiyeti ve dostluğuyla hep elini omzumda hissettiğim kıymetli çalışma arkadaşım Gülseren Irmak'a en içten teşekkürlerimi sunarım.

Tez çalışmalarımda değerli bilgi ve tecrübeleri ile yanımda olan Dr. Tuğrul Tolga Demirtaş'a teşekkürlerimi sunarım. Çalışmalarımın bir kısmının yürütülmesinde bana destek veren Dr. Farzin Sana'ya teşekkürlerimi sunarım.

Birlikte çalışmaktan büyük mutluluk duyduğum sevgili laboratuvar arkadaşlarım; Dr. Işıl Gerçek Beşkardeş'e, Dr. Anıl Sera ve Dr. Soner Çakmak'a, Gökçe Kaynak Bayrak'a, Özge Ekin Tunçay'a, Dr. Damla Çetin Altındal'a, Ülkü Bozoğlu'na, Dr. Gamze Dereli Can'a, canımın içi MSc. grubum; Şeyma Bektaş'a, Tuğçe Gültan'a, Elvan Konuk'a, Burcu Sarıkaya'ya, Sena Koç'a, Aslı Sena Karanfil'e, Tülay Ertekin'e, Gülnihal Tok'a ve Demet Çakır'a teşekkürlerimi sunarım.

Her mutlu ve mutsuz anımda yanımda olan, tez çalışmalarım süresince bana inanan ve güç veren, şanslarım, kız kardeşlerim Aysun Öztaş'a ve Ecem Şahin'e dostluklarının bir ömür benimle olması dileğiyle teşekkür ederim. Pozitifliği ve sevgisi ile yıllardır en büyük desteklerimden biri olan biricik dostum, canım Merve Gökdemir'e hep yanımda kalması dileğiyle teşekkür ederim. Verdikleri tüm destek için canımın içi kuzenlerim; Ozan'a, Bengü'ye, Buse'ye ve Tuğçe'ye içtenlikle teşekkür ederim.

Hayatımın her alanında olduğu gibi tez çalışmalarım da tüm desteğini ve sevgisini hissettiğim, disiplinleri ve azimlerini örnek alarak bu günlere geldiğim canım babam Ercan Öztürk'e ve canım annem Öznur Öztürk'e, beni benden iyi tanıyan, iyi hissetmem için gözümüne bakması yeten, bu hayattaki en büyük şansım ve desteğim olan canım kardeşim Özlem Deniz Öztürk'e sonsuz teşekkürlerimi sunarım.

İÇİNDEKİLER

	<u>Sayfa</u>
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. Kemik Doku.....	4
2.2. Kemik Doku Mühendisliği.....	5
2.2.1. Kemik Doku Mühendisliğinde Doku İskeleleri.....	7
2.2.1.1. Doku İskelelerinin Özellikleri.....	7
2.2.1.2. Doku İskelelerinin Üretimi.....	8
2.2.2. Kemik Doku Mühendisliğinde Kullanılan Hücreler.....	10
2.2.3. Kemik Doku Mühendisliğinde Kullanılan Biyosinyal Moleküller.....	11
2.3. Salinomisin.....	12
2.3.1. Salinomisinin Etki Mekanizması.....	14
2.3.2. Salinomisinin Kemik Doku Kanserine Etkileri.....	17
2.3.3. Salinomisinin Kullanım Alanları.....	20
2.4. Enfeksiyona Neden Olan Gram Pozitif Bakteriler.....	21
2.5. Bor.....	23
2.5.1. Borun Kimyasal Özellikleri.....	23
2.5.2. Bor'un Kullanım Alanları.....	24
2.5.3. Borun Vücuttaki Etkileri.....	25
2.6. Nanopartiküller.....	26
2.6.1. Nanopartikül Üretimi.....	27
2.6.2. İlaç Salım Sistemlerinde Kinetik Modeller.....	29
2.6.3. Nanopartikül Üretiminde Kullanılan Polimerler.....	30
3. DENEYSEL ÇALIŞMALAR.....	32

3.1. Kullanılan Malzemeler.....	32
3.2. Bor Katkılı Nanohidroksiapatit ile Nanohidroksiapatitlerin Üretimi ve Karakterizasyonu	34
3.3. Boş ve Salinomisin Yüklü PLGA Nanopartiküllerin Üretimi.....	35
3.4. Kitosan Doku İskelesi Üretimi.....	36
3.4.1. Kitosan Doku İskelelerine Nanopartiküllerin Yüklenmesi.....	36
3.5. Nanopartiküllerin ve Doku İskelelerinin Karakterizasyonu.....	37
3.5.1. Zetasizer ile Partikül Boyutunun Belirlenmesi.....	37
3.5.2. Taramalı Elektron Mikroskop (SEM) Analizi.....	37
3.5.3. Salinomisin Enkapsülasyon Veriminin Belirlenmesi.....	38
3.6. Salinomisin Salım Çalışmaları.....	38
3.7. Hücre Kültürü Çalışmaları.....	39
3.7.1. Hücre Kültürü Koşulları.....	39
3.7.2. Canlı-Ölü Hücre Analizi.....	41
3.7.3. Hücre Canlılığı ve Morfolojisini Görüntüleme.....	41
3.7.3.1. Alexa Fluor/DAPI boyama.....	41
3.7.3.2. Kristal Viyole Boyama.....	42
3.7.4. Hücre Canlılığı Görüntüleme ve Hücre Sayımı Çalışmaları.....	42
3.8. Mikrobiyoloji Çalışmaları.....	43
3.8.1. Bakteri Kültürü Koşulları.....	43
3.8.2. Ön Deneme Çalışmaları.....	43
3.8.3. Bakteri Kültürü Çalışmaları.....	44
3.8.3.1. Disk Difüzyon Yöntemi ile Mikrobiyoloji Uygulamaları.....	45
3.8.3.2. Çift Disk Sinerji (Panç) Yöntemi ile Mikrobiyoloji Uygulamaları.....	46
3.8.3.3. Agar Dilüsyon Yöntemi ile Mikrobiyoloji Uygulamaları.....	46
4. SONUÇLAR VE TARTIŞMA.....	47
4.1. Nanohidroksiapatit ve Bor Katkılı Nanohidroksiapatitlerin Üretimi ve Karakterizasyonu.....	47
4.2. PLGA Nanopartiküllerin Üretimi ve Karakterizasyonu.....	50
4.2.1. Partikül Boyutu Analizi.....	50
4.2.2. Taramalı Elektron Mikroskopu (SEM) Analizi.....	53
4.2.3. Salinomisin Enkapsülasyon Veriminin Belirlenmesi.....	57
4.3. İn-vitro Salım Çalışmaları ve Salım Kinetiklerinin Belirlenmesi.....	58

4.3.1. PLGA Nanopartiküllerden Salinomisin Salımı.....	58
4.3.2. PLGA-SAL Nanopartikül Yüklü Kitosan/BnHAp Doku İskelelerinden Salinomisin Salımı.....	59
4.4. Hücre Kültür Çalışmaları.....	61
4.4.1. Optik ve Floresan Mikroskop ile Görüntüleme.....	62
4.4.2. Canlı-Ölü Hücre Analizi.....	63
4.4.3. Hücre Canlılığı ve Morfolojisini Görüntüleme.....	72
4.4.3.1. Alexa Fluor/DAPI boyama.....	72
4.4.3.2. Kristal Viyole Boyama.....	76
4.4.4. Hücre Morfolojisinde ve Yoğunluğundaki Değişimi Görüntüleme.....	77
4.5. Bakteri Kültür Çalışmaları.....	80
4.5.1. Salinomisin Yüklü Antibiyogram Diskler ile Bakteri Kültürü Çalışmaları.....	85
5. GENEL SONUÇLAR.....	90
KAYNAKLAR.....	94
EKLER.....	104
ÖZGEÇMİŞ.....	108

ÇİZELGELER DİZİNİ

Çizelge 3.1. 10xSBF çözelti reçetesi (1L hacim için).....	34
Çizelge 3.2. Bakteri kültür çalışmalarında kullanılan antibiyogram diskler.....	45
Çizelge 4.1. PLGA kopolimerinden üretilen boş nanopartiküllerin ve SAL yüklü nanopartiküllerin boy ve boy dağılım değerleri.....	51
Çizelge 4.2. PLGA nanopartiküllere yüklü salinomisin enkapsülasyon verimi.....	58
Çizelge 4.3. Salinomisin yüklü PLGA nanopartiküllerin ve kitosan doku iskelelerinin salım kinetikleri.....	61
Çizelge 4.4. Hücre kültürü uygulamaları için oluşturulan gruplar.....	60
Çizelge 4.5. Standart antibiyotikler ile birlikte BnHAp'ın ve sadece standart antibiyotiklerin antimikrobiyal etkinlikleri.....	81
Çizelge 4.6. Üç bakteri suşu ile salinomisin yüklü antibiyogram disklerine uygulanan disk difüzyon metodu sonuçları.....	87

ŞEKİLLER DİZİNİ

Şekil 2.1. Kemik doku mühendisliği yaklaşımı.....	6
Şekil 2.2. Salinomisinin molekül yapısı.....	12
Şekil 2.3. Salinomisinin etki mekanizması.....	16
Şekil 2.4. Osteosarkom hücrelerini tanımlayan özellikler ve sıkça kullanılan moleküler belirteçler.....	18
Şekil 2.5. PLGA kopolimerinin molekül yapısı.....	31
Şekil 3.1. Yüksek Lisans tez çalışması kapsamındaki deneysel basamakların şematik gösterimi.....	33
Şekil 3.2. Üretim sonrası 6 mm çapında kesilmiş olan kitosan doku iskelesi.....	36
Şekil 3.3. a) Çift Disk Sinerji (Panç) Yöntemi b) Agar dilüsyon yöntemi.....	46
Şekil 4.1. Mikrodalga ile sentezlenen hidroksiapatit (a), bor katkılı hidroksiapatit (b) ve Uluslar Arası Merkez (ICDD) verilerine ait saf hidroksiapatit (c) XRD spektrumları.....	48
Şekil 4.2. Mikrodalga ile çöktürülerek sentezlenen nHAp (a) ve BnHAp (b) örneklerinin XRD spektrumları.....	49
Şekil 4.3.Boş PLGA nanopartiküllerin DLS analizi sonucu alınan a) çap dağılım ve b) Zeta Potansiyel dağılım grafiği.....	52
Şekil 4.4. PLGA-SAL nanopartiküllerin DLS analizi sonucu alınan a) çap dağılım ve b) Zeta Potansiyel dağılım grafiği.....	53
Şekil 4.5. Boş PLGA nanopartiküllerin a) 10,000 ve b) 50,000 büyütmedeki SEM fotoğrafları.....	54
Şekil 4.6. PLGA-SAL nanopartiküllerin a) 50,000 ve b) 10,000 büyütmedeki SEM fotoğrafları.....	55
Şekil 4.7. Kitosan/PLGA-SAL doku iskelelerinin 20,000 büyütmedeki SEM fotoğrafı.....	56
Şekil 4.8. Kitosan/PLGA-SAL doku iskelelerinin a) 20,000 ve b) 50,000 büyütmedeki SEM fotoğrafları.....	56
Şekil 4.9. Salinomisin HPLC kromatogramı.....	57
Şekil 4.10. PLGA nanopartikülerden salinomisin salımı için kümülatif salım grafiği.....	59
Şekil 4.11. PLGA-SAL yüklü kitosan/BnHAp doku iskelelerinden salinomisin salımı için kümülatif salım grafiği.....	60

Şekil 4.12. MG-63 hücreleri ile yapılan hücre kültürü uygulamalarına ait optik mikroskop görüntüleri.....	63
Şekil 4.13. MG-63 hücreleri ile yapılan kültür çalışmalarında FITC içeren PLGA-SAL nanopartiküllerin floresan mikroskop görüntüleri.....	63
Şekil 4.14. Canlı/Ölü Boyama Görüntüleri (10x) a,b) MG-63 hücre hattı c,d) Boş PLGA nanopartiküller e,f) SAL _{2.73µg} g,h) (PLGA-SAL) _{0.20mg}	66
Şekil 4.15. Canlı/Ölü Boyama Görüntüleri (10x) a,b) SAL _{7.51µg} c,d) (PLGA-SAL) _{0.55mg} e,f) SAL _{15.02 µg} g,h) (PLGA-SAL) _{1.10mg}	67
Şekil 4.16. MG-63 hücreleri, boş PLGA nanopartiküller, (PLGA-SAL) _{0.15mg} nanopartiküller, (PLGA-SAL) _{0.20mg} nanopartiküller, (PLGA-SAL) _{0.55mg} nanopartiküller ve (PLGA-SAL) _{1.10mg} nanopartiküllere ait canlı-ölü boyama ortalama yüzde canlılık sonuçları.....	68
Şekil 4.17. Canlı/Ölü Boyama Görüntüleri (10x) a,b) MG-63 hücre hattı c,d) Boş PLGA nanopartiküller e,f) (PLGA-SAL) _{0.20mg} g,h) (PLGA-SAL) _{0.20mg/BnHAp} i,j) (PLGA-SAL) _{0.20mg/nHAp}	70
Şekil 4.18. (PLGA-SAL) _{0.15mg} nanopartiküller, (PLGA-SAL) _{0.15mg/BnHAp} ve (PLGA-SAL) _{0.15mg/nHAp} gruplarına ait canlı-ölü boyama ortalama yüzde canlılık sonuçları.....	71
Şekil 4.19. (PLGA-SAL) _{0.20mg} nanopartiküller, (PLGA-SAL) _{0.20mg/BnHAp} ve (PLGA-SAL) _{0.20mg/nHAp} gruplarına ait canlı-ölü boyama ortalama yüzde canlılık sonuçları.....	71
Şekil 4.20. Alexa Fluor (yeşil)/DAPI (mavi) boyama görüntüleri (40x). a,b,c) MG-63 hücre hattı d,e,f) Boş PLGA nanopartiküller g,h,i) (PLGA-SAL) _{0.15mg} j,k,l) (PLGA-SAL) _{0.20mg} m,n,o) (PLGA-SAL) _{0.55mg} p,r,s) (PLGA-SAL) _{1.10mg}	73
Şekil 4.21. Alexa Fluor (yeşil)/ DAPI (mavi) boyama görüntüleri (40x). a,b,c) MG-63 hücre hattı d,e,f) SAL _{2.73µg} g,h,i) (PLGA-SAL) _{0.20mg}	74
Şekil 4.22. Alexa Fluor (yeşil)/ DAPI (mavi) boyama görüntüleri (40x). a,b,c) MG-63 hücre hattı d,e,f) SAL _{7.51µg} g,h,i) (PLGA-SAL) _{0.55mg}	75
Şekil 4.23. Alexa Fluor (yeşil)/ DAPI (mavi) boyama görüntüleri (40x). a,b,c) MG-63..hücre hattı d,e,f) SAL _{15.02µg} g,h,i) (PLGA-SAL) _{1.10mg}	76
Şekil 4.24. Alexa Fluor (yeşil)/ DAPI (mavi) boyama görüntüleri (40x). a,b,c) (PLGA-SAL) _{0.20mg} d,e,f) (PLGA-SAL) _{0.20mg/BnHAp} g,h,i) (PLGA-SAL) _{0.20mg/nHAp} ..	77
Şekil 4.25. Kristal Viyole boyama görüntüleri (40x). a,b,c) MG-63 hücre hattı d,e,f) (PLGA-SAL) _{0.20mg} g,h,i) (PLGA-SAL) _{0.20mg/BnHAp} j,k,l) (PLGA-SAL) _{0.20mg/nHAp}	78

Şekil 4.26. Hücre morfolojisi ve yoğunluğundaki değişimi görüntüleme cihazı ile (PLGA-SAL) _{0.20mg} nanopartikül grubu için alınan görüntüler.....	79
Şekil 4.27. APX ve CX antibiyogram diskleri ile yapılan a) agar dilüsyon ve b) normal antibiyogram yöntemleri.....	80
Şekil 4.28. CAZ ve CAZ/BA antibiyogram diskleri ile yapılan a) agar dilüsyon ve b) normal antibiyogram yöntemleri.....	82
Şekil 4.29.CRO ve CFC antibiyogram diskleri ile yapılan a) agar dilüsyon ve b) normal antibiyogram yöntemleri.....	82
Şekil 4.30. VA antibiyogram diski kullanılarak üç farklı bakteri suşu ile yapılan a) normal antibiyogram ve b) agar dilüsyon yöntemleri.....	83
Şekil 4.31. AMC ve AX antibiyogram diskleri ve üç farklı bakteri suşu ile yapılan a) normal antibiyogram, b) agar dilüsyon ve c) panç yöntemleri.....	84
Şekil 4.32. CRO ve CFC antibiyogram diskleri ve üç farklı bakteri suşu ile yapılan a) normal antibiyogram, b) agar dilüsyon ve c) panç yöntemleri.....	85
Şekil 4.33. Salinomisin yüklü antibiyogram diskler ile uygulanan normal antibiyogram yöntemi. Sırası ile her biri 20 µL DPBS ile seyreltilmiş olan a) 5 µg ve 30 µg b) 20 µg ve 10 µg salinomisin yüklü antibiyogram diskler.....	86
Şekil 4.34. Salinomisin yüklü antibiyogram diskler ile üç farklı bakteri suşu kullanılarak yapılan agar dilüsyon yöntemi. Her grupta (a, b, c) SAL20 (solda) ve SAL10 (sağda) antibiyogram diskler bulunmaktadır.....	87
Şekil 4.35. Salinomisin yüklü antibiyogram diskler ile yapılan panç yöntemi. Sırası ile her grupta SAL5 ve SAL30 antibiyogram diskler bulunmaktadır.....	88
Şekil 4.36. Salinomisin yüklü antibiyogram diskler ile üç farklı bakteri suşu kullanılarak yapılan a) normal antibiyogram (üstte), b) agar dilüsyon (ortada) ve c) panç (altta) metodları. Her grupta sırası ile SAL5 ve SAL30 antibiyogram diskler bulunmaktadır.....	89

SİMGELER ve KISALTMALAR

Simgeler

μ	Mikro
NaHCO_3	Sodyum bikarbonat
NaCl	Sodyum klorür
KCl	Potasyum klorür
$\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$	Kalsiyum klorür dihidrat
$\text{MgCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$	Magnezyum klorür hegzahidrat
$\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$	Sodyum dihidrojen fosfat monohidrat
nm	Nanometre
Ca/P	Kalsiyum/Fosfat
K_0	Sıfırıncı derece kinetik sabiti
K_1	Birinci derece kinetik sabiti
K_{HC}	Hixson-Crowel kinetik sabiti
K_{H}	Higuchi kinetik sabiti

Kısaltmalar

FDA	Food and Drug Administration
PLGA	Poli (laktik-ko-glikolik asit)
DMAB	Didodesildimetilamonyum bromür
TCP	Trikalsiyum fosfatlar
MRSA	Metisiline dirençli <i>S. aureus</i>
MSSA	Metisiline hassas <i>S. aureus</i>
BnHAp	Bor katkılı nanohidroksiapatit
nHAp	Nanohidroksiapatit
SAL	Salinomisin
PLGA-SAL	Salinomisin yüklü PLGA nanopartikül
Kitosan/PLGA-SAL/BnHAp	PLGA-SAL ve BnHAp yüklü kitosan doku iskeleleri
DMEM	Dulbecco's Modified Eagle Medium
DPBS	Dulbecco fosfat tampon çözeltisi
FBS	Fetal sığır serumu

DAPI	Diamidino-2-fenilindol boyası
MTT	3-[4,5-dimetiltiazol-2-il]-2,5-difeniltetrazolyum bromür
SEM	Taramalı elektron mikroskobu
DLS	Dinamik Işık Saçılım
HPLC	Yüksek Performanslı Sıvı Kromatografi
XRD	X-ışını kırınımı
2,4-DNPh	2,4-Dinitrofenil hidrazin
FITC	Floresan izosiyanat
PDI	Polidispersite indeksi
MHA	Mueller Hinton Agar
MHB	Mueller Hinton Broth

1. GİRİŞ

Tıp, biyoloji ve kimya gibi farklı bilim dallarının desteklediği doku mühendisliği yaklaşımında hasarlı dokuyu onarmak, ya da yerine sağlıklı doku koyarak tedaviyi gerçekleştirmek hedeflenir. Doku mühendisliğinden beklenen; iyileşme sürecini kısaltmak, yaşam standartlarını arttırmak ve düşük maliyetle iyileşmeyi sağlamaktır.

Doku mühendisliğinin temel bileşenleri; hücreler, doku iskelesi fabrikasyonunda kullanılan biyomalzemeler ve biyosinyal moleküllerdir . Bu bileşenler, bir araya getirilerek hücre farklılaşması sağlanabilmektedir [2]. Bu uygulama iki basamaklıdır. İlk basamakta, hastanın sağlıklı bölgesinden biyopsi ile alınan hücreler uygun besi ortamında *in vitro* olarak çoğaltılır. İkinci basamakta ise, çoğaltılan hücreler biyosinyallerle birlikte doku iskelelerine ekilir. Ardından laboratuvar koşullarında veya hasarlı doku bölgesinde yeni doku oluşumunun gerçekleşmesi beklenir. Hücreler, otojenik olarak hastanın kendisinden alınabileceği gibi, allojenik yolla başka bir kişiden elde edilebilir, zenojenik olarak hayvanlardan izole edilebilir veya kök hücre kaynaklı olabilir [3]. Mezenkimal kök hücreler, bağ dokularında bulunan erişkin haldeki kök hücre tipidir ve dokuya özgü değildir. Bu sayede, kemik, yağ ve sinir hücrelerine farklılaşabilirler ve doku mühendisliği uygulamaları için günümüzde en çok tercih edilendir [4]. Büyüme faktörleri dokuya özgü olduğundan yapılacak çalışmaya uygun olarak seçilmeli, dokunun farklılaşma, proliferasyon ve göç gibi özellikleri göz önünde bulundurulmalıdır. Biyosinyaller hücreye kovalent olarak bağlanabilir, *in vitro* kültür ortamına doğrudan verilebilir veya hasarlı bölgeye lokal olarak yerleştirilebilirler [5].

Doku mühendisliği uygulamalarında; biyoyumlu, biyobozunur yapıda ve dokuya uygun mekanik özellikte doku iskeleleri kullanılmaktadır [6]. Biyoyumlu ve biyobozunur materyallerden sentezlenebilen mikro ve nanopartiküller de bu uygulamalarda önemli rol oynamaktadır. İlaç taşıyıcı sistemler için büyük potansiyel taşıyan bu partiküler sistemler geniş yüzey alanları, bağışıklık sistemi tarafından reddedilmemeleri, yüksek yükleme kapasiteleri, dokuya hedeflendirme ve yüzey modifikasyonuna olanak tanımları gibi avantajlara sahiptirler [7, 8]. Mikro ve nanopartiküller vücut içinde tamamen bozunabilen, cerrahi müdahale gerektirmeyen, ilaç salım hızını kontrol edilebilir kılan ve kolay sentezlenebilen ilaç salım sistemleri sunmaktadırlar [9]. Kontrollü ilaç salım sistemleri, uzun süreli ve etkili tedavi sağlamakta olup ilacın etkin doz aralığında istenen salım mekanizması yolu ile salımını gerçekleştirebilirler. Partiküler ilaç taşıyıcı sistemlerin üretiminde sentetik ve doğal polimerler ile seramikler kullanılabilmektedir [10]. FDA (Food and Drug

Administration) onaylı bir polimer olan poli (laktik-ko-glikolik asit) (PLGA) kopolimeri biyoyumlu ve biyobozunur özellikleri ile ilaç, peptid, hormon ve proteinlerin kontrollü salımı için oldukça uygundur. PLGA, yapısında barındırdığı ester bağlarının hidroliziyle son ürünleri olan laktik ve glikolik asite bozunmaktadır. Polimerlerin salım kinetiği üzerinde belirleyici etkisi olan bu bozunma davranışını PLGA'nın yapısında bulunan hidrofilik özellikli poli (glikolik asit) (PGA) ve hidrofobik özellikteki poli (laktik asit) (PLA) sağlamaktadır [11].

Salinomisin, 1974 yılında *Streptomyces albus* bakterisinden elde edilen monokarboksilik poliyeter yapıda yeni nesil bir antibiyotiktir [12, 13]. Antikanserojen bir ilaç olan salinomisin aynı zamanda Gram-pozitif bakteriler üzerinde antimikrobiyal etkiye sahiptir. Salinomisin hücrelölümleri geleneksel olmayan yollarla sağlamakta, DNA hasarını arttırmakta ve Wnt sinyal yollarını engelleyerek birçok kanser türü üzerinde antikanser aktivite sağlayabilmektedir [14]. Salinomisin yüksek antikanserojen potansiyeline karşın klinik uygulamalarına engel oluşturan düşük suda çözünürlük özelliğine sahiptir. Bu problemin önüne geçebilmek amacı ile salinomisinin nanopartiküllerle birlikte kullanılması öngörülmüştür [15].

Sunulan tez kapsamında, doku iskelesi ve nanopartikül sistemlerinden kontrollü salımı gerçekleştirilen salinomisinin antikanserojen ve antibakteriyel etkilerinin araştırılması amaçlanmıştır. Çalışmanın ilk kısmında; emülsiyon hazırlama-çözücü buharlaştırma yöntemi ile salinomisin katkılı PLGA nanopartiküller ve dondurarak kurutma tekniği ile bu partiküller ile BnHAp içeren kitosan doku iskeleleri sentezlenmiştir. Karakterizasyonu yapılan partikül ve doku iskelelerinin morfolojileri ve kimyasal yapıları incelenmiştir. Son olarak, enkapsülasyon verimi belirlenen salinomisinin partikülden ve iskeleden salım çalışmaları *in vitro* koşullarda yürütülmüş, salım kinetikleri belirlenmiştir.

Çalışmanın ikinci kısmında, salinomisin yüklü PLGA nanopartiküllerin MG-63 osteosarkom hücreleri üzerindeki etkilerinin incelendiği hücre kültür çalışmaları başlatılmıştır. Bu çalışmalarda hücre canlılıkları canlı-ölü boyama analizi ile, nanopartiküllerin hücre iskeleti organizasyonu Alexa Fluor/DAPI boyama ile, nanopartiküllerin hücre içi alımları kristal viyole boyama ile, hücre morfolojisi ve yoğunluğundaki değişim ise hücre sayım/görüntüleme cihazı ile takip edilmiştir. Bu doğrultuda hücre kültür çalışmaları doz belirleme ve kıyaslama uygulamaları olmak üzere iki basamak şeklinde tamamlanmıştır.

Çalışmanın son kısmında ise, salinomisinin antibakteriyel özellikleri incelenmiştir. Bu amaçla; farklı bakteri suşları ve üç ayrı teknik ile bakteri kültür uygulamaları yapılmıştır. Bu tekniklerden disk difüzyon metodu ile salinomisin yüklü antibiyogram disklerin standart inhibisyon alanları belirlenmiştir. Daha sonra diğer iki yöntem olan agar dilüsyon ve panç metodları ile salinomisin BnHAp varlığında farklı bakteri suşlarına verdiği yanıtlar incelenmiştir.



2. GENEL BİLGİLER

Tezin bu bölümünde, yapılan çalışmaların temelini oluşturan konular hakkındaki literatür bilgilerine yer verilmiştir. Sunulan tez çalışması kontrollü ilaç salım sistemlerinin partiküler formda geliştirilerek doku iskeleleri ile birlikte hücre kültürü ve bakteri kültürü uygulamalarında antikanserojen ve antibakteriyel etkinliklerinin değerlendirilmesi çalışmalarını içermektedir. Bu amaçla, öncelikle kemik doku ve kemik doku mühendisliği açıklanmış, ardından bu çalışmada antikanserojen etkileri incelenmiş olan salinomisin antibiyotiği, etki mekanizması ve kullanım alanlarından bahsedilmiştir. Daha sonra, salinomisin antibakteriyel aktivite gösterdiği Gram pozitif bakteriler anlatılmıştır. Ardından borun kimyasal özellikleri ve insan vücudunda kullanımı hakkında literatür bilgilerine değinilmiştir. Son olarak ise nanopartiküllerin özellikleri ve üretim yöntemleri anlatılmıştır.

2.1. Kemik Doku

Kemik, kemik iliği ve bağ dokudan oluşan damarlar ve sinirlerle çevrili dinamik bir destek dokudur [16]. Kemik doku, hayat boyu bireysel olarak yeniden modellenmeye devam etmektedir [6].

Kemik doku, iskelet sisteminde vücudu koruyan, destekleyen ve hareket sağlayan bir bileşen olup [17], kan oluşturan sistemler ve kemik ilikleri gibi özelleşmiş dokular için bir koruma ve üretim alanıdır. Kalp, akciğerler ve diğer organlar göğüs kafesi tarafından korunur. Bu organların hareket, gelişim ve kasılma içeren fonksiyonları, koruyucu göğüs kafesinin elastikiyet ve esneklik göstermesini gerektirmektedir. Kemik yapısal olarak, kasların kasılması ve akciğerlerin genişmesinde olduğu gibi yumuşak dokuların mekanik olarak çalışmasını da desteklemektedir [18]. Ayrıca bir mineral rezervuarı olması nedeniyle endokrin sistemin kalsiyum seviyesini ve vücut sıvısı sirkülasyonundaki fosfat iyonlarının seviyesini de düzenlemektedir [17].

Kemiğin makro ve mikroskobik yapıları genetik, metabolik ve mekanik faktörlerden etkilenir. Tüm kemikler temel bir ikili yapıdan oluşmaktadır. Dışarıda kortikal kemik olarak adlandırılan ve kemiği kaplayan sıkı ve kesintisiz bir dış tabaka ile içeride boşluklu yapıda, değişken tabakalar ve spiküller içeren süngerimsi kemik (trabeküler kemik) dokudan meydana gelmektedir. Bu boşluklar yaşa ve alana göre değişkenlik göstermekle birlikte tamamen kan damarları, (kırmızı, hematopoetik veya sarı) ilik ve yağ ile doludurlar [19].

Kemik mikroskobik olarak oldukça kompleks yapıda ve dokuları bağlayıcı özelliktedir [19]. Mineralize bir doku olan kemik, içerdiği organik matris ve kalsiyum fosfat

kristalleri ile doğal bir kompozit materyal olarak değerlendirilebilmektedir. İçeriğindeki organik matris yaklaşık olarak %95 kollojen tip 1 fiberlerden ve %5 proteoglikanlar ile sayısız non-kollojen proteinden meydana gelmektedir. Bu organik matris, kalsiyum fosfat mineralleri tarafından desteklenmiştir. Osteoblastlar, osteositler ve osteoklastlardan oluşan kemik hücreleri bu matris içerisine yerleşmiştir. Kemik, sert inorganik ve elastik organik bileşenlerin iç içe çok iyi karışımının sonucu olarak iyi mekanik özelliklere sahiptir [20].

Kemik doku, kortikal kemik (kompakt model) ve süngerimsi kemik (trabeküler model) yapılarını kendi içinde düzenlemiştir. Vücuttaki diğer organlara kıyasla kemik doku bazı önemli kurallara bağlı olarak makro ölçekten nanoyapıdaki ölçeğe doğru giden hiyerarşik bir organizasyona sahiptir [17].

Kemik ekstraselüler matrisi (ECM), çoğunlukla tip-1 kollojenden oluşan mineralize olmamış organik bileşenleri ve levha benzeri kabonatlı apatit mineralize inorganik bileşeni içerir. Buna ek olarak, yakın ekstraselüler çevrelerindeki sinyalleri arttırmak için 200'ün üzerinde farklı türden non-kollojen matris proteinler (glikoproteinler, proteoglikanlar ve siyaloproteinler) ile katkı yapılmaktadır. Nanokompozit yapı, gerekli olan basınç dayanımı ve kemiğin yüksek kırılma dayanıklılığı için bütünlüleyici özelliktedir. Bu nanokompozit yapıdaki dayanıklı ve esnek kollojen fiberler hidroksiapatit kristalleri ile sağlamlaştırılmıştır [21].

2.2. Kemik Doku Mühendisliği

Hasarlı ve yaralı doku tedavilerinde çok sayıda cerrahi işlem yenileme ve onarım amacıyla uygulanmaktadır. Gelişen doku mühendisliği yaklaşımı, hasarlı dokuyu vücuttan alınan hücreler ile gözenekli iskeleler kullanarak iyileştirmeyi, yeni doku oluşumunu ve rejenerasyonunu sağlamayı amaçlar [22].

Vücuttaki doku, hastalık, yara veya travmalar sebebiyle zarar gördüğünde farklı tedavi yöntemleriyle onarılabilir, yerine konabilir ve yenilenebilir. Bu tedaviler otogreft veya allogreft şeklinde olabilmektedir. Her ikisi de devrim niteliğinde ve hayat kurtarıcı yaklaşımlardır [3]. Otogreft pahalı, daha acı verici ve enfeksiyon riski taşıması nedeniyle çeşitli anatomik sınırlamaları olan bir yöntemdir. Allogreft ile tedavide ise hasarlı dokuya erişim sorunları, nakilde reddetme riski ve donörden hastalık/enfeksiyon kapma riski gibi problemler vardır [1].

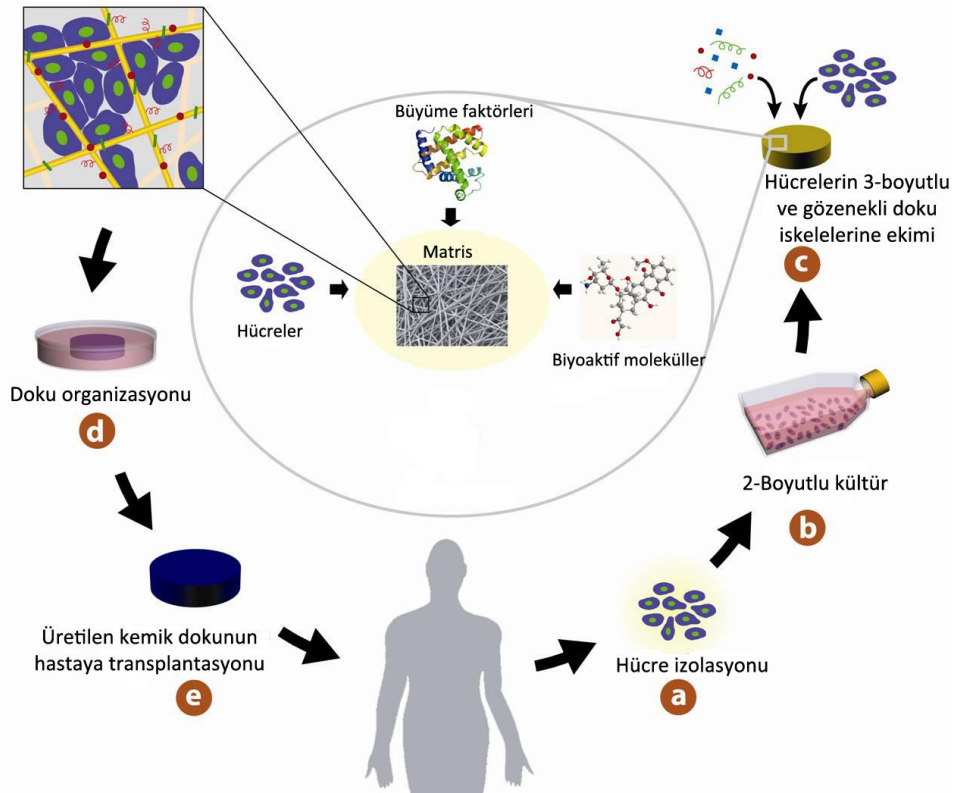
Doku mühendisliği, çok disiplinli bir alandır. Doku/organ rejenerasyonuna uygun ortamı sağlayabilmek için büyük ölçüde gözenekli ve üç boyutlu iskeleler üzerinde çalışılır. Bu iskeleler, bir şablon görevi görerek büyüme faktörleri ve biyoreaktörler ile

birlikte hazırlanır. Hücre ekili iskeleler ya *in vitro*da hazırlanıp yaralı alana implante edilir ya da *in vivo*da doğrudan vücuda implante edilip rejenerasyon için kullanılır [22].

Doku mühendisliği yaklaşımında doku rejenerasyonunu sağlamak için büyük önem taşıyan 3 temel adım bulunmaktadır. Bunlar; hücreyel yapışma, proliferasyon ve farklılaşmadır [23].

Doku mühendisliğinin zorluğu doğada var olanı taklit etmek zorunda olmasıdır. Her doku ve organ için *in vitro* çalışmalar devam etmektedir ve özellikle deri, idrar torbası, solunum yolu ve kemik çalışmalarında başarı oranı çok yüksektir. Kıkırdak doku onarımında; kondrosit implantasyonu (ACI) ve matris indüklü otolog kemik implantasyonu (MACI) uygulamalarında başarı sağlanmıştır [22].

Büyük atılımlar yapan kemik doku mühendisliği hızla büyümekte, çok sayıda ürüne ve yenilenebilir biyomalzemeye sahip olmaktadır. Kemik doku mühendisliği yaklaşımı şematik olarak Şekil 2.1.'de verilmiştir. Kemik dokunun kendine has yenilenme ve yerine koyma yetenekleri doku mühendisliğinde çokça yararlanılan özelliklerdir [24].



Şekil 2.1. Kemik doku mühendisliği yaklaşımı [25].

2.2.1. Kemik Doku Mühendisliğinde Doku İskeleleri

Doku iskeleleri, doku mühendisliğinde hücre proliferasyonuna ve farklılaşmasına olanak sağlayan, hücreleri üç boyutlu dokular oluşturmaya teşvik eden ve doku rejenerasyonunu destekleyen yapılardır [23].

Gözenekli doku iskelelerine hücre ekildiğinde, hücreler çoğalır ve kendi ECM'ini oluşturmaya başlar. Yapıdaki gözeneklilik biyosinyal moleküllerin, faktörlerin, oksijen ve besinin istenen şekilde taşınımına olanak sağlar [26]. Bir süre sonra yaşanan difüzyon sınırlamalarından dolayı doku oluşumu durabilir ve doku kaybı başlar. Büyük boyuttaki moleküller için makro-gözenekli doku iskeleleri üretilebilir.

İdeal bir doku iskelesi oluşturabilmek için uygun materyal seçimi ve uygun üretim yöntemi seçimi kritik öneme sahiptir; dokunun özelliklerine ve dokudaki hasara uygun olan bir matris hazırlanmalıdır. Seçilecek olan yöntem kullanılan materyalin biyoyumluluğunu değiştirmemelidir [27].

2.2.1.1. Doku İskelelerinin Özellikleri

Doku iskeleleri yapay ve doğal polimerler, seramikler veya polimerler ile seramiklerden oluşan kompozit materyallerden üretilebilir. Metaller biyobozunmaya uygun olmadıklarından tercih edilmezler [27].

Sentetik polimerler, polilaktik asit (PLA), poliglikolik asit (PGA), poli(laktik-ko-glikolik asit) (PLGA), polihidroksialkonat (PLA), polietilen glikol (PEG), polikaprolakton (PCL) ve polianhidritlerdir. Bu polimerler, biyobozunur yapıda olup fiziksel özellikleri molekül ağırlıkları ayarlanarak kontrol edilebilir, kolay işlenebilir, sıcaklık dayanımı doğal polimerlere göre daha yüksek olan, çeşitlilikleri çok fazla ve modifikasyona müsait malzemelerdir [28] ve genellikle hidroliz ile bozunurlar. Bunlara karşılık, biyoyumlulukları ve saflıkları düşüktür çünkü %100 verimle üretilmeleri mümkün değildir. Bu nedenle, doku mühendisliği uygulamalarında medikal saflıkta olanları kullanılmalıdır. Sentetik polimerlerden PLA, PGA ve PLGA Amerikan Gıda ve İlaç Kurumu (FDA) onaylıdır ve bozunduklarında hiçbir toksik etki yaratmazlar. Bu nedenle, bu polimerler doku mühendisliği uygulamalarına çok uygundur [27].

Doku iskelesi yapımında en çok kullanılan doğal polimerler; hyalüronan, kollojen, kitosan, fibrin ve ipektir. Bu polimerler, hücresel yapıda var olan ECM'lere çok benzer olmaları, ayrıca yüksek biyoyumluluk ve biyobozunurluğa sahip olmalarıyla avantajlıdır [29] ve enzimatik olarak bozunabilirler. Ancak; bu polimerlerin düşük sıcaklık dayanımı gibi problemleri nedeniyle işlenebilirlikleri düşüktür. Ayrıca, patojen aktarabilirler ve mekanik dayanımları da zayıftır.

Doku iskelesi yapımında kullanılan biyoseramikler ise, hidroksiapatitler (HA) ve trikalsiyum fosfatlar (TCP) olup, özellikle kemik doku uygulamalarında ve kompozit iskelelerde kullanılırlar. HA ve TCP biyoaktif olup hücrelerle bütünleşebilme özelliğindedirler [30]. Kompozit iskele hazırlamada en çok kullanılan materyal kalsiyum fosfattır. Kemiğin yaklaşık %60'ını oluşturan bu malzemenin Ca/P oranı çok önemlidir. Bozunma hızı ve mekanik dayanımı düşük olduğundan kompozit iskelede kullanıma uygundur [31].

Doku iskeleleri, gerçek doku mikroçevrelerine benzer, doku oluşana kadar geçici olarak görev yapan, tedavi sağlanırken aynı hızda bozunarak ortadan kalkan yapılardır. Kısacası, yapay ekstraselüler matrislerdir. Bir doku iskelesinin en önemli özellikleri; biyouyumlu, biyobozunur ve gözenekli yapıda olmasıdır [26]. İskeleler biyouyumlu olduklarında dokuya özgü uyum sağlayabilir ve hücrelerin yapışmasını destekler. Ayrıca biyobozunurluk özelliği ile yeni doku oluşumuna eş hızda bozunmalı ve toksik kalıntı bırakmamalıdır. Biyomalzemeler hidroliz ile veya enzimatik olarak bozunabilirler [32]. Gözenekli yapıdaki doku iskeleleri ile hücrelerin yayılabilmesi ve beslenebilmesi sağlanırken ayrıca büyük moleküllerin taşınmasına da olanak sağlanır. Bir doku iskelesinde ortalama %80-90 gözeneklilik ve 100-400 µm aralığında gözenek boyutu istenmektedir [33]. Örneğin hayvan hücresi yaklaşık olarak 15 µm çapındadır. İstenen gözenek boyutu hayvan hücrelerinin kaynaşması için uygundur. Gözeneklerin birbirleriyle bağlantılı olmaları da istenen özellikler arasındadır. Ayrıca, uygulama yapılan dokuya uygun mekanik dayanım ve sterillenebilir olmaları da doku iskeleleri için kritik özelliklerdir [34].

Doku iskelesinin biyolojik özellikleri çok önemlidir. İskelenin fiziksel ve kimyasal yapısı hücre tutunmasını desteklemelidir. Bu noktada iskelenin, hidrofilik veya hidrofobik özellikleri büyük önem taşımaktadır. Örneğin; polietilen glikol (PEG) son derece hidrofilik bir yapıdadır. Hücrelerin tutunması üzerini kaplayabilen su nedeniyle engellenir. Evrensel hücre tanıma motifi olan arjinin-glisin-aspartik asit (RGD) hücre yapıştırıcı bir sekans olup PEG'in bu sekansla modifikasyonu sonucu hücresel yapışma desteklenir [35].

2.2.1.2. Doku İskelelerinin Üretimi

Doku iskeleleri, fabrik veya sünger yapıda olabilir. Fabrik yapıda olanlar mikro veya nano boyutta dokunmuş veya dokunmamış özellikte üretilebilirler. Dokunmamış fiberler elektroçirme tekniği ile üretilirler. Mikrofiberler dokunmamış olarak üretilip üst üste konarak iskele oluşturulur. Bu iskelelerin, düşük mekanik dayanım, hızlı

bozunma, kontrolsüz gözenek boyutu ve değişken fiber çapı gibi dezavantajları bulunmaktadır. Nanofiberler yüksek gözeneklilik ve iyi mekanik özelliklere sahiptirler. Hayvansal hücreler mikron boyutunda olmasına rağmen hücre üremesi, göçü, tutunması gibi olayların hepsi aslında nanoboyutta başlamaktadır. Bu nedenle biyomimetik iskele yapımında nanofiberler çok daha uygundur [36]. Nanofiberler elektroëirme yöntemi ile üretilirler.

Elektroëirme, polimer kimyası, akışkanlar dinamiğı, elektrik fiziğı, tekstil ve makine mühendisliğı gibi temel disiplinlerden destek alan bir yöntemdir. Elektroëirme yönteminin deney düzeneğı temel olarak üç bölümden oluşmaktadır. Bu bölümler; voltaj güç kaynağı, toplayıcı ve besleme ünitesidir. Bu yöntemin, polimer çözelti viskozitesi, şırınga ucu ve toplayıcı arası uzaklık, akım, uygulanan voltaj, akış hızı ve sıcaklık gibi kritik koşulları vardır [37].

Elektroëirme yönteminde, polimer uygun çözücünde çözülür veya ısıyla eritilip bir şırınganın ya da ucunda ince bir delik bulunan cam pipetin içine yerleştirilir. Ardından, bu çözelti/eriyik şırınga ucu ile karşısına yerleştirilmiş olan toplayıcı levha arasına 50 kV'a kadar bir gerilim uygulanır. Besleyici üniteindeki iğne ucunda asılı halde bulunan polimer çözelti damlası kritik voltaj değerine kadar yüzey gerilim kuvvetlerinden dolayı küresel biçimde bulunur. Uygulanan potansiyel fark için bir eşik değerine ulaşılması ile elektriksel kuvvetler yüzey gerilimi kuvvetlerine eşitlenir ve polimer damlası koni biçimini alır. Polimer damlası "Taylor konisi" adı verilen bu hali aldıktan sonra voltajdaki ufak bir artış ile koni ucundan jet fışkırır. Bu jet, üzerindeki yükler nedeniyle bir noktadan itibaren kararlılığını yitirir ve aldığı yol boyunca dönme hareketi yaparak toplayıcıya ulaşır. Polimer jet, toplayıcı ve şırınga ucu arasındaki mesafeyi katederken incelerek nano boyutta fiber yapısına ulaşır. Aynı zamanda, bu yol alınırken polimer içeriğindeki çözücü de buharlaşır, kuru fiber elde edilir [28].

Sünger yapıda olan doku iskelelerinin üretiminde ise geleneksel ve hızlı prototipleme yöntemleri kullanılır. Geleneksel yöntemler; çözücü-döküm/parçacık-uzaklaştırma, eriyik kalıplama, gaz köpükleştirme ve dondurarak-kurutma olarak sıralanabilir. Hızlı prototipleme yöntemleri; ısı etkisiyle, adezif kullanarak, ışık etkisiyle ve kalıplama ile gerçekleştirilmektedir. Bunlardan ısı etkisiyle fabrikasyon yöntemleri seçimli lazer sentezleme ve eriyik döküm modelleme olmak üzere ikiye ayrılır. Diğer yöntemler ise; üç boyutlu yazıcılar ile üretim ve ışık etkisi ile üretim yöntemi olan stereolitografidir [38].

2.2.2. Kemik Doku Mühendisliğinde Kullanılan Hücreler

Kemik doku mühendisliğinde kullanılacak olan hücreler primer hücreler, ölümsüz hücreler ve kök hücreler olabildiği gibi hücre bankalarından elde edilebilen hücre hatları da olabilir.

Primer hücreler, doğrudan hastanın kendi canlı dokusundan alınır. Çeşitli hücre tiplerini içerebilir ve *in vivo*daki hücrelerle benzerdirler [39]. Sınırlı bir bölünme ve büyüme kapasitesine sahip olan bu hücreler doğrudan hastadan alınması sebebiyle bazı dezavantajları da beraberinde getirebilir.

Ölümsüz (sürekli) hücreler, genellikle kanserli yapıdaki tümörlerden elde edildiği gibi *in vitro*da kendiliğinden veya kimyasal yolla da transforme olmuş olabilirler. Sınırsız bir bölünme ve büyüme kapasiteleri vardır. Küçük ve küresel morfolojide, diğer hücrelere oranla yüzey bağımlılığı düşük, kolay kültür edilebilen ve yüksek çekirdek/sitoplazma oranına sahip hücrelerdir [40].

Kök hücreler, farklılaşmadan ve olgun hücreye dönüşmeden kendini yenileyebilen, 200'den fazla hücre tipine farklılaşma ve koloni oluşturma özelliğine sahip hücrelerdir. Kök hücre türleri; embriyonik, uyarılmış pluripotent, fetüs ve yetişkin kök hücrelerdir. Yetişkin kök hücreler; hematopoetik, mezenkimal ve kanser kök hücrelerini içermektedir. Kök hücreler elde edilmesi kolay, çok farklı dokularda bulunabilen, yüksek farklılaşma ve kendini yenileme kapasitesinde, yönlendirilebilen, güvenilir yapıda ve immunolojik yanıt oluşturmayan özelliktedir. Ancak, yüksek maliyetli tedaviler gerektirmeleri, tümör oluşturma riski taşımaları ve embriyonik kök hücrelerin sahip olduğu etik problemler gibi dezavantajları da bulunmaktadır [41].

"Hücre hatları" ise hücre bankalarından elde edilebilen, sınırlı sayıda veya sürekli pasaj yapabilen hücrelerdir. Bu hücreler bir hastalık modeli olabilir ve hayvanlar kullanılmadan çeşitli *in-vitro* testlerin yapılmasına olanak sağlarlar. Keşfedilen ilk ölümsüz hücre hattı olan ve Henrietta Lacks'ın adını taşıyan HeLa hücre hattı 1951'de rahim ağzı kanserinden elde edilmiştir. HeLa ile yapılan ilk çalışma 1952 yılında test edilen çocuk felci aşısıdır [42]. En bilinen diğer hücre hatları; Cos7 - fibroblast benzeri böbrek üremesi, HEK293 - embriyonik böbrek hücresi, MC3T3-E1 - preosteoblastik hücre, U2OS - osteosarkom hücresi, L929 - fibroblast, CHO - yumurtalık hücresi ve MG63 - osteosarkom hücre hatlarıdır [43].

2.2.3. Kemik Doku Mühendisliğinde Kullanılan Biyosinyal Moleküller

Doku mühendisliği çalışmalarında ekstraselüler matrislere benzer yapıların hazırlanması amaçlanmaktadır. Biyosinyal moleküller, bulundukları ortamda hücreyel bir cevap sağlayan moleküllerdir.

Biyosinyal moleküllerin birçok biyolojik etkisi bulunmaktadır. Bunlar; hücre yapışması, hücre göçü, hücre çoğalması ve hücre farklılaşmasının kontrolüdür. Hücre yapışması sırasında, hücrelerde farklılaşma olmakta, morfoloji değişmekte ve bazı biyokimyasal reaksiyonlar meydana gelmektedir [44]. Mikrodesezleşme, hücre adacıkları oluşturma veya difüzyonel ve difüzyonel olmayan bölgeler belirlenerek hücre yapışması kontrol edilebilir, kökültür çalışmaları yapılabilir. Böylece doku daha iyi taklit edilmiş olur [45]. Hücre göçü anjiyogenezle veya neovaskülarizasyon ile olabilmektedir, ayrıca kimyasal ve fiziksel çevreden etkilenir. Uygulama yapılan materyalin özelliğine göre hücrelerin yayılma ve göç durumu değişir. Büyüme faktörlerinin çoğalmaya olan etkisini arttırmak için immobilize edilerek kullanımları tercih edilmektedir. Hücre farklılaşmasının kontrolünde, embriyonik kök hücreleri farklılaşmadan çoğaltmak için biyosinyaller kullanılır. Ayrıca hücre farklılaşması ve rejenerasyonu için de büyüme faktörleri kullanılır [46].

Hücre adezyon molekülleri (CAMs), hücre-hücre ve hücre-ECM arası etkileşimi sağlarlar. En önemli hücre adezyon reseptörleri; katezinler, selektinler, immünoglobulinler ve integrinlerdir. Immünoglobulinler (IgCAMs), hücre yüzeyinde bulunan glikoproteinlerdir. Bu moleküller, homotipik veya heterotipik bağlanmalar yaparlar, morfogenez, embriyogenez, organogenez ve inflamasyonda görev almada etkin rol oynarlar [47]. Hücre yapışması, göçü ve yayılmasını vb. uyaran, yara iyileşmesi ve inflamasyonda görev alabilen yapısal proteinlere örnek olarak vitronektin ve laminin verilebilir.

Büyüme faktörleri, biyolojik çevrede proliferasyon, migrasyon ve farklılaşma gibi hücreyel bir cevabın alınmasını sağlayan çözünür haldeki sinyal polipeptitlerdir [48]. Hücrenin mikroçevresinden bilgi alıp hücreye iletirler. Böylece hücre farklılaşma, göç vb. özelliklerini gösterir [49]. Büyüme faktörleri ile hücre-ECM arası bilgi alışverişi sağlanır. Büyüme faktörleri, sinyaller oluşturarak hücre içi onarım mekanizması gibi mekanizmaları da uyarabilirler [50].

Büyüme faktörleri; kemotaktik, mitojenik, morfojenik, apoptotik ve metabolik etki sağlayabilirler. Tanımlanan yaklaşık 120 büyüme faktörü bulunmaktadır ve bunlar trans membran moleküller aracılığıyla bağlanırlar. Başlıcaları; Epidermal büyüme

faktörü (EGF), fibroblast büyüme faktörü (FGF), insülin benzeri büyüme faktörü (IGF), vasküler endotelyal büyüme faktörü (VEGF) ve kemik morfogenetik proteinler (BMP)'dir [51].

2.3. Salinomisin

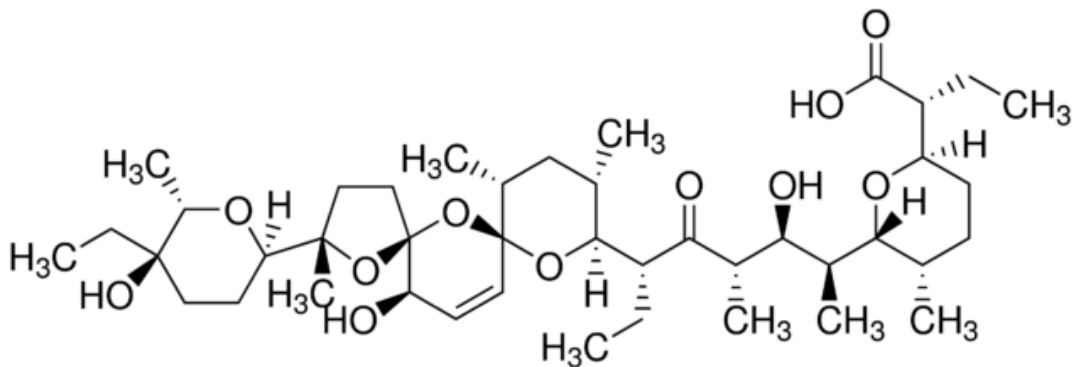
Salinomisin, ilk olarak 1974 yılında *Streptomyces albus* bakterisinden elde edilen monokarboksilik poliyeter yapıda bir antibiyotiktir [12, 13].

1980'lerde salinomisin, funguslar, parazitler ve Gram-pozitif bakteriler gibi geniş spektrumlu bir antimikrobiyal ajan özelliğinde olduğu için veteriner ilacı olarak kullanılmaktaydı [14].

Gram-pozitif bakteriler üzerinde antimikrobiyal etkiye sahip olan salinomisin özellikle *Staphylococcus aureus*, *Mycobacteria*, *Eimeria*, *Plasmodium falciparum* ve bazı filamentöz mantarlar üzerinde etkinlik göstermektedir [52, 53].

Salinomisin, belirli teknikler ışığında doğal olarak üretilebilen antibiyotiklerdendir. Molekül ağırlığı 751 g/mol olan bir ilaçtır. Yapısında bir uçta karboksil grubu diğer uçta da bir hidroksil grubu bulunmaktadır. Bu bileşenler sayesinde salinomisin, katyonlarla ve kısmen de sodyum iyonları ile kolaylıkla siklik kompleksler oluşturabilmekte ve biyolojik membranlarla çapraz bağlanma özelliğine sahip olmaktadır [53].

Molekül yapısı Şekil 2.2.'de görülen salinomisin $C_{42}H_{70}O_{11}$ molekül formülüne sahiptir. Lipofilik ve zayıf asidik özellikte olmakla birlikte potasyum gibi alkali iyonlar için seçicidir. Bu özelliği sayesinde transmembran potasyum seviyesini değiştirerek K^+ iyonunun mitokondriden ve sitoplazmadan çıkışını artırıp mitokondriyal oksijenli solunumu engellemektedir. Pozitif ionotropik ve kronotropik bir ajan olan salinomisin kullanılarak bir takım çalışmalar yapılmıştır. Bu çalışmaların sonucunda köpeklerde kan akışı, kan katekolamin seviyesi ve arterial basınç artışı gibi sonuçlar görülmüştür. Yan etkilere sebep olması nedeniyle insanlarda uygulama yapılmamıştır [13].



Şekil 2.2. Salinomisinin molekül yapısı.

Yapılan birçok çalışma ile salinomisin hücre ölümü geleneksel olmayan yollarla sağladığı, DNA hasarını arttırdığı ve Wnt sinyal yolağını engellediği kanıtlanmış ve buna bağlı olarak birçok kanser türü üzerinde antikanser aktivite sağlayacağı belirlenmiştir [14]. *In vivo* ve *in vitro* çalışmalarda istenen etkinin sağlanabilmesi için en önemli parametrelerden biri salinomisin kullanım dozunun belirlenmesidir. Bu dozun saptanması için bir takım ön çalışmalar ile uygulama yapılacak olan doku veya hücreye gerekli olan salinomisin konsantrasyonu bulunmaktadır [54].

Kanser kök hücreleri, tümör oluşumunu başlatan ve kendini hızla yenileyebilen özellikteki hücrelerdir. Tümör hücrelerinin sadece bir kısmını oluşturan kanser kök hücreleri tümör hacminin büyümesine de sebep olmaktadır [13]. Kanser kök hücreleri, kan, göğüs, beyin, kemik, karaciğer, deri, mesane, yumurtalık, prostat, kolon ve pankreas gibi insan vücudundaki birçok kanser türü için tanımlanmıştır. Buna ek olarak, sayısız direnç mekanizmaları ile kemoterapötiklere ve radyasyon terapilerine rağmen uzun dönemde tümörün yeniden yayılmasına ve metastaza sebebiyet vermektedirler [12].

Salinomisin, kanser kök hücreleri üzerinde etkin olan ve göğüs kanser tedavisinde sıkça kullanılan kemoterapötik bir ilaçtır. Memelilerle yapılan *in vivo* çalışmalarda, salinomisin tedavisi ile tümör gelişimi engellenmiş ve tümör hücrelerinin epitel hücrelere farklılaşmasında artış sağlanmıştır. Buna ek olarak; global gen ekspresyon analizleri göstermiştir ki, salinomisin tedavisi sonucunda doğrudan hastadan izole edilen göğüs dokusunda önceden tanımlanan göğüs kanser kök hücre gen ekspresyonunda ciddi oranda bir düşüş sağlanabilmiştir [55].

Salinomisin kanser kök hücrelerini seçimli olarak öldürebilmektedir. Bu nedenle, düşük doz salinomisin insan mezenkimal kök hücrelerine hiçbir zarar vermemektedir [56]. Etki mekanizması tam olarak belirlenememiş olsa da uygulandığı bölgede salinomisin epitel farklılaşmayı sağlayabilmektedir. Bu da salinomisin diğer insan hücre hatlarının proliferasyonunu engellemediğinin bir kanıtıdır [57]. Tedavi sırasında salinomisin kontrollü olarak, kanser kök hücreleri ile onların yüzey belirteci olan yüksek CD44 ve hücre adezyon molekülü olan düşük CD24 antijenik fenotiplerinin oranını önemli ölçüde düşürerek etki göstermektedir. *In vivo* çalışmalarda salinomisin ile farelerde uygulama yapılmış olup meme kanseri tedavisinde kullanılan ve kemoterapötik bir ajan olan paklitaksel göre çok daha yüksek etkinliğe sahip olduğu kanıtlanmıştır [55, 58].

Salinomisin, preadipositlerin adipositlere dönüşmesini engeller. İnsan mezenkimal kök hücreleri farklı mezenkimal hücrelere farklılaşabilmektedir. Yapılan araştırmalar ışığında, kronik olarak salinomisine maruz kalırlarsa mezenkimal kök hücrelerin fonksiyonel özelliklerinin hasar görüp görmeyeceği ve genotoksik etki oluşup oluşmayacağı incelenmiştir. Düşük dozda salinomisin ile kemik iliği mezenkimal kök hücreleri 4 haftada tedavi edilebilmiştir. Tedavinin sonunda, hücre morfolojisinde ve iskeletinde bir değişiklik olmamıştır. Adiposit ve osteositlerdeki farklılaşma salinomisin kaynaklı değildir ve proliferasyon yetenekleri salinomisine maruz kaldıkları için engellenmez, herhangi bir genotoksik etki oluşmaz [59].

Salinomisin etkili bir anti-kanser ajan olarak gösterilmektedir. Kümes hayvancılığında sıklıkla antiprotozoal ajan olarak koksidiyal parazitlerine karşı ve üremeyi aktifleştirici olarak kullanılmaktadır [12].

Salinomisinin insan kanser kök hücrelerini elimine etmede benzer ajanlara oranla 100 kat daha etkili olduğu yapılan çalışmalar ile kanıtlanmıştır. Güncel kanıtlar ışığında görülmüştür ki salinomisin, hücre döngüsündeki ilerlemeyi duraklatır, apoptozu sağlar, mitokondriyal membran potansiyelini yok eder ve diğer antikanser ilaçlar ile sinerjik olarak hareket edebilir. Salinomisinin kanser kök hücrelerini ve apoptoza dirençli kanser hücrelerini öldürme yeteneği onu benzersiz yapar ve bu sebeple özgün bir antikanser ajan olarak tanımlanır. İnsanlar ve fareler üzerinde yapılan pilot çalışmalarda görülmüştür ki salinomisin sergilediği farklı mekanizmalar ile umut verici bir antitümör etkiye sahip olmaktadır [12].

2.3.1. Salinomisinin Etki Mekanizması

İyonofor, karboksilik ve polieter yapıdaki salinomisin, bir koksidiyostat olarak kümes hayvanlarında gelişimi teşvik etmesi için sıkça kullanılmaktadır [12]. İyonoforların koksidiya ve mikrofloralara olan etki mekanizması iyi bilinmesine karşın memelilerdeki toksik etki mekanizması tam olarak anlaşılamamıştır. Özellikle insan organizmaları üzerine salinomisin etkisi henüz tamamıyla tetkik edilememiştir [60].

Boehmerle ve arkadaşları tarafından yapılan bir çalışmada [61] kanser kök hücrelerine karşı salinomisinin gösterdiği yüksek toksisite etkisi incelenmiştir. Bu etki, sitozolik Na^+ konsantrasyonunun artması aracılığıyla sağlanmıştır. Üstelik sitozolik Ca^{2+} artışına da sebep olarak plazma membran içerisinde mitokondri kadar iyi bir $\text{Na}^+ / \text{Ca}^{2+}$ dönüşümü gerçekleştirir. Böylece, salinomisin kalpain ve sitokrom sayesinde Şekil 2.3.'te de görüldüğü gibi kaspaz 9 ve sonradan oluşan kaspaz 3 aktivasyonu aracılığıyla hücre

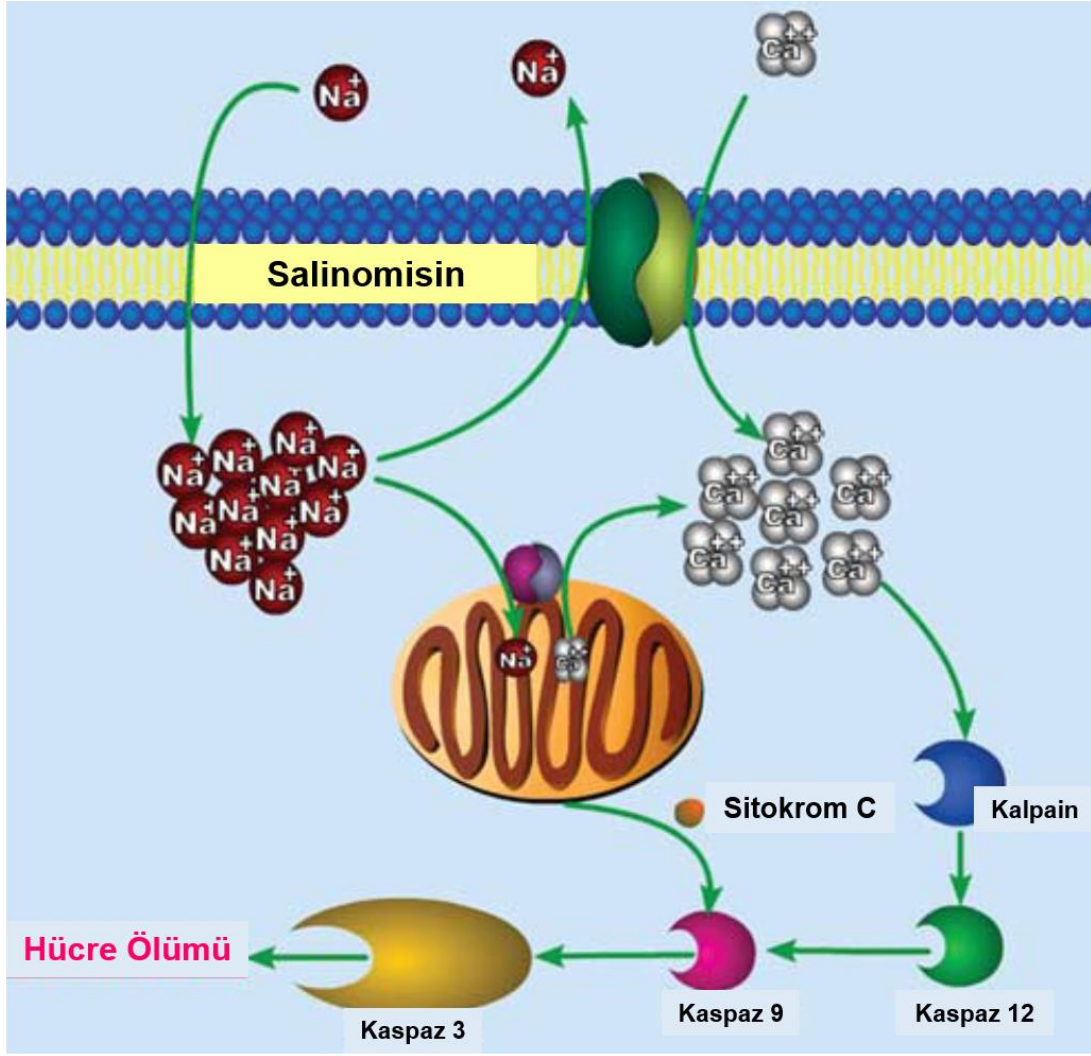
canlılığını güçlü biçimde azaltmıştır. Bu bulgular salinomisinin patojenler üzerindeki etki mekanizmasını açıklanabilir kılmaktadır.

Bilim insanları salinomisinin antikanser aktivite mekanizmasını açıklamak için hala çalışmalar yürütmektedir. Yapılan bu çalışmalar salinomisinin güçlü etkide bir antikanser ilaç olduğunu ispatlamıştır ancak araştırmacılar, bu bileşenlerin hareket mekanizmasını belirleyemediklerini kabul etmişlerdir [60].

Bir diğer çalışmada, salinomisinin etki mekanizmasının açıkça bilinmemesine karşın; sitotoksisiteyi tetiklemek yerine hücre döngü tutuklaması aracılığıyla terminal epitel farklılaşmasına neden olabileceği de görülmüştür. Salinomisinin kanser hücrelerinin proliferasyonunu nasıl etkilediği tam olarak bilinmemesine rağmen elde edilen çalışma sonuçlarına göre salinomisinin bir bağımsız kaspaz mekanizma ile insan kanser hücrelerini apoptoza götürdüğü kanıtlanmıştır [62].

Gupta ve arkadaşları yaptıkları bir çalışmada, bilinen tüm özelliklerine karşın salinomisinin bilinmeyen bir mekanizma ile faredeki bir tümör küresinden seçimli olarak göğüs kanser hücrelerini azalttığını ve göğüs tümörünün gelişimini de engellediğini belirlemişlerdir [55]. Bu araştırma ile salinomisinin güçlü bir antikanserojen ilaç olduğu tekrar ispatlanmıştır.

Çoğu insan kanser hücresi apoptoza direnç mekanizmasına sahiptir veya zamanla direnç oluşturmaktadır. Salinomisin sadece kanser kök hücrelerini azaltan etkide bir özgün antikanser ajan değildir. Aynı zamanda apoptozu sağlayan ve çoklu direnç mekanizması geliştiren kanser kök hücrelerinin de üstesinden gelebilen yapıdadır. Ancak bu mekanizmanın net biçimde anlaşılabilmesi için çok daha fazla araştırma yapılması gerektiği düşünülmektedir [63].



Şekil 2.3. Salinomisinin etki mekanizması ([61]'den düzenlenmiştir).

Zhou ve arkadaşları, salinomisinin umut verici özgün bir antikanser ilaç olmasına rağmen çalışma mekanizmasının net olmadığını belirtmişler ve muhtemel antitümörjenik mekanizmasından bahsetmişlerdir [14]. Antimikrobiyal bir ilaç olarak salinomisin, K^+ , Na^+ , Ca^{+2} veya Mg^{+2} katyonlarının, protozoalar ve Gram-pozitif bakterileri içeren hedef organizmaların hücre membranlarından geçişini sağlayan bir iyonofordur. Bu taşıyım ile hücre içi kalsiyum oranı artar ve ozmotik denge bozularak organizmaların ölüm yanıtı vermeleri sağlanmış olur. Her ne kadar bu iyonofor özellikler ve mekanizmalar uygulanabilir ve yeterli olsa da salinomisinin kanser kök hücreleri ve çoklu ilaç direncine sahip kanser hücreleri üzerindeki etkisini açıklamak için yeterli bulunmamıştır. Birçok çalışmada görülmüştür ki salinomisin, alışılmadık hücre ölüm yollarından harekete geçer, DNA hasarını artırır ve Wnt sinyalizasyon yolağını engeller. Bu bulgular salinomisinin antitümörjenik aktivitesini ve çok boyutlu antikanser kök hücre mekanizmasını anlaşılır kılar. İyon kanalları ve taşıyıcıların

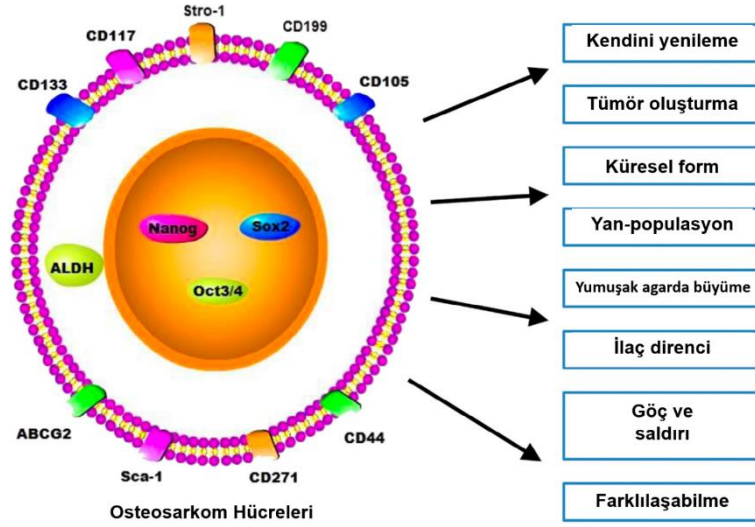
kanser hücrelerinin proliferasyonu, apoptozu, invazyonu ve farklılaşması üzerinde önemli fonksiyonlar sergilediği ve kanser terapisinde ortaya çıkan bir hedef olduğu güncel çalışmalarla ispatlanmıştır. Salinomisin, membranların lipid bariyerleri vasıtasıyla çift yönlü iyon akışına olanak sağlayan ve böylece hem prokaryotik hem de ökaryotik hücrelerin kendi iyon taşıma sistemlerine engel olan fonksiyonlara sahiptir. Yüksek potasyum iyonofor seçiciliği ile salinomisin, potasyum kanallarına müdahale ederek potasyum iyonlarının mitokondri ve sitoplazmadan dışarı sızmasını kolaylaştırır [14].

Salinomisin tarafından tetiklenen hücre ölüm mekanizmalarının büyük ölçüde mitokondriyal fonksiyonların bozulmasına, reaktif oksijen türlerinin (ROS) gereğinden fazla üretilmesine ve kaspaz-bağımlı ve bağımsız yolların hücre tipi bazlı olmasına bağlı olduğu düşünülmektedir. Salinomisin tarafından etkilenen başlıca yollar; Wnt/ β -katenin ve Akt/mTOR'dur [64]. Salinomisin hedeflendirmeli kanser kök hücreleri Wnt/ β -katenin yolağını engellemektedir. Nanomolar konsantrasyonlar Wnt'yi engellemek için yeterliyken; β -katenin aktivasyonunu, yüksek konsantrasyonlar (mikromolar konsantrasyonlar) engellemektedir [65].

Salinomisinin bir diğer önem taşıyan fonksiyonu ise çoklu direnç protein fonksiyonunu engelleme yeteneği ile ilaç direnci olan hücrelerin tedavisinde kullanılabilmesidir [64].

2.3.2. Salinomisinin Kemik Doku Kanserine Etkileri

Osteosarkom, özellikle çocukluk ve ilk ergenlik dönemlerinde en çok görülen birincil kemik tümörüdür [15]. Kemoterapiye ve cerrahi müdahalelere rağmen kemik dokuda gelişmeye ve tekrarlamaya devam edebilen agresif ve pediyatrik bir tümör çeşitidir [66]. Özellikleri Şekil 2.4.'te verilmiş olan osteosarkom kök hücreleri tümörün nüksetmesinde temel rol oynarlar ve kendini yenileme ve farklılaşma özellikleri ile metastaza ve kemoterapiye direnç gösterirler [67]. Kemik sarkomunun bilinen histoloji türlerinden %60'a yakını çocukluk döneminde ortaya çıkmaktadır. Gelişmiş cerrahi uygulamalara ve yoğun kemoterapi tedavilerinde elde edilen başarıların artmasına rağmen uzun dönemde bölgesel osteosarkomun durdurulma oranı yaklaşık olarak %65'tir. Metastatik hastalıklarda ise bu oran sadece %20 civarındadır [15, 68].



Şekil 2.4. Osteosarkom hücrelerini tanımlayan özellikler ve sıkça kullanılan moleküler belirteçler [67].

Osteosarkom iskeletin her bölgesinde meydana gelebilir ve genellikle ancak ileri evrelerinde teşhis edilebilmektedir. Kötü huylu tümörlerin tedavisinde osteosarkoma karşı doksorubisin, cisplatin, metotreksat ve ifosfamid gibi kemoterapötik ilaçlar kullanılmaktadır; ancak osteosarkom tümörleri çoklu ilaca direnç gösterme özelliğine sahiptir. Bu nedenle yeni ve özgün bir kemoterapötik ilaç ihtiyacı ortaya çıkmıştır. Salinomisin aslında bir veteriner ilacı olarak kullanılırken çoklu ilaç taşıyıcı p-glikoproteinler üzerinde göğüs kanseri kök hücrelerini engelleyici etki gösterdiği belirlenmiştir. Ayrıca prostat, göğüs ve kalın bağırsak kanseri üzerinde yapılan bazı çalışmalar ile de salinomisinin antikanser etkisi desteklenmiştir [69].

Kanser kök hücreleri, normal kök hücrelerin karakteristiğine de sahip olan kök hücre türlerindendir. Kanser tedavisinde kanser kök hücrelerinin tedavisi kritik rol oynamaktadır. Bazı durumlarda, osteosarkomlu hastalarda kemoterapi veya ameliyat sonrasında bir tümör yeniden nüksedebilir. Bunun sonucu olarak, osteosarkom klinik uygulamaları için bu güncel terapötik yaklaşımların kanser kök hücreleri üzerinde yeterince etkili olmadığı anlaşılmıştır. Çeşitli görüntüleme metodları kullanan araştırmacılar, özgün çalışmaları için birçok eski kemoterapi ilacını antikanser kök hücre aktivitesi uygulamalarında kullanmak üzere tanımlamıştır. Bu ilaçlardan biri olan salinomisin, göğüs kanser kök hücreleri ve lösemi kanser kök hücreleri gibi çeşitli kanser kök hücrelerini başarıyla öldürmektedir [15]. Yapılan bazı çalışmaların bulguları sonucunda, salinomisinin yan etkilere sebep olmadan seçimli kanser kök hücre hedeflendirmesi ile hem *in vivoda* hem de *in vitroda* osteosarkomu engellediği

ve Wnt/ β -katenin sinyal yolağının salinomisinin terapötik mekanizması içerisinde yer aldığı ispatlanmıştır [15, 68].

Salinomisinin kanser kök hücrelerini öldürmedeki yüksek potansiyeline rağmen düşük suda çözünme özelliği klinik uygulamalarını engellemektedir. Bu problemin önüne geçebilmek için salinomisinin nanopartiküllerle birlikte kullanılması gündeme gelmiştir [15].

Salinomisinin osteosarkomu engelleyici ve kanser kök hücreleri üzerindeki öldürücü etkisi yapılan çalışmalarla ispatlanmış olsa da; Wnt supresyonuna, p-glikoprotein engellemesine ve reaktif oksijen türleri (osteoblastoma hücrelerinde üretilerek protein aktivasyonunu engellemektedirler) üretimine rağmen antikanser etkili salinomisin uyarı mekanizması henüz tam olarak çözümlenememiştir [70]. Osteosarkom tedavisi sırasında salinomisinin aynı zamanda sitoprotektif otofaj aktivasyonuna da neden olduğu görülmüştür. Salinomisin hem *in vivo* hem de *in vitro* uygulamalarında, osteosarkom hücreleri üzerinde yüksek hassasiyete sahiptir [71]. Yapılan araştırmalarla kanıtlanmıştır ki salinomisin, hiçbir yan etkiye sebep olmaksızın osteosarkom kök hücrelerin pluripotent anahtar belirteçlerinden Oct4 ve Sox2 ekspresyonlarını engeller ve osteosarkom kök hücrelerinin küreselleşme kapasitelerini azaltarak kemorezistans özelliklerini baskılar [67].

Osteosarkom kök hücrelerini belirleyebilmek için kullanılan birçok belirteç tanımlanmıştır. Bu belirteçler kök hücre canlılığını belirlemede pek önem taşımazken onların farklılaşma durumları hakkında bilgi vermektedir [66]. Örneğin; CD133 molekülleri, normal ve kanserli dokularda bir kök hücre belirteci olarak tanımlanmaktadır ve osteosarkom ve diğer tümörler ile yapılan çalışmalarda kanser kök hücre belirteci olarak kabul edilmiştir [15].

Yapılan bir çalışmada, insan osteosarkom hücrelerinden U2OS hücreleri kullanılarak salinomisinin apoptoza sebep olması ve etki mekanizması incelenmiştir. Salinomisinle yapılan sitotoksikite araştırmalarında belirli konsantrasyonda salinomisinle U2OS hücreleri muamele edilmiştir. Sonucunda salinomisinin hücre canlılığını azalttığı kanıtlanmıştır. Salinomisin mitokondriyal fonksiyon bozukluğuna neden olarak hasara yol açmaktadır. Salinomisinin osteosarkom hücrelerine olan etki mekanizması bu çalışmada da tam olarak anlaşılmamakla birlikte salinomisinin reaktif oksijen türlerinin (ROS) üretimini destekleyerek U2OS hücrelerini apoptoza götürdüğü ve otofajiye neden olduğu kesin olarak ispatlanmıştır [69].

2.3.3. Salinomisinin Kullanım Alanları

Doğal karboksilik poliyeter antibiyotiklerden olan salinomisin, çeşitli insan tümör hücrelerine karşı aktivite gösteren antiproliferatif özellikte bir ilaçtır. Bu insan tümör hücreleri; kan kanseri kök hücreleri, kolon karsinoma kök hücreleri, prostat kanser kök hücreleri ve akciğer kanser hücre hatlarıdır [72].

Salinomisin, seçimli olarak göğüs kanseri kök hücrelerini etkili biçimde öldürme yeteneğine sahiptir. Yapılan çalışmalarda görülmüştür ki p-glikoprotein inhibitörü olarak davranmakta ve apoptoza dirençli insan kanser hücrelerinin üstesinden gelebilmektedir [73]. Bazı çalışmalar sonucunda salinomisin kan kanseri kök hücreleri benzeri hücreleri içeren apoptoza dirençli insan kanser hücrelerinin üstesinden gelmek için bir p-gp inhibitörü foksiyonuna sahip olduğu belirlenmiştir [60]. Ayrıca salinomisin apoptozu artırarak DNA'ya hasar veren kemorezistant kanser hücrelerini engellemekte ve p21 protein seviyesini azaltarak proteazom aktivitesini arttırmaktadır [74]. Bunlara ek olarak, Wnt sinyalizasyonunu engellemekte ve kronik kan kanseri hücrelerinde seçimli apoptoza neden olmaktadır. Tüm bu özellikleri ile salinomisin kanser terapisinde etkili bir antikanser ilaç olarak kullanılmaktadır [65, 75].

Antimikrobiyal testler ile salinomisin, Gram-pozitif bakterilere ve özellikle de klinik olarak izole edilmiş metisiline dirençli *Staphylococcus aureus* bakterilerine karşı etki gösterdiği bilinmektedir [76]. Antimikrobiyal aktivitesi ile salinomisin özellikle *Staphylococcus*: metisiline dirençli *S. aureus* (MRSA) ve metisiline hassas *S. aureus* (MSSA) bakterilerine karşı etkili olmaktadır. Yapılan çalışmalar ile, salinomisin ilaca dirençli insan patojenik bakterilerine karşı antibakteriyel aktivite gösterdiği kanıtlanmıştır [77, 78].

Kanatlılarda görülen ve protozoal bir hastalık olan koksidiyozu önlemek için antikoksidiyal ilaçlar kullanılmaktadır [79]. Koksidiyoz, çok sayıda hayvanın dar alanlarda bir arada bulundurulması ile ortaya çıkmaktadır. Güçlü bir antikoksidiyal iyonofor olan salinomisin enfeksiyon öncesi ve sonrasında kullanılarak tedavi çalışmaları yapılmıştır. Hastalık etkenleri, bağırsak epitel hücrelerinde morfolojik, fizyolojik ve metabolik değişimlere yol açmaktadır. Bunun sonucunda oksijen, glikoz, yağ asiti ve minerallerin absorpsiyonu bozularak ciddi ağırlık kaybına ve hatta ölümlere neden olabilmektedir [80]. Yapılan çalışma ile koksidiyoz etkeni olarak bilinen ve kanatlılarda sıkça karşılaşılan *Eimeria acervulina* bakterileri üzerinde salinomisin yüksek derecede etkili olduğu belirlenmiştir [81].

2.4. Enfeksiyona Neden Olan Gram Pozitif Bakteriler

1884 yılında diferansiyel boyama tekniklerinden biri olan Gram boyamayı geliştiren Christian Gram, bakterilerin Gram reaksiyonlarını incelemiştir. Gram reaksiyonuna göre bakteriler, Gram pozitif veya Gram negatif olarak tanımlanarak ikiye ayrılmıştır [82].

Gram pozitif bakteriler kalın peptidoglikan tabakası ile teikoik asit ve teikuronik asit içerirler. Bu bileşenler çok miktarda fosfodiester ve karboksil gibi elektronegatif grupları içerdiği için katyonik metal iyonlarıyla daha güçlü etkileşimleri vardır [83]. En çok rastlanan Gram pozitif bakteriler; *Staphylococcus*, *Enterococcus*, *Streptococcus*, *Lactococcus*, *Vagococcus*, *Pedicoccus* ve *Leucnostonoc* olarak bilinmektedir. Antibiyotik direnci en yüksek olanları *Staphylococcus* ve *Enterococcus*'tur. Antibiyotik dirençlilikleri nedeniyle son yıllarda nozokomiyal hastane enfeksiyonlarının tedavisinde çok ciddi problemlere neden olan bakteri türleri; *Enterococcus faecium*, *Enterococcus faecium* ve *Staphylococcus aureus* olmaktadır [84].

***Staphylococcus Aureus* Bakterileri**

Staphylococcus, ilk olarak *Micrococcaceae* ailesi içerisinde 1884 yılında tanımlanmıştır. Bu aile içerisindeki en patojen tür *S.aureus* olmakta ve doğada oldukça yaygın olarak bulunmaktadır. Bu patojen bakteri türüne, deri doğal florasında ve insan burun mukozasında da sıkça rastlanmaktadır [85]. *Staphylococcus*'lar çoğalmaları sırasında birbirlerinden ayrılmaz ve üzüm salkımı benzeri düzensiz kümeler oluştururlar. Yapılarından dolayı isimleri bu şekilde verilmiştir [86].

Rosenbach tarafından 1884'te ilk defa kültürleri yapılan *Staphylococcus*'ların karakteristik özellikleri incelenmiştir. Katı besiyeri üzerinde sarı ve beyaz koloniler oluşturan iki tür tespit edilmiştir. Oluşan beyaz kolonilere *Staphylococcus albus*, sarı kolonilere ise *Staphylococcus aureus* adı verilmiştir [87]. Bu bakteriler, Gram pozitif, oksidaz negatif, katalaz pozitif, sporsuz ve hareketsiz bakterilerdir [88].

S. aureus, fakültatif anaerobtur ve seçici olmayan besi yerlerinde düz, dairesel, parlak ve konveks koloniler oluşturur. Genellikle kagülaz üreten bu bakteri suşu %10'a kadar NaCl içeren konsantrasyonlarda iyi gelişme gösterirken %15 NaCl konsantrasyonunda gelişimi zayıftır [89]. *S. aureus* suşu 30-37°C'ta ve pH 7-7.5 aralığında optimum gelişim gösterir. Ayrıca laktoz, glukoz, maltoz ve mannitolden anaerobik ve aerobik koşullar altında asit üretebilir [90].

Staphylococcus'lar sıcak kanlı hayvanların vücut yüzeyinde yaygın olarak bulunmaktadır [91]. *S. aureus*'un yol açtığı enfeksiyonlar sıklıkla sellülit, fronkül,

impetigo ve cerrahi müdahale sonrasında oluşan yara enfeksiyonlarıdır. Bunların hepsi cilt enfeksiyonlarıdır. Bu bakteri suşu, pnömoni, ostemiyelit, perikardit, akut endokardit, menenjit ve serebrit gibi çeşitli doku ve organlarda da ciddi enfeksiyonlara neden olabilmektedir [92]. Antimikrobiklere karşı çok farklı mekanizmalarla etkili bir direnç gösterebilen bu bakterilerin neden olduğu enfeksiyonların tedavisinde büyük problemlerle karşılaşmaktadır. Metisiline dirençli suş adı altında ortaya çıkan ve diğer β -laktam antibiyotiklerini de spektrumuna alan intrinsik direnç bu problemlerin ana sebebidir [93].

Metisiline Dirençli *S. aureus* (MRSA) ve Metisiline Duyarlı *S. aureus* (MSSA) Bakterileri

Yıllar boyunca metisilin hastane kökenli enfeksiyonların iyileştirilmesi ve ortadan kaldırılmasında başarıyla kullanılmıştır. Ancak metisiline dirençli *S. aureus* suşlarının ortaya çıkmasıyla bu antibiyotiğin etkisi de kısıtlanmıştır. MRSA ilk olarak bu antibiyotiğin klinik olarak uygulamaya sokulmasıyla eş zamanlı olarak ortaya çıkmıştır [94]. Başta Amerika Birleşik Devletleri olmak üzere birçok batı ülkesi için MRSA, toplum kökenli önemli patojenlerden biri haline gelmiştir. MRSA enfeksiyonlarının çoğu cilt ve yumuşak doku kökenli olsa da pnömoni ve kan dolaşımı enfeksiyonlarına da sebep olabilmektedir [95]. MRSA suşları metisilin yanı sıra diğer β -laktam antibiyotiklerine, makrolidler, tetrasiklinler, kloramfenikoller ve aminoglikozidler gibi diğer birçok antibiyotiğe de dirençlidirler [96].

S. aureus'lar antimikrobiyal ajanlara diğer mikroorganizmalara göre çok daha fazla direnç göstermektedir. Özellikle MRSA'da multirezistans özelliğe sıkça rastlanmaktadır. Birçok çalışmada, *S. aureus*'un gentamisin, netilmisin, tobramisin, eritromisin, streptomisin, tetrasiklin ve siprofloksasin gibi daha birçok antibiyotiğe karşı dirençli olduğu ispatlanmıştır [97].

MRSA bakterilerinin etkili olduğu enfeksiyonlar arasında deri ve yumuşak dokuda gerçekleşenler önemli bir yer tutar. Genellikle derin ve cerrahi girişim gereken komplike yapıdaki apseler, diyabetik hastalarda ortaya çıkan enfeksiyonlar, enfekte yanık yaraları, enfekte ülser, derin boşluk enfeksiyonları bunların başlıcalarıdır. Bu enfeksiyonların tedavilerinde çoğunlukla Gram pozitif bakterilere karşı etkin antibiyotiklerin kullanılması gerekmektedir [98]. Daptomisin, teikoplanin, linezolid, seftarolin ve vankomisin bu antibiyotiklerin başında gelmektedir. Son yıllarda MRSA enfeksiyonlarından kaynaklı ölüm oranları MSSA enfeksiyonu kaynaklı olanlara göre %64 daha fazladır [99].

Türkiye'nin farklı bölgelerindeki 28 hastaneden 436 adet *Staphylococcus* suşu alınmıştır. Bu suşlar incelendiğinde; tüm suşların %60'ı yani 262 tanesi metisiline dirençli, %40'ı yani 174 tanesi ise metisiline duyarlı bulunmuştur [100].

2.5. Bor

Dünyanın en stratejik madenlerinden olan bor minerali ilk olarak Fransız Kimyacı Gay-Lussac ve İngiliz kimyacı Humphry Davy tarafından 1808'de keşfedilmiştir. Ardından boroksitin magnezyumla indirgenmesi ile Henri Moissan %85 saflıkta, 1909'da ise BCl_3 'ü elektrik arkında bozunduran Weintraub %99 saflıkta bor elde etmiştir [101].

Dünyada bor rezervlerinin çok büyük bir kısmı ABD (Kaliforniya), Rusya ve Türkiye'dedir [102]. Ülkemizde toplam 1 milyon 700 bin hektarlık alanı kaplayabilecek ve dünyadaki bor ihtiyacını 450-500 yıl süresince karşılayabilecek kadar bor minerali bulunmaktadır. Bu miktar dünya bor rezervlerinin %72'sini oluşturmaktadır ancak üretimin sadece %32'si ülkemizce yapılabilir. Türkiye ticari değerleri yüksek olan tinkal, kolemanit ve üleksit başta olmak üzere sahip olduğu bor cevherleri ve rezervlerinin kalitesi ile dünyanın en önde gelen ülkesidir [101, 103].

2.5.1. Borun Kimyasal Özellikleri

Periyodik tabloda 3A grubunda bulunan bor elementi bu grupta yer alan ve metal olmayan tek elementtir. Kimyasal sembolü B olup atom numarası 5 ve erime noktası yaklaşık olarak 2190°C 'dir. Borun oda sıcaklığında zayıf olan elektrik iletkenliği yüksek sıcaklıklarda çok artar. Nötron sayısı 6, elektron ve proton sayısı 5 ve atom çapı $1.78\text{\AA}$ olmaktadır [101]. Yarı iletken özelliğe sahip olan borun atom ağırlığı 10.81 ve yoğunluğu 2.84 g/cm^3 olmaktadır [103].

Yeryüzünde oldukça yaygın bir element olan bor; topraktan, kayalardan ve sudan elde edilebilir [104]. Oldukça sert ve yüksek sıcaklığa dayanıklı olmasıyla birlikte doğada serbest halde değil, tuz bileşikleri şeklinde bulunmaktadır. Normalde beyaz bir kaya biçiminde olan bor, amorf bir toz halinde iken koyu kahverengidir. Sertlik özelliği ve ametaller arasında elektropozitifliği elmasan sonra en yüksek olan elementtir [101]. Borun en yaygın bileşikleri; sodyum, kalsiyum ve magnezyumlardır. Bor hafif, gerilmeye karşı ve kimyasal etkilere karşı dayanıklı bir yapıdadır [103].

Doğada masif olarak diğer mineral ve kayalarla birlikte veya çözelti olarak sulara bulunabilen bor mineralinin üretim yöntemleri de bulunduğu yer ve derinliğe bağlı olarak değişmektedir. Karada açık ocak, kapalı ocak veya çözelti madenciliği ile sulara ise özellikle çözelti madenciliği ile üretilmektedir [105].

Kimyasal özellikleri morfolojisine ve tane büyüklüğüne bağlı olarak değişen bor elementi, mikron boyutunda iken amorf ve kolay reaksiyona giren yapıdadır. Ancak kristalin bor elementi kolaylıkla reaksiyona girmemektedir. Borik asit ve diğer ürünler borun yüksek sıcaklıkta suyla reaksiyonundan oluşmaktadır. Konsantrasyona ve sıcaklığa bağlı olarak mineral asitleri ile reaksiyonu sonucu borik asit ana ürün olarak ortaya çıkmaktadır [106].

Bor mineralleri; boraks (tinkal), kolemanit, üleksit, probertit, kernit (razorit), hidroborasit ve pandermittir. Doğada saf olarak bulunmayan bor, oksijenle bağ kurmaya çok yatkın olması sebebiyle farklı ve çok sayıda oksijen bileşiği oluşturmakta ve bu bor-oksijen bileşimlerine "borat" adı verilmektedir [101].

2.5.2. Bor'un Kullanım Alanları

Bor mineralleri, sayısız alanda kullanılabilirler. Temel bir sanayi hammaddesi olması nedeniyle endüstrinin neredeyse her alanında kullanılabilir. Borun başlıca kullanım alanları; inşaat malzemeleri, alev geciktiriciler, tarım ve gübre sanayisi, ahşap koruma, cam endüstrisi, seramik endüstrisi, nükleer sanayi, uzay araçları, ilaç sanayi, kimya sanayi, otomobil sanayi, temizletme ve beyazlatma sanayi, tekstil sanayi, tekstil cam elyafı, metalurji sanayi ve özellikle son dönemde sağlık sektörü olmaktadır. Gelişen teknolojinin de katkısıyla yakıt, jet teknolojisi ve uçak yapımı gibi daha birçok sektörde çok geniş çaplı kullanım sahasına sahip olacağı düşünülmektedir [101, 104].

Son yıllarda sağlık sektöründeki önemi fark edilen bor, kanser tedavisinde, kemik erimesinde, prostat tedavisinde ve antibakteriyel uygulamalarda kullanılmaya başlanmıştır [101]. Ayrıca tıp alanında, osteoporoz tedavileri, alerjik hastalıklar, psikiyatri, artrit, menopoz tedavisi, manyetik rezonans görüntüleme vb. çalışmalar için de kullanılmaktadır [103]. Örneğin kanser tedavisinde beyin kanseri için hasta hücrelerin seçilerek imha edilebildiği ve sağlıklı hücrelere minimum zarar veren bir teknik olan Bor Nötron Yakalama Terapisi (BNCT) kullanılmaktadır. Bu uygulamada nükleer reaksiyon temelinde iki bileşenli bir sistemle çalışılarak tümör hücrelerinin DNA'sına doğrudan zarar verip hücrelerin yeniden üremesine engel olunmaktadır. Ayrıca bor elementi, kemoterapi sonrası radyoaktif madde etkisini azaltmak için kullanımıyla insan ve diğer canlılar için büyük önem taşımakta ve çevre dostu sayılabilecek bir element olarak değerlendirilmektedir [101].

Bor mineralleri endüstride ham, rafine veya bor kimyasalları olarak kullanılabilir ancak safsızlıkları giderilmiş olan kaliteli bor cevheri kullanımı daha çok tercih edilmektedir.

Cevher hazırlama yöntemleri genel olarak kırma, öğütme, eleme ve sınıflandırma işlemlerinden oluşmaktadır. Elde edilen son ürün olan zenginleştirilmiş üleksit, kalemonit, boraks veya borik asit üretiminde operasyon ölçeğine ve cevher türüne bağlı olarak farklı zenginleştirme teknikleri uygulanmaktadır.

Dünyada yıllık bor tüketimi; %41 fiberglas, izolasyon ve tekstil sanayinde, %13 seramik sanayi ve bileşiklerinde, %12 deterjan ve temizlik ürünleri sanayinde, %8 metalurji sanayinde, %7 tarımda ve %19 diğer alanlarda olmaktadır [105].

2.5.3. Borun Vücuttaki Etkileri

1923 yılında bor tüm damarlı bitkiler için ana bileşenlerden biri olarak kabul edilmiştir. Yapılan çalışmalar ışığında, insanlar ve hayvanlar için borun bir ihtiyaç olduğu kanıtlanmıştır. Borun çeşitli metabolik faaliyetler üzerine önemli etkileri vardır. Kemik metabolizmasında bor ile kalsiyum, vitamin D ve magnezyum arası etkileşimler önemlidir. Kemiklerde biriken bor konsantrasyonu bor tüketim miktarına bağlıdır. Bor, postmonopozal kadınlarda steroid hormonu konsantrasyonunu arttırmakta ve antioksidan özelliğe sahip olmaktadır [107].

Bor bileşimi vücuttaki doku ve organlara göre farklılık göstermekte ve bu organlardaki bazı fonksiyonlar bor etkisiyle yürütülmektedir. Vücuttaki en yüksek konsantrasyonda bor kemik, saç ve tırnaklarda bulunur. Bor bileşimi, eklem iltihabı olan bölgelerde ve sağlıklı kemiklerde farklılık göstermektedir. Eklem iltihabı olan bölgelerde bor 3ppm iken bu miktar sağlıklı kemiklerde 56ppm'dir. Ayrıca bor kemiklerde yüksek bileşimde birikirken yumuşak dokularda bu birikim çok azdır [108].

Bor bileşikleri insan vücuduna solunum, temas veya sindirim yolu ile alınabilmektedir. Bor, solunum yoluyla borun çıkarıldığı ve işlendiği bölgelerden alınabilmektedir. Sindirim yoluyla borca zengin topraklarda yetişen bitkiler aracılığıyla, borca zengin sulara yaşayan balıkların tüketilmesi ile veya borlu tarım ilaçları sebebiyle alınabilmektedir. Temas yoluyla alımı ise ilaçlar, kozmetik ve temizlik ürünleri aracılığıyla olmaktadır [109].

Yapılan çalışmalarda, bor ile sürekli temas halinde, deride borik asit nedeniyle hasarların olduğu görülmüş olup kadınlarda adet yokluğu veya düzensizliğine, epilepsi ve ürik asit yüksekliği gibi vücuttaki düzensizliklere borik asitin yol açtığı kanıtlanmıştır [110].

Son yıllarda sağlık alanında borun önemi anlaşılmış olup vücuttaki kalsiyum, magnezium ve fosfor absorpsiyonunu dengeleyici rolü nedeniyle kemik ve eklem

sağlığı çalışmalarında ve ayrıca beyin fonksiyonları ile ilgili uygulamalarda kullanılmaktadır [101].

Bor sadece haddinden fazla tüketildiği durumlarda toksik etki yapmaktadır. Bor yoksunluğu hayvanlarda büyümenin yavaşlamasına ve anormal olarak kemik gelişiminin düşmesine neden olmaktadır. Buna ek olarak yoksunluğu insanlar ve hayvanlarda idrardaki kalsiyumu arttırmaktadır [108].

2.6. Nanopartiküller

Son yıllarda, ilgili dokuya ilaç salımını lokalize veya hedeflendirilmiş olarak (proteinler, peptidler veya genler gibi makromoleküller yerine) yapabilmek amacıyla kullanılan nanoteknolojik uygulamaları geliştirmek için birçok çalışma yapılmaktadır [111].

Nanoteknoloji gelişmekte ve bununla birlikte nanoyapıların önemi ve ilaç salım sistemlerinde kullanımları artmaktadır [112]. Nanoteknoloji, nanopartiküller, misel sistemler ve nanokapsüller gibi nanokompozit biyouyumlu terapötik ajanların formüle edilmesine odaklanmıştır. Mikronaltı büyüklükte olan bu polimerik sistemler ilaç salımında çok fazla avantaja sahiptir. Bu sistemler genellikle; ilaç salımında doku ve hücrelere hedeflendirme, oral biyoyararlanımı geliştirme, hedef dokuya sürdürülebilir ilaç/gen etkisi sağlama, intravasküler salımda çözünebilir ilaçlarla çalışma ve enzimatik bozunmaya karşı terapötik ajanların kararlılığını geliştirme uygulamalarında kullanılmaktadır. Nanopartiküller, uzak hedeflere lokalize salım ve minimal invaziv girişim metodu ile veya biyospesifik ligantlara konjuge olarak doğrudan hedef doku ve organa iletim yapabilmektedir [111].

Nanopartiküller, mikronaltı büyüklüğe sahip polimerik kolloidal yapıda partiküllerdir. Terapötik ajanlar onların polimerik matrislerine enkapsüle olabilir, yüzeylerine konjuge olabilir veya yüzeylerine adsorplanabilirler [111]. Son yıllarda yapılan araştırmalarda nanopartiküller taşıyıcı olarak kullanımlarının yanı sıra görüntüleme yapmak, tanı veya hedefleme yapmak için de kullanılmaktadır [113]. Nanopartiküller çok çeşitli yapay ve doğal materyallerden, lipitlerden, polimerlerden veya metallerden üretilebilmektedir [114].

Salım uygulamalarında, kullanılan ilaç molekülleri nanopartikülün içinde çözülerek üretilmiş, yüzeye tutturulmuş veya kovalent olarak bağlanmış olmalıdır. Partiküllerin nano boyutları diğer taşıyıcı sistemlere göre avantajlar sağlamakta çünkü fiziksel ve kimyasal yapının boyuta bağlı olarak değiştiği bilinmektedir [115, 116].

Mikronaltı özellikteki nanopartiküllerin mikropartiküllere göre birçok önemli avantajı vardır. Öncelikle mikro boyuttaki partiküllere kıyasla hücre içine alım oranları çok daha yüksektir. Yapılan *in vivo* çalışmalarda görülmüştür ki nanopartiküller, epitel duvarda lokalize olmakla kalmayıp submukozal tabakalar boyunca penetre olabilmektedir. Diğer bir bulgu ise nanopartiküllerin sıkı birleşim noktalarını hiperozmotik manitol ile açarak kan-beyin bariyerini geçebildiğini ispatlamaktadır. Bu özellikleri onları, beyin tümörleri gibi tedavisi çok zor olan hastalıklar üzerinde etkin biçimde kullanılabilir kılmaktadır. Bazı hücre hatlarında özelliklerinden dolayı sadece mikronaltı büyüklükteki partiküller hücre içine alınabilmektedir [111].

2.6.1. Nanopartikül Üretimi

Nanopartikül üretiminde konvensiyonel üretim teknikleri ve emülsifikasyon temelli üretim teknikleri kullanılmaktadır.

Konvensiyonel teknik olarak nanoçöktürme yöntemi uygulanmaktadır. Bir yer değiştirme tekniği olarak da bilinen bu yöntem hidrofobik ilaç enkapsülasyonu için kullanılmasının yanı sıra hidrofilik ilaçlara da uyarlanabilir. Lipofilik ilaç-polimer karışımından oluşan organik çözücünün damla damla su içerisine ilave edilirken aynı zamanda karıştırılması ile uygulanır. Su içinde difüze olan organik çözücü sayesinde ilaçlı nanopartiküller oluşturulmaktadır [117]. Son adımda ise basınç azaltılıp çözücü uzaklaştırılarak diğer yöntemlere oranla çok küçük çapa sahip olan nanopartiküller elde edilmektedir [118]. Bu teknik, çok çeşitli polimer, peptit ve amfilik siklodekstrinler için kullanılabilir. Lipofilik ilaçlar için bu teknikle yüksek yüklenebilme sağlandığı görülmüştür [117].

Emülsifikasyon temelli üretim teknikleri genel anlamda iki basamaktan oluşmaktadır. İlk adımda, organik faz içeren taşıyıcı materyal ve ilaçlar sulu faz içerisine hızla karıştırılmakta veya emülsiyon damlacıkları elde edebilmek için sonikasyona maruz bırakılmaktadır. Emülsiyon sisteminin mikro veya nano oluşuna bağlı olarak partikül boyutları ve yüklenen ilaç özellikleri farklılık gösterir. Çekirdek-kabuk özellikli vesiküler yapılar hazırlamada ikili emülsiyonlar kullanılır. İkinci adımda ise, çözücü buharlaştırma, difüzyon veya tuzla çöktürülerek ortadan kaldırılır ve nanopartiküller elde edilmiş olur.

Bu yöntemlerde toksik çözücülerle çalışırken dezavantajlar oluşur ve ayrıca homojenizatör, karıştırıcı ve ultrason probu gibi yüksek enerji aparatlarına gereksinim vardır [117].

Emülsiyon Hazırlama/Çözücü Buharlaştırma Yöntemi

Nanopartikül üretiminde kolaylıkla üretim prosesini hazırlama ve istenen şekilde partikül boyutu ayarlama avantajı gibi nedenlerle en sık kullanılan yöntem emülsiyon hazırlama/çözücü buharlaştırma tekniğidir [119]. Genellikle lipofilik ilaçların enkapsülasyonu için kullanılır [120]. Emülsiyon oluşturulur ve ardından organik çözücü mutlaka uzaklaştırılmalıdır çünkü toksik özelliktedir. Bu nedenle bu uzaklaştırma işlemi oldukça önemlidir [121]. Bu yöntemde bir organik ve bir sulu faz hazırlanarak ayrı ayrı karıştırılır. Belirli karışma süresinin sonunda organik faz sıvı faz içine boşaltılır ve elde edilen son karışım homojenizasyon işlemine tabii tutulur. Son olarak bir gece boyunca buharlaştırılan çözeltiye santrüfjleme yapılarak nanopartiküller elde edilir [15]. Partikül boyutu, homojenizasyon ve sonikasyon hızına ve süresine bağlıdır. Ayrıca hacimce organik-sulu faz oranları, polimerin türü ve emülsiyon ajanı da partikül boyutuna etki etmektedir [120]. Sıcaklık ve basınç gibi buharlaşma parametreleri partikül kalitesini değiştirebilmektedir [121]. Yüksek enkapsülasyon verimi elde etmek için uygulanan yöntemde fazların eklenme sırası yağ-su, su-yağ, yağ-yağ-su veya su-yağ-su şeklinde değiştirilerek modifikasyonlar yapılabilmektedir [122].

Emülsiyon Hazırlama/Çözücü Difüzyon Yöntemi

Bu teknik, suda kısmen çözünebilen benzil alkol, propilen karbonat vb. çözücüler ile uygulanır. Çözücüyü difüzyona teşvik etmek için yağ-su fazına emülsiyon ajanı içeren belirli miktarda su ile seyreltme yapılır. Bu yöntem, su-polimer doymuş çözeltisinden yağ-su (iç içe) emülsiyon damlacıkları üretilen tipik bir emülsifikasyon tekniğidir. Organik çözücünün damlacıklardan difüzyonu ile nanopartikül formu elde edilmektedir. Son adımda çözücü, kaynama noktası sıcaklığına bağlı olarak buharlaştırma veya filtrasyon ile elimine edilir. Hızlı çözücü ekstraksiyon kinetikleri ve iyi çözücü-su etkileşimi sağlanabilirliği nedenleriyle tekralanabilirliği yüksek ama diğer konvensiyonel tekniklere göre polidispersitesi düşük bir yöntemdir [117].

Emülsiyon Hazırlama/Tuzla Çöktürme Yöntemi

Emülsiyon hazırlama/çözücü buharlaştırma tekniğinin bir türevi olan bu yöntemde suda tamamen çözünebilen bir organik çözücü kullanılmıştır. Polimer içeren organik faz yüksek konsantrasyonda tuz (magnezyum klorür veya kalsiyum klorür) veya şeker içeren bir sulu faz içerisine emülsifiye edilmektedir. Doymuş sulu çözelti, asetonun yani organik çözücünün suyla karışmasına ve çözünmesine engel olur. Kullanılan çökeltme ajanları partikül boyutuna, emülsiyon kararlılığına ve enkapsülasyon verimine etki etmektedir.

Bu yöntemin avantajları arasında, protein enkapsülantlarına olan baskıyı en aza indirmesi, asetondeki çözünürlüğe bağlı olarak daha yüksek ilaç yüklenmesine izin vermesi ve daha az toksik çözücülerle çalışılabilmesi sayılabilir. Dezavantajları ise lipofilik ilaçların kullanımına uygun olmaması, nanopartiküller için ekstra yıkama işlemlerinin olması, yüksek miktarda kullanılan aseton ve tuzların geri dönüşümünün sağlanmasının endişe yaratması olmaktadır [117].

PLGA nanopartiküller, birçok çalışmada emülsiyon hazırlama/çözücü buharlaştırma yöntemi ile üretilmektedir. Bu yöntem ile yapılan çalışmalarda, düşük molekül ağırlıklı lipofilik ve hidrofilik ilaçlar ve yüksek moleküler ağırlığa sahip DNA'ları içeren çeşitli terapötik ajanlar nanopartiküllerin içine enkapsüle edilebilmektedir. PLGA nanopartikül üretiminde küçük boyutlu ve düzenli yapıda olması ve sulu ortamda kolay uzaklaştırılabilirliği sebebiyle, polivinil alkol (PVA) en sık kullanılan emülsiyonlaştırıcıdır.

PLGA nanopartikül üretiminde kullanılan bir diğer benzer yöntem olan ikili emülsiyon/çözücü buharlaştırma tekniğinde partikül büyüklüğü dağılımı genellikle düzensizdir. Büyüklük farklarına göre, hücre içi alım, DNA yüklenmesi veya salımı tamamen değişkenlik göstermektedir. Bu nedenle gen ekspresyonunda küçük partikül boyutu olması ve düzenlilik çok büyük önem taşımaktadır [111].

2.6.2. İlaç Salım Sistemlerinde Kinetik Modeller

Salım sisteminin tasarımı ile ilaç salımı ve salım süresi gibi parametreler kontrol edilebilmektedir. İlaç salım kinetiği ise yüklenen ilaç veya yüklendiği biyomateryalin özellikleri ve taşıyıcı materyalin ilaca bağlanma yolu ile ayarlanabilir. Kontrollü ilaç salım sistemlerinde kullanılan birçok kinetik model bulunmaktadır [123, 124].

Sıfırıncı derece salım kinetik modeli

Eşitlik 2.1.'de gösterilen sıfırıncı derece kinetik model için ilaç salım hızı ilaç derişiminden bağımsızdır. Bu eşitlikte salınan ilaç miktarı Q , ilacın başlangıç miktarı Q_0 , salım sabiti K_0 ve salım süresi t ile ifade edilmiştir.

$$Q = Q_0 + K_0 t \quad (2.1)$$

Birinci derece salım kinetik modeli

Doğrusal olarak Eşitlik 2.2 ile gösterilen birinci derece salım kinetik modelinde başlangıç ilaç derişimi Q_0 ve t anındaki ilaç derişimi Q_t ile ve salım sabiti K_1 ile ifade edilmiştir.

$$\ln(Q_0/(Q_0 - Q_t)) = K_1 t \quad (2.2)$$

Higuchi salım kinetik modeli

Higuchi tarafından 1961'de tanımlanan bu model, sistemde başlangıçta bulunan ilaç derişiminin ilaç çözünürlüğünden büyük olduğu, tek boyutlu difüzyon olduğu ve ilaç moleküllerinin taşıyıcı sistemden çok daha küçük olduğu varsayımlarını içermektedir. Eşitlik 2.3'te verilen K_H Higuchi salım kinetiği sabitini simgelemektedir.

$$Q = K_H \sqrt{t} \quad (2.3)$$

Hixson-Crowell salım kinetik modeli

Eşitlik 2.4'te kinetik modeli verilen Hixson-Crowell denkleminde salım kinetiği sabiti K_{HC} ile simgelenmiştir. Taşıyıcı sistemin yüzeyinde değişimlerin olduğu durumları tanımlamak için kullanılabilir.

$$Q_0^{1/3} - Q_t^{1/3} = -K_{HC} t \quad (2.4)$$

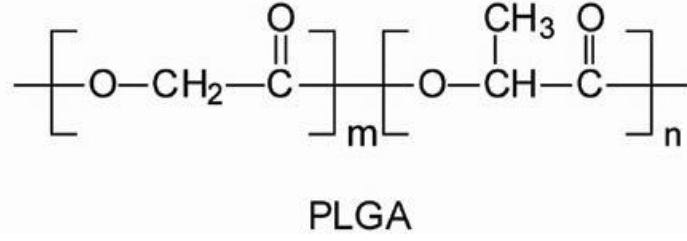
2.6.3. Nanopartikül Üretiminde Kullanılan Polimerler

Nanopartikül üretiminde proteinler ve polisakkaritler gibi doğal polimerler veya sentetik polimerler kullanılmaktadır [125]. Çok sayıda sentetik ve doğal polimer kullanılarak biyoyumlu nanopartiküller üretilmektedir.

Sentetik polimerler, haftalar gibi uzun bir süre boyunca enkapsüle edilmiş terapötik ajanların sürdürülebilir salımını sağlayabilme avantajına sahipken doğal polimerler ile kısa süreli salım yapılabilir. Doğal polimerler ile organik çözücü kullanımında sınırlamalar vardır. Sentetik polimerler dayanıklı, kararlı yapıda olmaları, yüksek saflıkta üretilbilmeleri ve modifiye edilebilmeleri gibi sebeplerle ilaç salım sistemlerinde avantajlara sahiptir [126]. Araştırmalarda kullanılan partiküllerin üretiminde genellikle Amerikan Gıda ve İlaç Kurumu (FDA) onaylı, biyobozunur ve biyoyumlu polimerlerin kullanılması tercih edilmektedir [111]. Kullanılan sentetik polimerler; polilaktik-poliglikolik kopolimerleri, poliakrilatlar ve polikaprolaktonlar olmaktadır. Bunlara örnek olarak poli(glikolik asit), poli(hidroksi bütirat), poli(adipik asit), poli(tereftalik asit) verilebilir. Biyobozunurlukları ayarlanabilir özellikteki sentetik polimerlerin sentezi, ana zincirine ester, karbonat, amit ve üre gibi grupların eklenmesiyle gerçekleştirilir [127].

İlaç salım çalışmaları için yapılan araştırmalarda en çok tercih edilen sentetik polimerler; PLA, PGA ve PLGA kopolimeri olmaktadır [128]. Molekül yapısı Şekil 2.5'te verilmiş olan PLGA, FDA onaylı bir polimer olup paklitaksel, salinomisin ve doksorubisin gibi antikanser ilaçların yüklenebildiği ve enkapsüle edilebildiği nanopartiküllerin üretiminde kullanılır. Bileşiminde bulunan PGA ve PLA oranları

ayarlanarak PLGA'nın biyobozunurluk özellikleri, hidrofilik veya hidrofobik oluşu kullanılacağı çalışmaya özgü olarak değiştirilebilir [129].



Şekil 2.5. PLGA kopolimerinin molekül yapısı.

Sentetik polimerler, vücut içinde implantasyon üzerinden hidrolize uğrayabilen, biyolojik olarak uyum sağlayabilen, metabolik süreçte değişebilen özelliktedir. Polimer biyobozunma ürünleri oluşumu çok yavaş bir hızdadır böylece normal hücre fonksiyonlarını etkilemez. Hayvanlar üzerinde yapılan toksisite ve güvenlik testlerine bağlı olarak günümüzde klinikte biyoemilebilir dikişlerde, kemik implantlarında ve gebelik önleyici implantlarda kullanılmaktadırlar. Bunlara ek olarak bu polimerler, suni organlarda greft materyali olarak ve son dönemde doku mühendisliği araştırmalarında destekleyici doku iskelesi hammadde olarak kullanılabilir [111].

Doğal polimerler, ilaç salım sistemlerinde biyouyumlu ve biyobozunur olmaları, yüksek enkapsülasyon verimi elde edilmesine olanak sağlamaları nedeniyle tercih edilir. İlaç salımında kullanılan polimerin yüksek enkapsülasyon verimi sağlaması, biyoyararlanımın yüksek olması ve alıkonma süresi çok önemlidir [130]. Doğal polimerler, protein ya da polisakkarit yapısında oldukları için biyobozunurlukları ve biyouyumlulukları yüksektir. Albumin, jelatin, aljinat, kollojen ve kitosan en sık kullanılanlarıdır [131].

Kitosan, eklem bacaklıların kabuklarından deasetilasyon yoluyla elde edilen bir polimerdir. Suda çözünürlüğü mümkün olmayan kitinden elde edilmektedir. Kitosan nanopartikülleri hazırlamak için iyotropik jelasyon, mikroemülsiyon, emülsifikasyon ve polielektrot kompleks olmak üzere dört yöntem vardır. Kitosan, asetik asit gibi zayıf asitlerde çözünebilen özelliktedir. *In vivo*da birçok ilaç moleküller olarak kitosan nanopartiküllere başarıyla enkapsüle edilebilmektedir [130]. Deasetilasyon derecesi ve molekül ağırlığı, kullanılan kitosanın biyolojik ve fizikokimyasal özelliklerini belirler [132].

3. DENEYSEL ÇALIŞMALAR

Yapılan tez çalışması genel olarak 5 aşamadan oluşmaktadır. İlk aşamada; üretilen doku iskelelerinin yapısına katmak, hücre kültürü ve bakteri kültürü uygulamalarında kullanmak üzere bor katkılı nanohidroksiapatit (BnHAp) ve nanohidroksiapatit (nHAp) üretilmiştir. BnHAp ve nHAp'lerin karakterizasyon çalışmaları yapılmış olup ardından, ikinci aşamada poli (laktik-ko-glikolik) asit (PLGA) nanopartikül üretimine geçilmiştir. Nanopartiküller, boş olarak ve farklı konsantrasyonlarda salinomisin (SAL) yüklenerek üretilmiş olup yapılan çalışmalar ile optimum SAL konsantrasyonunun belirlenmesi amaçlanmıştır. Üretilen nanopartiküller için salinomisin enkapsülasyon verimi hesaplanmış ve partikülden salım çalışmaları yürütülmüştür. Üçüncü aşamada; boş PLGA nanopartikül, salinomisin yüklü PLGA nanopartikül (PLGA-SAL) ve hem PLGA-SAL nanopartikül hem de BnHAp yüklü kitosan doku iskeleleri (kitosan/PLGA-SAL/BnHAp) üretilmiştir. Bu iskelelerden, SAL salım çalışmaları yürütülmüştür. Dördüncü aşamada hücre kültürü çalışmaları yapılmış olup canlı-ölü boyama analizi ile hücre canlılığı ve morfolojisini görüntüleme amacıyla Alexa Fluor/DAPI boyama ve kristal viyole boyama analizleri yapılmıştır. Son aşamada bakteri kültürü çalışmaları yürütülerek salinomisinin antibakteriyel etkileri incelenmiştir. Yüksek lisans tez kapsamında gerçekleştirilen deneysel basamaklar Şekil 3.1'de özetlenmiştir.

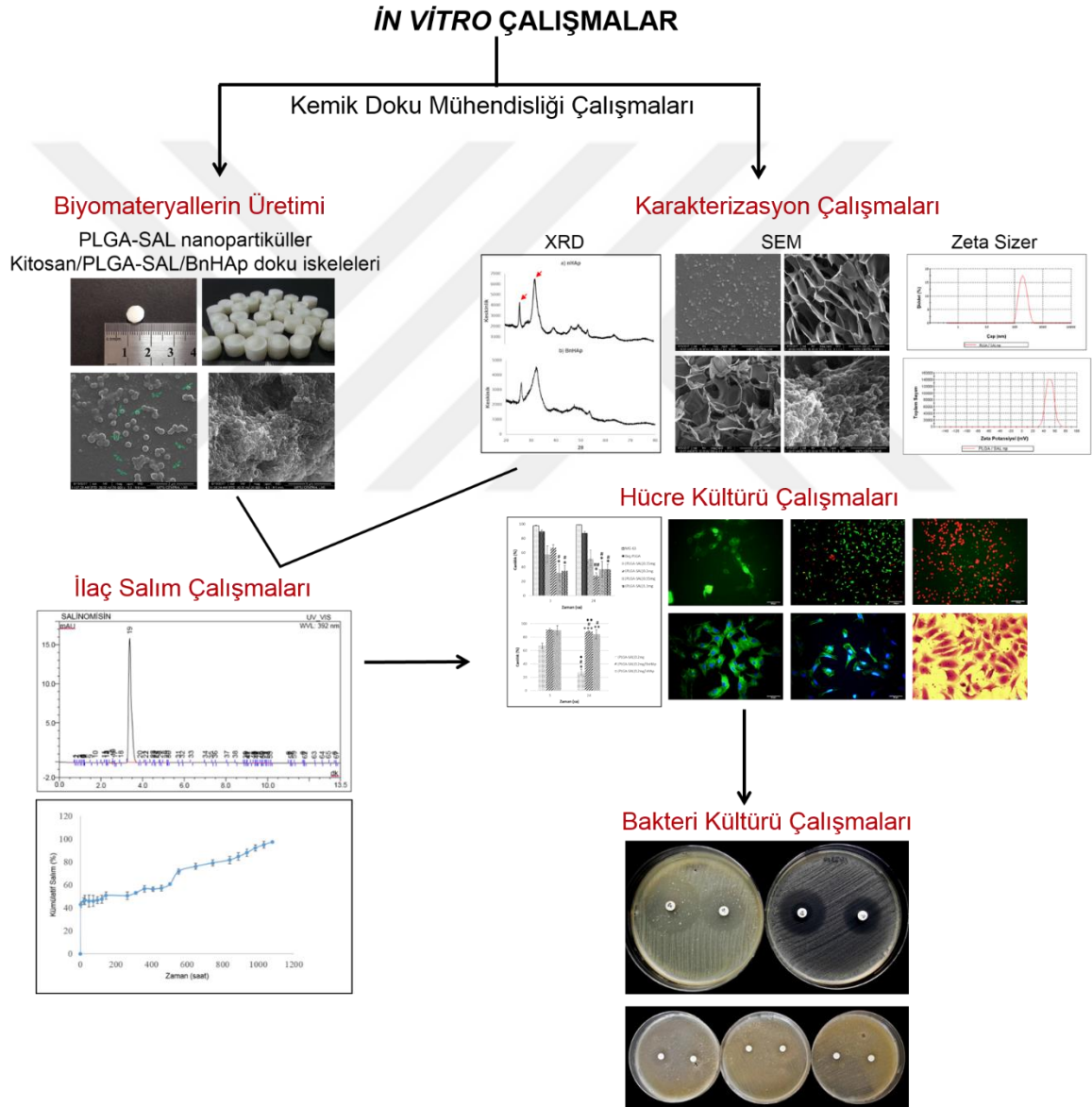
3.1. Kullanılan Malzemeler

Tez kapsamında yapılan çalışmalarda, Sigma-Aldrich (Almanya) firmasından satın alınan toz formda SAL kullanılmıştır. Nanopartiküllerin üretiminde kullanılan PLGA kopolimeri (PLA:PGA; 65:35) ve stabilizatör görevindeki didodesil dimetil amonyum bromür (DMAB) Sigma-Aldrich (Almanya) firmasından temin edilmiştir. PLGA kopolimeri partikül üretimi sırasında Riedel-de Haen (Almanya) firmasından alınan etil asetat ile çözülmüştür. Partikül üretiminde homojenizasyon basamağı, Heidolph marka homojenizatör ile gerçekleştirilmiştir.

Doku iskelesi üretiminde kullanılan ve doğal bir polimer olan kitosan (deasetilasyon derecesi: %75-85) Sigma-Aldrich'ten satın alınarak kullanılmıştır. Doku iskelelerinin yapısına eklenmek üzere kullanılan nHAp ve BnHAp grubumuzca önceden belirlenen reçetelere bağlı kalınarak laboratuvar ortamında tarafımızdan üretilmiştir.

Hücre kültür çalışmaları için, MG-63 insan osteosarkom hücreleri Balıkesir Üniversitesi, Moleküler Biyoloji ve Genetik Bölümü'nden sağlanmıştır. Kültür ortamı için kullanılan Dulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM, high glucose), L-glutamin, fetal sığır serumu (FBS), penisilin-streptomisin ve Dulbecco fosfat tampon çözeltisi

(DPBS, pH: 7.4) Biowest'ten (Fransa) satın alınmıştır. Hücrelerin yüzeyden kaldırılması için kullanılan Tripsin-EDTA Sigma (Almanya) firmasından alınmıştır. MTT analizinde kullanılan izopropanol ve 3-[4,5-dimetiltiazol-2-il]-2,5-difeniltetrazolyum bromür (MTT), hücrelerin fiksasyonunda kullanılan glutaraldehit ve paraformaldehit, hücre döngü analizi için kullanılan Triton X-100 Sigma (Almanya)'dan satın alınmıştır. Hücre morfolojisini görüntüleme teknikleri için kullanılan diamidino-2-fenilindol (DAPI) boyası ve Alexa Fluor boyası Thermo Scientific (ABD) firmasından alınmıştır.



Şekil 3.1. Yüksek Lisans tez çalışması kapsamındaki deneysel basamakların şematik gösterimi.

Bakteri kültür çalışmalarında kullanılan Mueller Hinton Agar ve Mueller Hinton Broth Thermo Scientific (Oxoid Microbiology Products, ABD) firmasından temin edilmiştir. Mikrobiyoloji çalışmalarında kullanılan; metisiline dirençli *Staphylococcus aureus* (MRSA, ATCC 43300) ve metisiline duyarlı *Staphylococcus aureus* (MSSA, ATCC 29213) bakteri suşları Kwick-stick Microbiologics'ten ve *Staphylococcus aureus* (ATCC 25923) Refik Saydam Hıfzısıhha Merkez Enstitüsü, Ankara, Türkiye Kültür Koleksiyonu'ndan alınmıştır. Standart antibiyogram diskler (BD BBL Sensi-Disc® Becton) Dickinson (ABD) firmasından satın alınarak pozitif kontrol olarak kullanılmıştır.

3.2. Bor Katkılı Nanohidroksiapatit ile Nanohidroksiapatitlerin Üretimi ve Karakterizasyonu

Grubumuzca gerçekleştirilen mikrodalga destekli biyomimetik yöntem [133, 134] kullanılarak 10 kat konsantre yapay vücut sıvısı (10xSBF)'ndan nanohidroksiapatit (nHAp) ve bor katkılı nanohidroksiapatit (BnHAp) üretilmiştir. Çökelme öncesinde pH ayarlaması yapabilmek için sodyum hidroksit ilave edilmiştir. BnHAp üretimi için 10xSBF reçetesine borik asit de eklenmiştir. BnHAp, borik asit varlığında SBF iyonlarının mikrodalga enerjisiyle etkileşimleri sonucu üretilmiştir. Çizelge 3.1'de nHAp ve BnHAp üretiminde kullanılan 10xSBF çözeltisinin reçetesi verilmiştir. Reçetede tuzlar 900 mL ultra saf su içerisinde sırasıyla çözülmüştür. Ardından 100 mL ultra saf su ilavesi ile çözelti hacmi 1 L'ye tamamlanmıştır. Balon jode hazırlanan ve +4°C'de muhafaza edilebilen bu çözelti, çöktürme öncesinde oda sıcaklığına getirilmiştir.

Çizelge 3.1. 10xSBF çözelti reçetesi (1L hacim için) [135].

Bileşenler	Miktar (g)	Derişim (mM)
NaCl	58.443	1000.00
KCl	0.373	5.00
CaCl ₂ .2H ₂ O	3.675	25.00
MgCl ₂ .6H ₂ O	1.016	5.00
NaH ₂ PO ₄ .H ₂ O	0.25	3.62
NaHCO ₃	0.084*	10.00

*Her 100 mL SBF içindir.

Ardından, 100mL 10xSBF çözeltisi 0.084 g NaHCO₃ ilavesi ile mikrodalga reaktöründe (Milestone) çöktürülmüştür. Çöktürme işlemi sıcaklık kontrollü olarak 600 W güçte 9 kez art arda tekrarlanan 30 saniyelik sürede gerçekleştirilmiştir. Çöktürme sonrasında istenmeyen fazları uzaklaştırmak için elde edilen çökelti bir gece bekletilmiş ve süpernatanı atılarak 2 kere etanol 2 kere de saf su ile santrifüjleme yapılmıştır. Santrifüj işlemleri, 13,000 rpm'de 5 dk süreyle uygulanmıştır. Son olarak ağzı Parafilmle kapatılan Eppendorf tüplere alınan örnekler 37°C sıcaklıkta çalışan inkübatör içerisinde kurutulmuştur.

NanoHAp ve BnHAp'ın katı faz özelliklerini (kristalin, amorf yapısını) incelemek ve karşılaştırmak amacıyla XRD (PAN analytical X'Pert Pro MPD, 45 kv-40 mA Cu source) cihazı ile analiz yapılmıştır. Tüm örnekler için; 20-80° (2θ) arasında, 0.026°'lik adımlar ve adım başına 99.45 s süre olacak şekilde tarama yapılarak analiz sonuçlarına ulaşılmıştır.

3.3. Boş ve Salinomisin Yüklü PLGA Nanopartiküllerin Üretimi

Boş ve salinomisin yüklü PLGA nanopartiküller, emülsiyon hazırlama-çözücü buharlaştırma tekniği ile üretilmiştir [119]. Bu amaçla ilk olarak organik faz ve sulu faz hazırlanmış olup aşağıda ayrıntılı anlatılan yöntem uygulanarak partiküller elde edilmiştir.

PLGA'nın 2.5 mL etil asetat içerisinde çözülmesi ile organik faz (%2 w/v) elde edilmiştir. Salinomisin, farklı oranlarda (%1, %2,5 w/v) organik faz içerisine 2 farklı yöntemle eklenmiştir. Bunlardan ilki, toz salinomisinin doğrudan organik faza eklenerek çözülmesidir. İkincisi ise, salinomisinin az miktar metanol ile çözülüp daha sonra organik faza karıştırılmasıdır. Her iki şekilde de aynı özellikte nanopartiküller elde edilebilmiştir. Sulu faz, DMAB konsantrasyonu %1 (w/v) olacak şekilde 5 mL distile su ile hazırlanmıştır. Belirlenen süre boyunca fazlar magnetik karıştırıcıda ayrı ayrı karıştırılmış ve ardından organik faz sulu faz içerisine ilave edilerek homojenizasyon işlemine geçilmiştir. Yüksek hızlı homojenizatör ile 15,000 rpm'de 7 dk süreyle homojenize edilen karışıma önceden 40°C'a getirilmiş olan saf su eklenip etil asetatın (organik fazın) buharlaşarak uzaklaşması için bir gece boyunca magnetik karıştırıcıda tutulmuştur. Ertesi gün 13,000 rpm'de santrifüjlenen (Heraeus, Almanya) partiküller -20°C'de 6 sa dondurulup 48 sa süre ile -70°C'de dondurarak-kurutma cihazında (Christ, Almanya) kurutulmuştur. Elde edilen nanopartiküller, oda sıcaklığında ve desikatör içerisinde muhafaza edilmiştir.

3.4. Kitosan Doku İskelesi Üretimi

Kitosan iskeleler çözücü buharlaştırma yöntemi kullanılarak hazırlanmıştır [136]. Sigma-Aldrich firmasından satın alınan toz kitosan (deasetilasyon derecesi: %75-85) asetik asit içerisinde çözülerek %2'lik kitosan çözeltisi hazırlanmıştır. Hazırlanan kitosan çözeltisi 96 gözlü hücre kültür kaplarına her gözde 400 µL olacak şekilde konularak -20°C'de 1 gün dondurulmuştur. Ardından -70°C'ta çalışan dondurarak-kurutma cihazında 4 gün süreyle kurutulmuştur. Bu sürenin sonunda kurutucudan alınan iskeleler %96'lık etanol ile vakumlu etüv içerisinde stabilizasyon işlemi için çöktürülmüş ve 24 sa etanol içerisinde +4°C'ta bekletilmiştir. Ardından, stabilize edilmiş iskeleler filtre kağıdı üzerinden süzülerek tekrar dondurarak-kurutma cihazında 1 gün boyunca kurutulmuştur. Elde edilen kitosan doku iskeleleri Şekil 3.2.'de görüldüğü gibi 6 mm çapında ve 1 mm kalınlığında kesilerek desikatörde muhafaza edilmiştir.



Şekil 3.2. Üretim sonrası 6 mm çapında kesilmiş olan kitosan doku iskelesi.

3.4.1. Kitosan Doku İskelelerine Nanopartiküllerin Yüklenmesi

Kitosan/PLGA-SAL/BnHAp doku iskeleleri 2 farklı yöntem kullanılarak üretilmiştir.

İlk yöntemde partiküller, doku iskelesi üretimi sırasında kitosan çözeltisine katılmıştır. Böylece aynı anda hem iskele üretimi hem de partikül yükleme işlemi gerçekleştirilmiştir. Altı mm çapta hazırlanacak olan doku iskelelerinin her birinde 4 mg PLGA-SAL nanopartikül olması planlanmıştır. İskelelere yüklenecek olan BnHAp miktarı 1 mL çözeltide 10 mg olacak şekilde belirlenmiştir. Önceden hazırlanmış olan %2'lik kitosan çözeltisinden 1.2 mL alınarak beher içerisinde PLGA-SAL partiküllerle karıştırıcı yardımıyla karıştırılmıştır. Homojen bir karışım elde edilince toz BnHAp de ilave edilerek karıştırılmaya devam edilmiştir. Son karışım 96 gözlü kültür kabına 3 gözü dolacak şekilde dökülmüş ve ardından -20°C'ye koyulmuştur. Burada

dondurulan iskeleler 1 gün sonra alınıp dondurarak-kurutma cihazında 4 gün kurutulmuştur. Son olarak iskelelere yukarda açıklanan stabilizasyon basamağı uygulanmıştır. Hazırlanan iskeleler 6mmx1mm olacak şekilde kesilerek kullanıma hazırlanmıştır. Böylece kitosan/PLGA-SAL/BnHAp doku iskeleleri elde edilmiştir.

İkinci yöntemde ise partiküller, önceden hazırlanmış kitosan doku iskelelerine emdirme tekniği ile yüklenmiştir. Bu yöntemde de, her bir iskelede 4 mg PLGA-SAL partikül olması hedeflenmiştir. Tartılarak hazırlanan partiküller 100 µL saf su ile vortekslenip ardından mikropipet yardımıyla iskelenin her iki yüzüne de homojen şekilde emdirilmiştir.

3.5. Nanopartiküllerin ve Doku İskelelerinin Karakterizasyonu

3.5.1. Zetasizer ile Partikül Boyutunun Belirlenmesi

PLGA (65:35) nanopartiküller ve salinomisin yüklü PLGA-SAL nanopartiküllerin boyut analizi ve dağılımlarının belirlenmesi işlemi Zetasizer Nano, ZSP, Malvern cihazı ile yapılmıştır. Analizde kullanılacak örnekler, analizden bir gün önce üretimine başlanan nanopartiküllerin sulu çözeltileri, etil asetat uçurulduktan sonra santrifüjlenmeden doğrudan seyreltilerek elde edilmiştir. Saf su ile 1/100 oranında seyreltilen nanopartikül çözeltilere 2 kere 10 s süreyle problu sonikatör uygulanmıştır. Sulu örnekler analiz cihazına 1 mL hacimde yüklenerek ölçüm yapılmıştır.

3.5.2. Taramalı Elektron Mikroskop (SEM) Analizi

SEM analizi ile boş PLGA nanopartiküllerin, salinomisinli PLGA nanopartiküller, boş kitosan iskelelerin, bor katkılı nanohidroksiapatit (BnHAp) yüklü kitosan iskelelerin ve salinomisin yüklü PLGA nanopartikül ve BnHAp yüklü kitosan iskelelerin morfolojik özellikleri incelenmiştir.

Nanopartiküller üretimlerinin ardından santrifüjleme öncesi sulu halde iken 1/100 oranında seyreltilmiş olup problu sonikatör ile homojen dağılımı sağlanmıştır. Sulu örnekler, analizin yapılacağı yüzeye damlatılarak kurutulmuş ve ardından vakum altında altın-paladyum ile 1 nm kalınlıkta olacak şekilde kaplanmıştır. Analizlerde taramalı elektron mikroskobu (SEM, Quanta 400F Field Emission SEM) kullanılmıştır. ImageJ (NIH, Bethesda) proGramı kullanılarak SEM fotoğraflarından partiküllerin ortalama gözenek boyutları ve boyut dağılımı belirlenmiştir.

Kitosan doku iskelelerinin analizi için iskelelerden kesitler alınıp altın-paladyum ile kaplanarak SEM ile inceleme yapılmıştır.

3.5.3. Salinomisin Enkapsülasyon Veriminin Belirlenmesi

Salinomisin yüklü PLGA nanopartiküllerin enkapsülasyon veriminin bulunabilmesi için Yüksek Performanslı Sıvı Kromatografi (HPLC) yöntemi kullanılmıştır. HPLC sisteminde, mobil fazlar metanol / (%1.5) sulu asetik asit (85:15) olup akış hızı 1.0 mL/dk olmuştur. Salinomisin için 392 nm dalga boyunda çalışılmış olup 3-3.5 dk aralığındaki alıkonma süresinde çıkan pikin alanı okunarak enkapsüle olmayan SAL konsantrasyonu ve miktarı hesaplanmıştır. SAL, HPLC yöntemi ile analiz edilirken çözücüsü olan metanolün yanı sıra 2,4-Dinitrofenil hidrazin (2,4-DNPh) varlığında çözülmesi gerekmektedir [137, 138]. 2,4-DNPh çözeltisi, metanol içerisinde çözülerek (1 mg/mL) hazırlanmıştır.

Uygulanan yöntemde, SAL içeriği %2.5 (w/v) olan PLGA yüklü nanopartikül üretiminin sentrifüjleme basamağında toplanan süpernatant ve yıkama suları kullanılmıştır. Nanopartiküllerin yıkama suları, 2,4-DNPh çözeltisinde çözülmüştür. Toplanan karışımın hacmi saptanmış olup vortekslenerek 20 µL numune alınmış ve HPLC kolonuna (Dionex Ultimate 3000 - C18) beslenmiştir. Alıkonma süresi aralığında çıkan pik alanı kaydedilmiştir.

Salinomisin enkapsülasyon çözeltisi, çözücüsü olan metanol içerisinde 60 µg/mL konsantrasyonunda olacak şekilde hazırlanmıştır. Ardından her adımda salinomisin miktarı yarıya düşecek şekilde metanol ile 8 defa seyreltme yapılmıştır. Bu çözeltilerin 392 nm dalga boyunda HPLC ile analizlerinde elde edilen piklerin alanları grafiğe geçirilmiştir. Çizilen kalibrasyon grafiğinden (EK-1) enkapsülasyon verimi hesabında kullanılacak olan denklem ($y=7E-05X+0,0005$) elde edilmiştir.

HPLC ölçümü ile elde edilen pik alanı, kalibrasyon denkleminde yerine konularak enkapsüle olan ilaç miktarı (mg) hesaplanmıştır. Son olarak Eşitlik 4.1. kullanılarak, yüklenen çözeltideki SAL miktarı ile enkapsüle olmayan SAL miktarı arasındaki farktan enkapsüle olan SAL miktarı belirlenmiş olup yıkama suyu hacmi ve pik alanı da kullanılarak enkapsülasyon verimi hesaplanmıştır.

$$\text{Enkapsülasyon verimi (\%)} = 100 \times [\text{Enkapsüle olan SAL miktarı (mg)} / \text{Başlangıçtaki SAL miktarı (mg)}] \quad (4.1.)$$

3.6. Salinomisin Salım Çalışmaları

Salım çalışmaları kapsamında hem partikülden hem de doku iskelesinden salinomisin salımı gerçekleştirilmiştir.

PLGA nanopartiküllerden yapılan salım çalışmaları, 4 paralel olacak şekilde 4 mg PLGA-SAL partiküller ile yürütülmüştür. Hazırlanan partiküller 10 mm çapta ve 15 cm uzunluktaki diyaliz selüloz membranların (typical molecular weight cut-off=14,000) içerisine yerleştirilmiştir. Her bir paralel için şişelere %0.3 sodyum azid içeren 10 mL PBS çözeltisi konulmuştur. Son olarak, partikül içeren membranlar tamamen çözelti içinde kalacak şekilde şişelere yerleştirilmiştir. Belirlenen zamanlarda salım ortamlarından numune alınarak salım çalışmaları yürütülmüştür. Salınan SAL miktarını belirlemek için salımın başlatıldığı gün 1., 4. ve 19. saatlerde, salımın 1., 2. ve 3. günü 24 sa aralıklarla ve sonraki günlerde ise salım süresi bitimine kadar 1 gün arayla 900'er µL numune alınmıştır. Alınan her numune için yerine 900 µL taze PBS çözeltisi konmuştur.

Kitosan/PLGA-SAL/BnHAp doku iskelelerinden yapılan salım çalışmaları yapıya katarak ve emdirme tekniği kullanarak hazırlanan doku iskeleleri ile 4'er paralel olacak şekilde gerçekleştirilmiştir. Her bir iskele 10 mL PBS salım ortamına konulmuştur. Salınan SAL miktarını saptamak amacıyla salımın başlatıldığı gün 1., 4. ve 6. saatlerde, salımın 1., 2. ve 3. günü 24 sa aralıklarla ve sonraki günlerde ise salım süresi bitimine kadar 1 gün arayla 900'er µL numune alınmıştır. Alınan her numune için yerine 900 µL taze PBS çözeltisi konmuştur. Yukarıda anlatılan yöntem kullanılarak ölçümler yapılmıştır.

Son olarak; salım sonuçları sıfırıncı derece kinetik model, birinci derece kinetik model, Hixson-Crowell kinetik modeli ve Higuchi kinetik modeline uygulanmış olup regresyon katsayıları belirlenerek salım davranışına uygun model tespit edilmiştir.

3.7. Hücre Kültürü Çalışmaları

Hücre kültürü çalışmaları, MG-63 insan osteosarkom kemik kanser hücreleri ile yapılmıştır. Öncelikle antikanserojen ve antibakteriyel etkiye sahip salinomisin için doz belirleme çalışmaları yapılmıştır. Ardından çeşitli analizler ile salinomisinin MG-63 hücre hattı üzerindeki etkileri incelenmiştir.

3.7.1. Hücre Kültürü Koşulları

Salinomisinin kemik kanser hücresi olan MG-63 hücre hattına olan etkisini inceleyebilmek amacıyla farklı gruplar ile çalışmalar yapılmış olup salinomisin yüklü nanopartiküllere (PLGA-SAL) ek olarak kültür ortamına BnHAp ve nHAp ilave edilmiş olan gruplara da yer verilmiştir.

Çalışmalarda kullanılan gruplar aşağıda verildiği şekildedir:

- Kontrol : MG-63 osteosarkom hücreleri
1. Grup : Salinomisin grupları (SAL_{2.73} µg, SAL_{7.51} µg, SAL_{15.02} µg)
2. Grup : Boş PLGA nanopartikül grupları
3. Grup : PLGA-SAL nanopartikül grupları ((PLGA-SAL)_{0.15} mg, (PLGA-SAL)_{0.20}mg, (PLGA-SAL)_{0.55} mg, (PLGA-SAL)_{1.10} mg)
4. Grup :BnHAp ilaveli PLGA-SAL nanopartikül grubu ((PLGA-SAL)_{0.20} mg/BnHAp)
5. Grup : nHAp ilaveli PLGA-SAL nanopartikül grubu ((PLGA-SAL)_{0.20} mg/nHAp)

Hücre kültür uygulamalarında kullanılan BnHAp ve nHAp havanda kısa süreyle dövülüp ince toz haline getirilerek tartımları gerçekleştirilmiştir. Ardından, UV fırında steril lenerek steril Eppendorf tüpler içerisinde kullanıma hazır hale getirilmişlerdir.

Hücre kültür çalışmaları hücre kültür laboratuvarında bulunan steril laminar akış kabininde (Bioair, Type II, İtalya) gerçekleştirilmiştir. Hücre besi ortamı, %10 (v/v) FBS serum, %2 L-glutamin ve %1 penisilin-streptomisin antibiyotik içeren DMEM (high glucose)'den oluşmaktadır. Hücreler, besi ortamı içeren flasklarda çoğaltılmış olup 37°C'ta %5 CO₂ içeren etüv içerisinde kültür edilmiştir. Hücre kültürü uygulamaları, 24 gözlü (hücre büyüme alanı 1.9 cm²) polistiren hücre kültür kapları (TCPS, Orange Scientific, Belçika) kullanılarak yapılmıştır. Doygunluğa ulaşan hücreler, 3.5 mL %0.25'lik tripsin enzimi kullanılarak flask yüzeyinden kaldırılmıştır. FBS içeren 5 mL DMEM besi ortamı flaska eklenerek elde edilen hücre süspansiyonu falkona alınmış ve 1,000 rpm'de 5 dk süreyle santrifüjlenmiştir. Ardından süpernatant atılmış ve kalan hücreler 10 mL taze besi ortamıyla yeniden süspanse edilerek tripan mavisi ile hemositometrik hücre sayımı yapılmıştır. Her bir gözdeki hücre yoğunluğunun 2.5x10⁴ hücre/cm² olması istenmektedir. Yirmi dört gözlü kültür kaplarında 1 mL FBS'li DMEM besi ortamı üzerine 100 µL hücre süspansiyonu eklenerek hücre ekimi gerçekleştirilmiştir. Hücre ekili kültür kapları 37°C sıcaklıkta, %5 CO₂ ve %95 nem içeren inkübatöre (Heraeus Instruments, Almanya) konarak 24 sa inkübe edilmiştir. Yirmi dört saatlik sürenin sonunda hücrelerin ortamı taze besi ortamı ile değiştirilmiştir. Ardından önceden hazırlanıp steril lenmiş olan nanopartiküller, BnHAp ve nHAp belirli gruplar şeklinde her bir göze koyularak hücrelerle etkileşime sokulmuştur.

3.7.2. Canlı-Ölü Hücre Analizi

Boyama yapılarak canlı ve ölü hücrelerin belirlendiği bu analizde boya olarak kalsein-AM (c-AM) ve etidyum homodimer-1 (Eth-1) (LIVE/DEAD™ Viability/Cytotoxicity Kit, for mammalian cells, L3224) kullanılmıştır.

Kalsein, canlı hücre membranından geçebilme özelliğine sahip olduğu için canlı hücrelerin tespit edilmesine olanak sağlamaktadır. Polianyonik bir moleküldür ve canlı hücreler tarafından kolayca tutulabilir. Kalsein-AM floresan özelliğe sahip değildir ancak hücre sitoplazmasında hücre içi esteraz aktivitesine maruz kalarak enzimatik hidrolize uğrar ve floresan kalseine dönüşür. Bu nedenle canlı hücre sitoplazmaları floresan mikroskopla incelendiğinde yeşil görünür. Etidyum, canlı hücre membranından geçemeyen bu nedenle de ölü hücrelerin belirlenmesinde kullanılan bir boyadır. Hücre ölümü nedeniyle hücre membran bütünlüğü bozulur ve etidyum hücre içine girerek nükleik asitlere bağlanır. Böylece ölü hücreler etidyumla boyanarak floresan mikroskopunda kırmızı renk görünürler.

Kültür edilen MG-63 hücrelerine 24 saatlik kültür süresi sonrasında belirlenen gruplar şeklinde nanopartiküller, BnHAp ve nHAp her bir göze eklenmiştir. Canlı-ölü hücre boyama işlemi, partiküller kültüre eklendikten sonraki 3. saatte ve 24. saatte olmak üzere iki kere yapılmıştır. Kalsein (1:40) ve etidyum (1:16) boyalar boyama yapmadan hemen önce DPBS ve FBS'li DMEM ortam ile hazırlanmıştır. Hücrelerin üzerlerindeki ortam çekilip atılmış ve her göze DPBS ile 2 kere yıkama yapılmıştır. Her bir göze 300 µL boya çözeltisi konarak 30 dk süreyle folyo ile sarılıp karanlıkta bekletilmiştir. Bu süre sonunda, DPBS ile 2 kere yıkanarak mikroskopla incelenmiş ve fotoğrafları alınmıştır.

3.7.3. Hücre Canlılığı ve Morfolojisini Görüntüleme

3.7.3.1. Alexa Fluor/DAPI boyama

Hücrelerin canlılığını ve morfolojilerini görüntülemek amacıyla Alexa Fluor/DAPI boyama yapılmıştır. Analiz, MG-63 osteosarkom hücreleri 2.4×10^4 yoğunlukta olacak şekilde 24 gözlü kültür kaplarına ekilip 24 saatlik kültür sonunda nanopartiküller koyulduktan sonra gerçekleştirilmiştir.

Boyama öncesi 15. dk, 3. sa ve 1. günde hücrelere fiksasyon işlemi uygulanmıştır. Fiksasyon işlemi için önce hücrelerin üzerindeki ortam çekilmiş olup DPBS ile 3 kere yıkama yapılmıştır. Ardından önceden hazırlanmış olan paraformaldehit çözeltisi her bir göze 300 µL koyularak kültür kabı folyoya sarılmış ve 10 dk süreyle +4°C'de karanlık ortamda bekletilmiştir. Bu sürenin sonunda, 3 kere DPBS ile yıkama yapılarak

fiksasyon işlemi tamamlanmıştır. Fikse edilen hücrelerin bulunduğu kültür kapları +4°C'de folyoya sarılı biçimde 1 mL DPBS varlığında muhafaza edilebilmektedir.

Kültürün 15. dk, 3. sa ve 1. gününde fiksasyon işlemi uygulanmış olan hücrelere Alexa Fluor/DAPI boyama işlemi uygulanmıştır. Boyama işlemi öncesinde taze olarak BSA (Albumin from bovine serum) çözeltisi, Triton X çözeltisi (BSA ile), DAPI boya çözeltisi (DPBS ile) ve Alexa Fluor boya çözeltisi (BSA ile) hazırlanmıştır. Boyama işlemi için önce üzerlerindeki DPBS uzaklaştırılmış olup ardından her göze 300 µL %0.2'lik Triton X konarak 10 dk bekletilmiştir. PBS ile 3 kere yıkama yapılarak Alexa Fluor boya çözeltisi ile (her göze 400 µL) 25 dk karanlıkta muamele edilmiştir. Üç kez BSA ile yıkama yapılan kültür kaplarındaki hücreler, DAPI boya çözeltisi ile (her göze 500 µL) 5 dk muamele edilip tekrar 3 kez BSA ile yıkama yapılmıştır. Ardından boyanan hücreler ve nanopartiküller floresan mikroskop ile görüntülenerek sonuçlar alınmıştır.

3.7.3.2. Kristal Viyole Boyama

Hücrelerin canlılığını ve morfolojilerini görüntülemek amacıyla yapılan bir diğer analiz ise kristal viyole boyamadır. Kristal viyole boyama için öncelikle taze olarak aseton-metanol (1:1) çözeltisi, %20'lik metanol çözeltisi (PBS ile) ve bu metanol çözeltisi kullanılarak %0.5 (w/v) kristal viyole çözeltisi hazırlanmıştır.

Boyama işlemi, MG-63 osteosarkom hücreleri 2.4×10^4 yoğunlukta olacak şekilde 24 gözlü kültür kaplarına ekilip 24 saatlik kültür sonunda nanopartiküller koyulduktan sonra gerçekleştirilmiştir. Önce hücrelerin üzerindeki ortam uzaklaştırılmıştır. İki kere DPBS ile yıkama yapıp ardından aseton-metanol çözeltisinden her göze 250 µL konarak +4°C'de 20 dk bekletilmiştir. Ardından bu çözelti uzaklaştırılıp 30 dk +4°C'de her gözde 500 µL olacak şekilde kristal viyole çözeltisi ile muamele edilmiştir. Bu sürenin sonunda çeşme suyu ile yıkama yapılarak mikroskopla fotoğraflama yapılarak analiz gerçekleştirilmiştir.

3.7.4. Hücre Canlılığı Görüntüleme ve Hücre Sayımı Çalışmaları

MG-63 osteosarkom hücreleri 2.4×10^4 yoğunlukta olacak şekilde 24 gözlü kültür kaplarına ekilip 37°C'de 24 sa kültüre edilmiştir. Bu sürenin ardından floresan izosiyanat (FITC) katkılı olarak üretilen PLGA-SAL nanopartiküller kültür ortamına eklenerek hücre canlılığı görüntüleme ve hücre sayımı cihazına (Juli, Nanoentek, Kore) bağlanmıştır. Bu çalışmalar ile kültür ortamına ait video ve fotoğraflar alınarak hücre canlılığındaki değişim görüntülenebilmekte ve hücre sayımı yapılabilmektedir.

3.8. Mikrobiyoloji Çalışmaları

Bakteri kültürü çalışmaları, metisiline dirençli *Staphylococcus aureus* (MRSA, ATCC 43300), metisiline duyarlı *Staphylococcus aureus* (MSSA, ATCC 29213) bakterileri ve kontrol grubu olan *Staphylococcus aureus* (ATCC 25923) bakterileri ile gerçekleştirilmiştir. Salinomisinin Gram pozitif bakteriler üzerindeki antibakteriyel etkisinin incelenmesi hedeflenerek bazı ön deneme uygulamaları yapılmış olup ardından 3 farklı yöntem ile mikrobiyoloji çalışmaları yürütülmüştür.

3.8.1. Bakteri Kültürü Koşulları

Bakteri kültürü çalışmalarında kullanılmak üzere; salinomisin DPBS ile çözülüp seyreltilerek 20 µL çözeltilerde 5, 10, 20, 30 µg olacak şekilde 4 farklı derişimde çözeltiler elde edilmiştir. Ardından bu çözeltiler boş antibiyoGram disklerle 20 µL'lik damlalar halinde yüklenmiş ve bu diskler ile bakteri kültür çalışmaları yapılmıştır. Tüm bakteri kültür çalışmaları Mueller Hinton Agar (MHA) ve Mueller Hinton Broth (MHB) kullanımı ile gerçekleştirilmiştir.

Bakteri kültürü çalışmaları, mikrobiyoloji laboratuvarında uygun sıcaklık koşullarında gerçekleştirilmiştir. Bakteri kültürü çalışmaları, bakteri suşu süspansiyonları fotometrik neflometre ile 0.5 McFarland bulanıklığına eş değer olarak ayarlanarak her bir Petri kabındaki bakteri yoğunluğunun 1×10^8 bakteri/cm² olması hedeflenmiştir. McFarland ayarlamalarında Wickerham kartı kullanılmıştır. Bakteri ekimi, hazırlanan agarlı Petri kapları üzerine suvap kullanılarak soldan sağa ve sağdan sola sık zik zak hareketler ile yapılmış, 90° çevrilerek bu işlem tekrarlanmış ve Petri kabının iç kenarından suvap 2 kere gezdirilerek ekim işlemi tamamlanmıştır.

Salinomisin ile sinerjik etki göstererek antibiyoGram disklerin inhibisyon alanını büyütmesi hedeflenen BnHAp ve nHAp da önceden üretilerek çalışma öncesinde havanda ezilip toz hale getirilmiş ve belirlenen miktarlarda tartılarak kullanıma hazırlanmıştır.

3.8.2. Ön Deneme Çalışmaları

Bakteri kültürü için ön deneme çalışmaları, çift disk sinerji (panç) metodu ve agar dilüsyon metodları uygulanmıştır. MHA, 100°C'de sıvı ve 40°C altında tamamen katı yapıya sahiptir. Bu nedenle Petri kaplarına dökümden hemen önce hazırlanmıştır. Çift disk sinerji metodunda kullanılmak üzere; standart 4mm kalınlığında olacak şekilde her bir Petri kabına 20 mL MHA çözeltilisi dökülerek +4°C'ta buzdolabında soğumaya bırakılmıştır. Agar dilüsyon metodu için ise her bir Petri kabına 16 mL agar çözeltilisi dökülerek aynı işlem yapılmıştır. Her bir Petri kabına steril distile su ile McFarland'ı 0.5

olarak ayarlanan bakteri solüsyonu kullanılarak 1×10^8 bakteri/cm² bakteri yoğunluğunda ekim yapılmıştır.

Salinomisin 0.1 mM derişimde olacak şekilde DPBS ile çözölerek 10, 20 ve 30 µL hacimlerde boş antibiyoGram diskler damla damla yüklenmiştir. Bu ön deneme çalışması ile boş antibiyoGram disklerin kaç µL ilacı hapsedebildiği ve saldığının incelenmesi de hedeflenmiştir. Ön deneme çalışmalarında salinomisin yüklü antibiyoGram disklerin yanı sıra Ampisilin-10 ve Penisilin-C standart antibiyoGram diskleri de kullanılmıştır.

Çift disk sinerji yöntemi için, 6mm çaplı panç ile bakteri ekili Petri kabındaki agar üzerinde delik açılmış ve bu delik 17.5 mg BnHAp ile doldurulmuştur. Ardından salinomisin yüklü diskler tahmini uzaklıklar ile panç deliğinin etrafına yerleştirilmiştir. Ampisilin-10 ve Penisilin-C standart antibiyoGram diskleri de *S.aureus* bakterisi için standart inhibisyon alanları göz önünde bulundurularak panç deliği etrafına bırakılmıştır. Ampisilin-10 standart antibiyoGram diskinin *S.aureus* bakterisi için standart inhibisyon alanı 27-35 mm, Penisilin-C standart antibiyoGram diskinin ise 26-37 mm'dir.

Agar dilüsyon metodu için, bakteri ekimi öncesinde taze olarak 4 mL'lik MHA çözeltisi hazırlanmıştır. Bu çözeltiye 0.07 mg BnHAp eklenerek vortekslenmiş ve homojen bir süspansiyon elde edilmiştir. Ardından 16 mL agar ile önceden hazırlanmış olan Petri kabı üzerine bu süspansiyon eklenerek standart 4 mm kalınlıklı agar elde edilmiştir. Bu teknikte BnHAp ile salinomisinin sinerjik etkisi doğrudan agar içine BnHAp'ın katılmasıyla sağlanmak istenmiştir. Ardından bu BnHAp'lı MHA üzerine bakteri ekimi yapılmıştır. Son olarak agar üzerine salinomisin 10 µL, salinomisin 20 µL, Ampisilin-10 ve Penisilin-C antibiyoGram diskleri inhibisyon alanları baz alınarak belirli aralıklarla yerleştirilip 16 saatlik kültür süresince 37°C'de çalışan inkübatöre koyulmuştur.

Son olarak normal antibiyoGram çalışması için bakteri ekili olan 2 adet Petri kabı üzerindeki boş alanlara salinomisin 10 µL ve salinomisin 20 µL disklerinden yerleştirilerek normal inhibisyon alanlarının belirlenmesi amaçlanmıştır.

3.8.3. Bakteri Kültürü Çalışmaları

Bu çalışmalarda, farklı konsantrasyonlarda salinomisin yüklü antibiyoGram disklerin yanı sıra MRSA, MSSA ve *S. aureus* Gram pozitif bakteri suşlarının ekili olduğu gruplarda Çizelge 3.2.'de görülen 19 farklı antibiyoGram disk kullanılarak inhibisyon alanlarındaki değişimlerin incelemesi yapılmıştır. Kullanılan antibiyotikler; penisilin,

sefalosporin ve aminoglikozit ailelerinden oluşan çok sayıda antibiyotik arasından seçilmiştir.

Çizelge 3.2. Bakteri kültür çalışmalarında kullanılan antibiyotik diskler.

Sembol	Antibiyotik	Sembol	Antibiyotik
AX	Amoksisilin	TCX	Sefotaksim/Tazobaktam
AMC	Amoksisilin/Klavulanik asit	CTT	Sefotetan
AM	Ampisilin	CAZ	Seftazidim
CTX	Sefotaksim	CAZ/BA	Seftazidim/Boronik asit
CTX/BA	Sefotaksim/Boronik asit	CZC	Seftazidim/Klavulanik Asit
CTC	Sefotaksim/ Klavulanik asit	TCA	Seftazidim/Tazobaktam
CTS	Sefotaksim/Sulbaktam	CRO	Seftriakson
CFC	Seftriakson/Klavulanik asit	CX	Kloksasilin
APX	Kloksasilin/Ampisilin	CN	Gentamisin
ME	Metisilin	VA	Vankomisin

Bakteri kültürü çalışmaları, Disk Difüzyon Yöntemi, Çift Disk Sinerji (Panç) Yöntemi ve Agar Dilüsyon Yöntemi olmak üzere 3 farklı teknik kullanılarak yapılmıştır. Bu yöntemlerin öncesinde, bakteri kolonisini tek başına gözlemlemek, kontaminasyon riskini ortadan kaldırmak ve tek koloni eldesi için bir ön çalışma yapılmıştır. *Staphylococcus aureus* (ATCC 25923) suşlarının tek koloni eldesi için fildoplatin ile MHA'lı Petri kabına çoktan aza giderek dört aşamalı biçimde bakteri ekimi yapılmıştır.

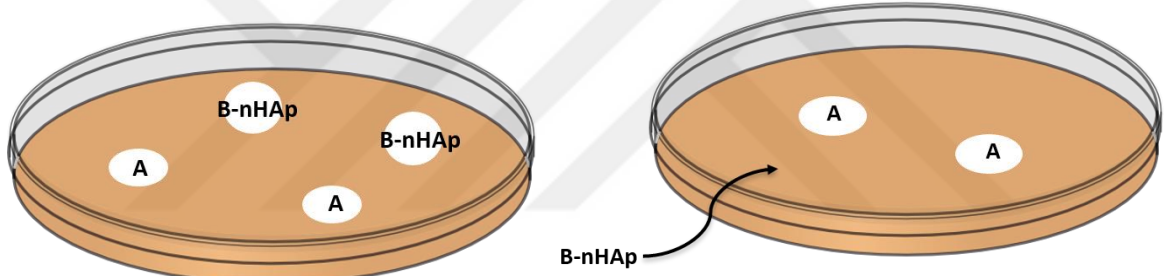
3.8.3.1. Disk Difüzyon Yöntemi ile Mikrobiyoloji Uygulamaları

Antibakteriyel çalışmalarda antibiyotik duyarlılığının saptanmasında en sık kullanılan yöntem Kirby Bauer disk difüzyon testleridir (CLSI). Disk difüzyon testleri MHA üzerinde 3 farklı bakteri suşu ile gerçekleştirilmiştir. Yukarda tanımlanan suşlar, MHA'lı Petri kaplarına ekilmiştir. Salinomisin yüklü (20µL çözeltide 5, 10, 20, 30 µg SAL olacak şekilde) antibiyotik diskler ve seçilen 19 farklı antibiyotik disk, bakteri ekili Petri kaplarına her bir bakteri suşu için bilinen standart inhibisyon alanları göz nünde bulundurularak belirli uzaklıklarda yerleştirilmiştir. Bakteri kültürü çalışması,

Petri kaplarının 16 sa süreyle 37°C'deki inkübatöre koyularak her bir diskin inhibisyon alanı ölçülerek gerçekleştirilmiştir.

3.8.3.2. Çift Disk Sinerji (Panç) Yöntemi ile Mikrobiyoloji Uygulamaları

Salinomisin ile BnHAp ve nHAp'ın sinerjik etkisini gözlemlemek amacıyla Şekil 3.3.'de şematik olarak gösterilen panç metodu kullanılmıştır. İncelenecek olan mikroorganizmaların ekimi, 18-24 saatlik agar plağında tek düşen kolonilerden doğrudan 37°C'de inkübe edilerek hazırlanmıştır. Bakteri süspansiyonunun bulanıklığı 0.5 McFarland değerine eşdeğer olacak şekilde ayarlanmıştır. Ardından 6 mm uçlu steril panç aleti kullanılarak MHA üzerinde her bir antibiyogram disk (A) için bir delik açılıp içine BnHAp ve nHAp yerleştirilmiştir. Son olarak antibiyogram diskler ekili olan bakteri suşu için belirlenmiş standart inhibisyon alanları doğrultusunda panç deliği ile mesafeleri ayarlanarak agar üzerine koyulmuştur. Petri kapları inkübasyon işlemi için 37°C'deki inkübatöre yerleştirilmiştir. On altı saat süren inkübasyonun ardından antibiyogram disklerin oluşturduğu inhibisyon alanları saptanmıştır.



Şekil 3.3. a) Çift Disk Sinerji (Panç) Yöntemi b) Agar dilüsyon yöntemi.

3.8.3.3. Agar Dilüsyon Yöntemi ile Mikrobiyoloji Uygulamaları

Salinomisin ile BnHAp'ın sinerjik etkisini gözlemlemek amacıyla Şekil 3.3.'te şematik olarak gösterilmiş olan agar dilüsyon metodu ile bir antibakteriyel çalışma gerçekleştirilmiştir. Bu yöntemde Petri kabına dökülen standart 4 mm kalınlıklı agarın en üst tabakasındaki 1 mm'lik kısmı, BnHAp agar besiyerine karıştırılarak hazırlanmıştır. Bu amaçla, 0.07 g BnHAp 4 mL sıcak MHA ile karıştırılıp vorteksenerek homojen biçimde dağıtılmış ve Petri kaplarına dökülmüştür. Agarların soğuyup katılaşmasının ardından antibiyogram diskler ekili olan bakteri suşu için belirlenmiş standart inhibisyon alanları doğrultusunda mesafeli olarak agar üzerine yerleştirilmiş ve etüvde 37°C'de inkübasyon başlatılmıştır. Son olarak; 16 saatlik inkübasyon süresi tamamlanan antibiyogram disklerin inhibisyon alanları ölçülmüştür.

4. SONUÇLAR VE TARTIŞMA

Tezin bu bölümünde, tez kapsamında yapılan deneysel çalışmalardan elde edilen sonuçlar ve yorumları sunulmuştur. İlk olarak, yapılan çalışmalarda kullanılan olan nanohidroksiapatit ve bor katkılı nanohidroksiapatitlerin üretim ve karakterizasyon çalışmalarının sonuçlarından bahsedilmiştir. İkinci olarak, osteosarkom kemik kanseri tedavisinde kullanılabilme potansiyeli araştırılacak olan salinomisin yüklü poli (laktik-ko-glikolik) asit (PLGA) nanopartiküllerin üretimi ve karakterizasyonu anlatılmıştır. Ardından, MG-63 osteosarkom kanser hücre hattı ile gerçekleştirilmiş olan *in vitro* hücre kültürü çalışmalarının sonuçlarına yer verilmiştir. Son olarak, metisiline dirençli *Staphylococcus aureus* (MRSA, ATCC 43300) ve metisiline duyarlı *Staphylococcus aureus* (MSSA, ATCC 29213) bakterileri ile yapılan bakteri kültürü çalışmalarının sonuçları sunulmuştur.

4.1. Nanohidroksiapatit ve Bor Katkılı Nanohidroksiapatitlerin Üretimi ve Karakterizasyonu

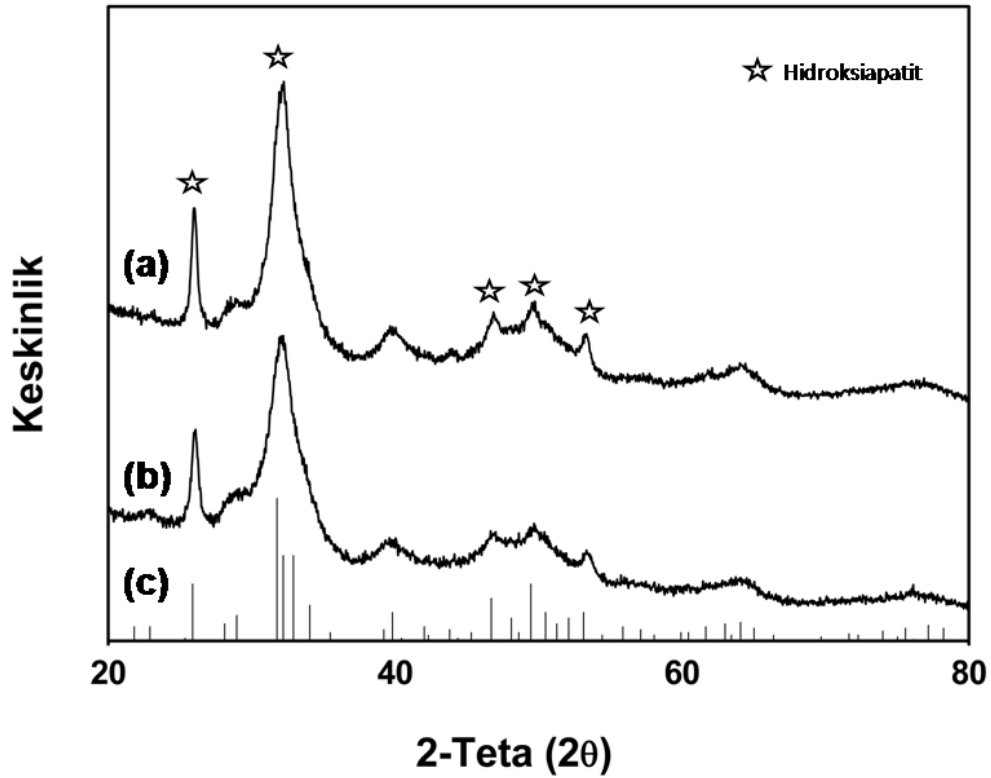
Bor, sahip olduğu etki mekanizması sayesinde hücreler üzerinde osteojenik farklılaşmayı destekleyici özellik taşımaktadır. Kemik metabolizmasında önemli rol oynadığı bilinen ve osteoindüktif etkiye sahip olan bor, osteokondüktif yapıdaki hidroksiapatit yapısına katılarak doku mühendisliği uygulamalarında kullanılmaktadır [139]. Mineral iyon özellikte olan bor, özellikle osteogenez olmak üzere insan sağlığı üzerinde potansiyele sahip terapötik ajanlardandır. Bor; embriyogenez, psikomotor beceriler, immün fonksiyonlar, yara iyileşmesi ve kemik iyileşmesi gibi temel sağlık problemlerinin tedavisinde büyük role sahip olan eser elementlerden biridir. Borun kemik sağlığına olan olumlu etkisi gözlemlendiği halde kemik iyileşmesi üzerindeki mekanizması tam olarak bilinmemektedir [140]. Son yıllarda yapılan çalışmalar sonucu borun sağlık alanındaki önemi fark edilerek kanser tedavilerinde de kullanılmaya başlanmıştır [101]. Sunulan tez kapsamında, daha önce yapılan tedavi uygulamalarından farklı olarak bor katkılı nanohidroksiapatitlerin antikanserojen ilaç varlığında osteosarkom kemik kanser hücreleri üzerine etkileri incelenmiştir.

Nanohidroksiapatit (nHAp) ve bor katkılı nanohidroksiapatit (BnHAp) üretiminde 10xSBF ile biyomimetik çöktürme tekniği kullanılmıştır. 10xSBF yüksek doygunluk derecesine sahip oluşu ile literatürdeki diğer SBF çözeltilerinin aksine HEPES (2-[4-(2-Hidroksietil)-1-piperazin]etansülfonik asit) ve TRİS (Tris (hidroksimetil) aminometan) gibi tamponların kullanılmasını gerektirmemektedir. BnHAp üretimi için SBF iyon dengesini bozmayacak oranda borik asit (10g/L) çözeltiye ilave edilmiş olup yeni

çözeltinin pH değerleri incelenmiştir. Borik asit ilaveli 10xSBF çözeltisinin pH değerleri tekrarlanan çalışmalarda, çöktürme öncesinde NaHCO_3 eklenmesi ile 6.8-7.2 aralığında ölçülmüş olup çöktürme için gerekli pH sağlanmıştır.

Yapılan çöktürme çalışmalarında grubumuzca daha önce yapılan uygulamalar ile nHAp sentezi için belirlenen mikrodalga koşulları kullanılmıştır [133]. Mikrodalga enerjisi, iyonik çözeltiler üzerinde sahip olduğu etki ile çöktürme işleminin etkin biçimde ve kısa sürede yapılmasına olanak sağlamıştır. SBF'nin içerdiği iyonlar, düşük enerjili kararlı termodinamik faza dönüşerek nHAp ve BnHAp yapısını oluşturmuştur. Tüm çalışmalarda, bor katkısı olan ve olmayan nanohidroksiapatit yapıları kıyaslama ve kontrol amacı ile bir arada incelenmiştir.

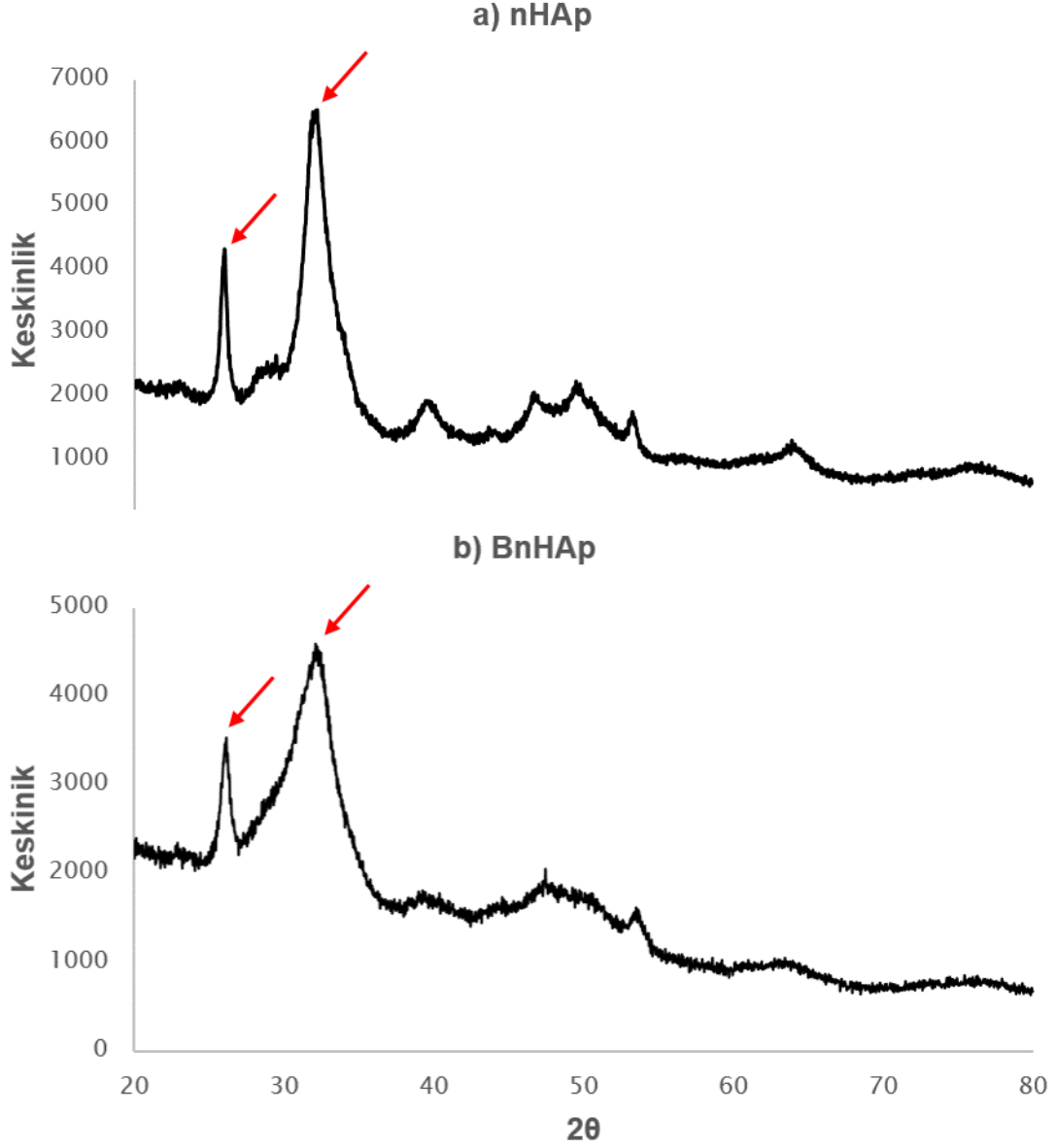
Hidroksiapatit ve bor katkılı hidroksiapatit örneklerine ait standart XRD spektrumları Şekil 4.1'de verilmiştir [135].



Şekil 4.1. Mikrodalga ile sentezlenen hidroksiapatit (a), bor katkılı hidroksiapatit (b) ve Uluslararası Merkez (ICDD) verilerine ait saf hidroksiapatit (c) XRD spektrumları [135].

Tez kapsamında üretilen nHAp ve BnHAp örneklerinin her ikisinde de hidroksiapatite ait karakteristik 26° ve 32° pikleri [141] görülmüştür. Şekil 4.2.'de görülen nHAp ve

BnHAp spektrumları kıyaslandığında, borik asit içeren örneklerde β -trikalsiyum fosfat (β -TCP), dikalsiyum fosfat anhidroz (DCP) ve dikalsiyum fosfat dihidrat (DCDP) gibi farklı fazların varlığı görülmemiştir. Her iki örnekte de sadece tek fazlı hidroksiapatit yapısı tespit edilmiştir.



Şekil 4.2. Mikrodalga ile çöktürülerek sentezlenen nHAp (a) ve BnHAp (b) örneklerinin XRD spektrumları.

Yapılan çalışmalar ile üretilen nHAp ve BnHAp'ın XRD spektrumları incelendiğinde kristal yapıdaki stokiometrik hidroksiapatitin aksine (Şekil 4.1.c) daha az keskinlikte ve daha geniş pikler görülmüştür. Sentezlenen bu amorf yapıdaki nHAp ve BnHAp, doğal kemik yapısına oldukça benzer özelliktedir [133]. Kemik benzeri hidroksiapatit

ve bor katkılı hidroksiapatit kolay ve hızlı biçimde, amorf yapıda ve yüksek saflıkta üretilmiştir. Bor katkısı amorf yapıda herhangi bir değişime neden olmamıştır.

4.2. PLGA Nanopartiküllerin Üretimi ve Karakterizasyonu

Tez kapsamında kemik doku mühendisliği yaklaşımı ile osteosarkom tedavisinde kullanılmak üzere partiküler formda ilaç salım sistemleri geliştirilmiştir. Bu amaçla; antikanserojen ve antibakteriyel bir ilaç olan salinomisin yüklü PLGA nanopartiküller üretilmiştir.

Salinomisin, yan etkilere sebep olmadan seçimli hedeflendirme ile hem *in vivoda* hem de *in vitroda* osteosarkomu engelleyebilmektedir. Yüksek potansiyelde kanser hücresi öldürebilme özelliğine karşın düşük suda çözünürlüğünün klinik uygulamalarda dezavantaj yaratmasının önüne geçmek amacıyla salinomisinin nanopartiküllere yüklenerek kullanılması gündeme gelmiştir [15]. Salinomisin kanserli hücreleri öldürebilmesinin yanı sıra sağlıklı hücreler üzerinde öldürücü etki yaratmamakta ve proliferasyonlarını engellememektedir. Salinomisinin seçimli toksisite özelliği sayesinde bu etki sağlanabilmektedir. Etki mekanizması tam olarak belirlenememiş olsa da salinomisin, uygulandığı bölgede epitel hücrelere farklılaşmayı da desteklemektedir [56, 57].

FDA onaylı bir polimer olan PLGA, biyouyumlu ve biyobozunur olması nedeniyle ilaç, peptid, hormon veya proteinlerin kontrollü salımları için oldukça uygun olup klinik kullanıma elverişlidir. PLGA kopolimeri, yapısında hızlı bozunurluk özelliğindeki hidrofilik poliglikolik asit (PGA) polimeri ile içerdiği metil grupları dolayısıyla yavaş bozunma özelliğine sahip olan hidrofobik polilaktik asit (PLA) polimerini barındırmaktadır [11]. Yapılan tez çalışmasında nanopartiküllerin üretiminde hidrofobik yapıda olan (PLA:PGA = 65:35) PLGA kopolimeri kullanılmıştır.

Nanopartikül üretimi sıkça kullanılan tekniklerden biri olan emülsiyon hazırlama/çözücü buharlaştırma yöntemi ile gerçekleştirilmiştir. Bu yöntem, kolay bir prosese sahip olması, yüksek verim alınabilmesi ve partikül boyutunun ayarlanabilmesi gibi avantajlarının yanı sıra birçok kimyasalla ve polimerle de uygulanabilir özelliktedir [119].

Hazırlanan nanopartiküller boş ve salinomisin içerikli olmak üzere iki gruptan oluşmaktadır. Partiküllerin boyutlarını belirlemek ve morfolojilerini incelemek için Dinamik Işık Saçılım (DLS) analizi ve Taramalı Elektron Mikroskobu (SEM) ile çalışmalar yürütülmüştür. Yapılmış olan bu iki analizin sonuçları birbirine paralel olup düzgün küresel morfolojide ve nanoboyutta partiküllerin elde edildiğini göstermektedir.

4.2.1. Partikül Boyutu Analizi

Partiküllerin boyutu kullanılan polimerin molekül ağırlığı ile doğru orantılı olarak artmaktadır. Artan molekül ağırlığı polimer çözeltisinin viskozitesini arttıracığından emülsiyon oluşum aşamasında daha büyük emülsiyon tanecikleri oluşmasına sebep olmaktadır. Partikül boyutu; ilaç salımına, fiziksel stabiliteye, partiküllerin hücresel alımına ve biyodağılıma doğrudan etki etmektedir [142].

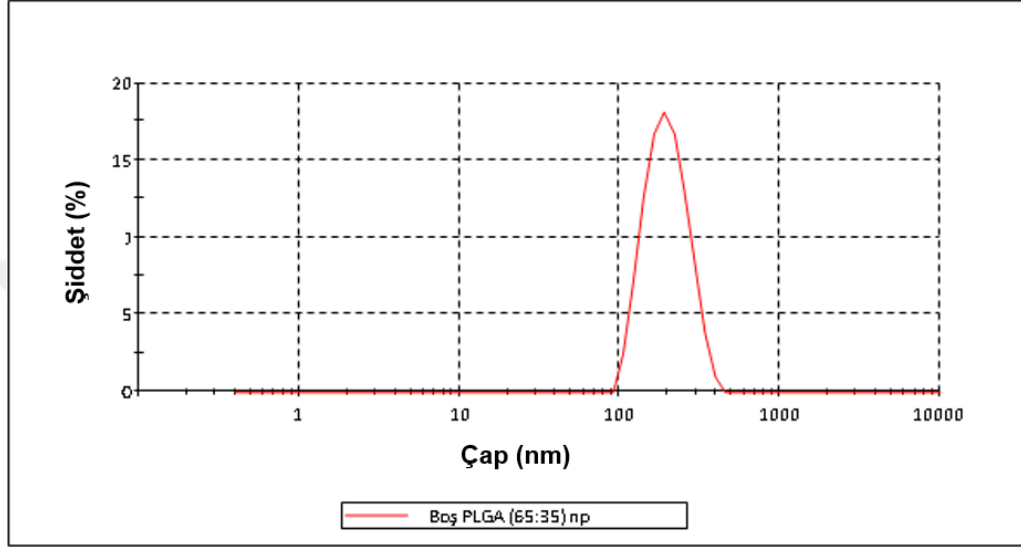
Tez çalışmasında emülsiyon hazırlama/çözücü buharlaştırma yöntemi ile hazırlanan boş PLGA (65:35) nanopartiküllerin ve SAL yüklü nanopartiküllerin (PLGA-SAL) çap ve çap dağılımları ile oda sıcaklığında yapılan zeta potansiyel ölçümlerinden alınan sonuçlar Çizelge 4.1.'de görülmektedir. Salinomisin yüklü ve boş PLGA nanopartikül örnekleri için DLS analizi sonucunda alınan çap dağılım ve zeta potansiyel grafikleri Şekil 4.3. ve Şekil 4.4'te verilmiştir.

4.1. PLGA kopolimerinden üretilen boş nanopartiküllerin ve SAL yüklü nanopartiküllerin boy ve boy dağılım değerleri.

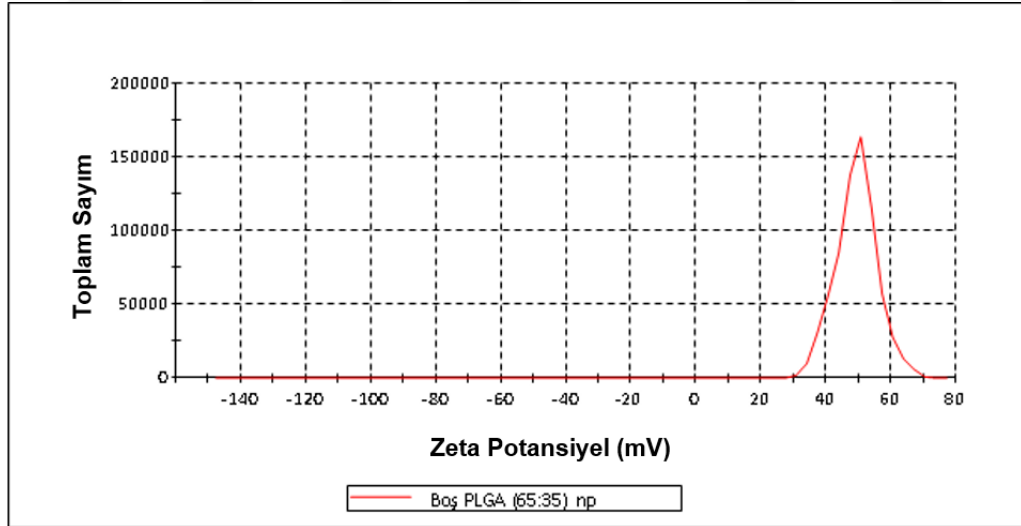
Partikül	Ortalama Çap (nm)	Çoklu Dağılım Endeksi (PDI)	Zeta Potansiyel (mV)
Boş PLGA nanopartikül	185.8 ± 60.67	0.083	49.3 ± 6.42
PLGA-SAL nanopartikül	187.4 ± 63.30	0.105	51.0 ± 7.02

Boş PLGA nanopartiküller ile PLGA-SAL nanopartiküllerin çapları incelendiğinde ilaç yükleme prosesine bağlı olarak ortalama partikül büyüklüğünün 185.8 nm'den 187.4 nm'ye yükseldiği, nanopartiküllerin zeta potansiyel değerlerinin ise 49.3 mV'dan 51.0 mV değerine ulaştığı belirlenmiştir. Hazırlanan her iki gruptaki nano boyutlu partiküller homojen boyut dağılımında üretilmiştir. Boş ve SAL yüklü partiküllerin çapları incelendiğinde ilaç yüklü partiküllerde gözlenen boyut artışı beklenen bir sonuç olmaktadır [143]. Zeta potansiyel değerlerinin 20 mV'tan yüksek olması partiküllerin kararlı yapıda üretildiğini göstermektedir. Partikül büyüklüğü dağılımını belirten polidispersite indeksi (PDI) değeri üretilen iki partikül formülasyon grubunda 0.083 ve 0.105 olmak üzere yakın değerler vermiştir. Nanopartiküllerin PDI ve ortalama çap

değerlerinden yola çıkarak ilaç yükleme prosesinin nanopartiküllerin çap ve çap dağılımında büyük bir değişiklik yaratmadığı ve herhangi bir olumsuz etkiye yol açmadığı saptanmıştır [144]. Ayrıca; yapılacak hücre kültürü uygulamalarında kullanılmak üzere üretilen partiküllerin nano boyuta sahip olması hücresel alım ve ilaç salımı açısından önem arz etmektedir.

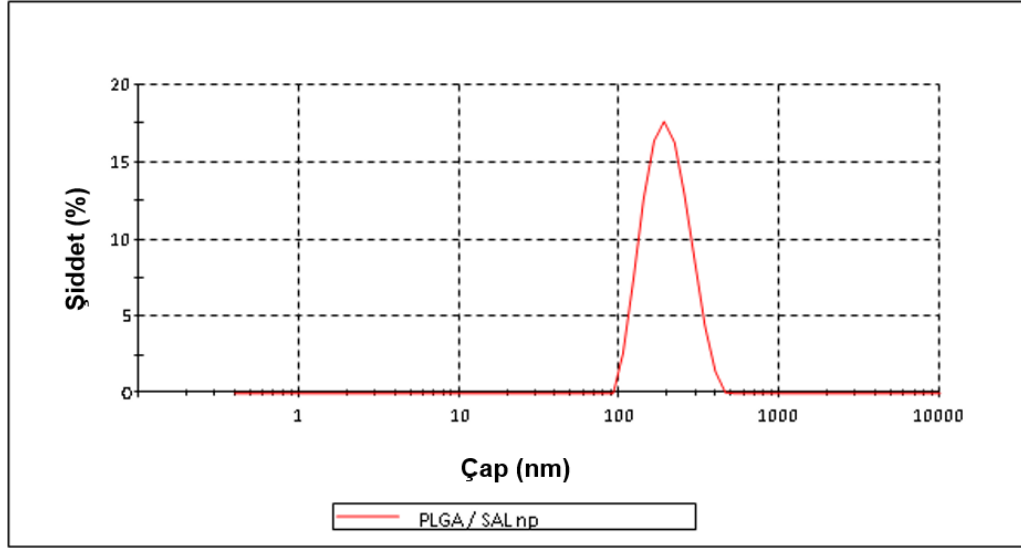


a)

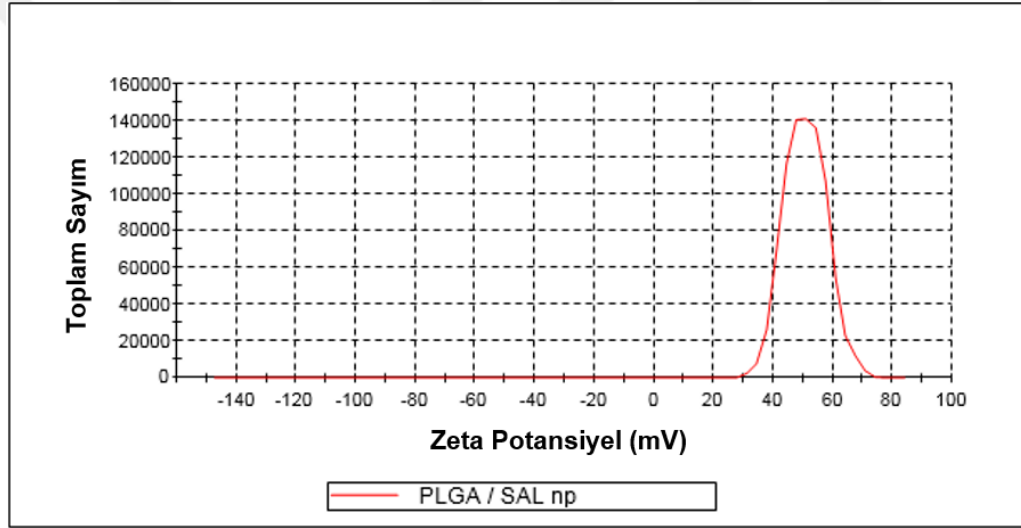


b)

Şekil 4.3.Boş PLGA nanopartiküllerin DLS analizi sonucu alınan a) çap dağılım ve b) Zeta Potansiyel dağılım grafiği.



a)



b)

Şekil 4.4. PLGA-SAL nanopartiküllerin DLS analizi sonucu alınan a) çap dağılım ve b) Zeta Potansiyel dağılım grafiği.

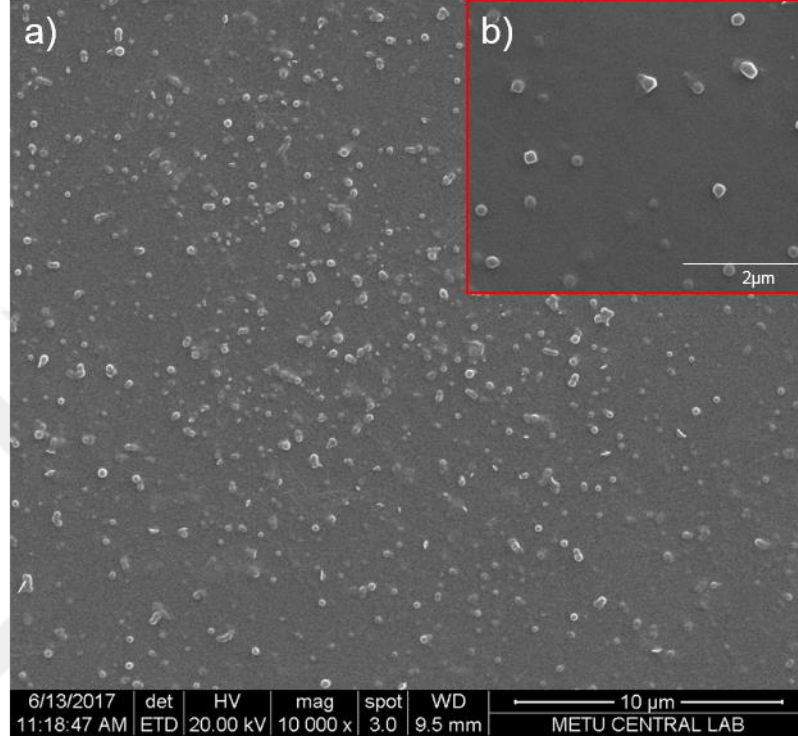
4.2.2. Taramalı Elektron Mikroskobu (SEM) Analizi

Üretilen boş PLGA nanopartiküller ile salinomisin yüklü PLGA nanopartiküller Taramalı Elektron Mikroskobu (SEM) ile görüntülenmiştir. Partiküllerin yüzey morfolojilerini ve büyüklüklerini gösteren analiz sonuçları fotoğraflar ile sunulmuştur. Hazırlanan partiküllerin nano mertebede ve düzgün küresel morfolojide oldukları belirlenmiştir.

Boş PLGA Nanopartiküller

SEM ile yapılan görüntülemelerde küresel olduğu görülen boş PLGA nanopartiküllerin çapları 103.1 - 173.3 nm arasında değişirken, DLS analizinde ortalama 185.8 ± 60.67

nm ölçümleri alınmıştır. Alınan veriler incelendiğinde iki analiz sonucu alınan çap değerleri beklendiği şekilde paralellik göstermiştir. Şekil 4.5.'te üretilen boş PLGA nanopartiküllerin 10,000 ve 50,000 büyütme ile çekilmiş SEM görüntüleri bulunmaktadır.

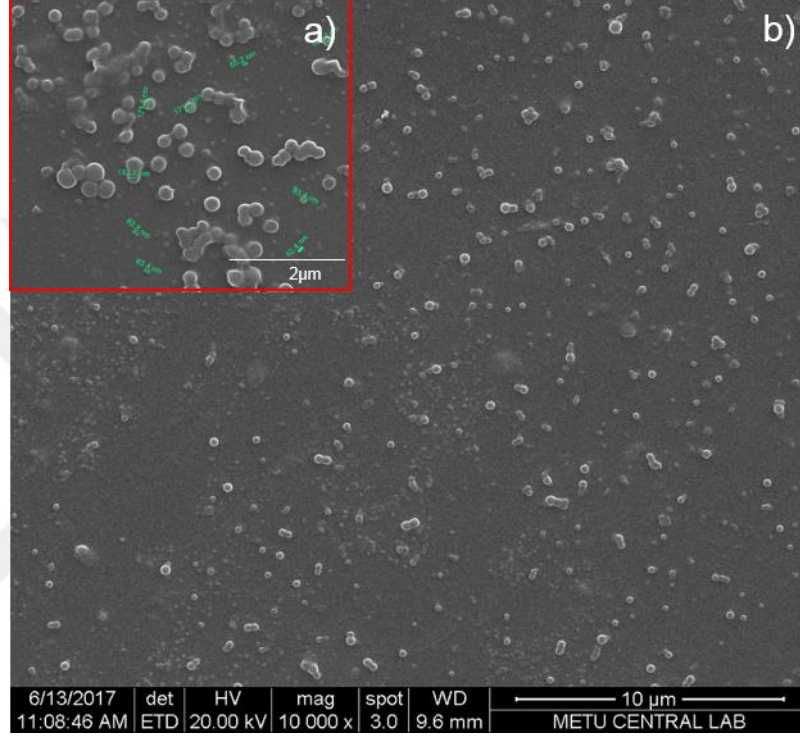


Şekil 4.5. Boş PLGA nanopartiküllerin a) 10,000 ve b) 50,000 büyütmedeki SEM fotoğrafları.

PLGA-SAL Nanopartiküller

SEM görüntüleri Şekil 4.6.'da verilen salinomisin yüklü PLGA partiküller nano boyutta elde edilmiştir. Büyük oranda homojen bir görünüme sahip olan küresel formdaki nanopartiküllerde az miktarda aglomere bölgelere de rastlanmıştır. PLGA-SAL nanopartiküllerin boyutları Şekil 4.6. a'da görüldüğü gibi 65.2 - 208.5 nm arasında değişmektedir. SEM analizinde elde edilen bu sonuçlar, DLS analizinde PLGA-SAL partiküller için alınan 187.4 ± 63.3 nm ortalama çap değerlerine paralellik göstererek desteklemektedir. SEM analizinde, DLS'ye kıyasla daha küçük çapta nanopartiküllerin (65.2 nm, 83.4 nm, 88.6 nm gibi) ölçülmesi beklenen bir sonuçtur. DLS ile yapılan ölçümler nanopartiküllerin aglomere bölgelerinde değişkenlik gösterebilmekte ve bu nedenle nanopartikül ölçümleri ayrı ayrı yapılabilen SEM analizi daha güvenilir sonuçlar vermektedir.

İlgili literatür verileri, ilaç enkapsüle edilen nanopartiküllerin 10-400 nm aralığında boyuta sahip olmalarının tümörlü hücrelere daha kolay alınabilmeleri açısından önemli olduğunu göstermiştir [145]. Tez çalışmasında üretilen tüm nanopartiküllerin boyutları da bu aralıktadır. Nanopartiküllerin boyutları küçüldükçe yüzey alanları artmaktadır. Böylece nanopartiküllerin hücre içine alımları kolaylaşmakta ve ilaç salımında avantajlı konuma gelmektedir. Bu da üretilen nanopartiküllerin tümör hücreleriyle yapılacak olan hücre kültürü çalışmalarına uygun olduğunu göstermiştir.



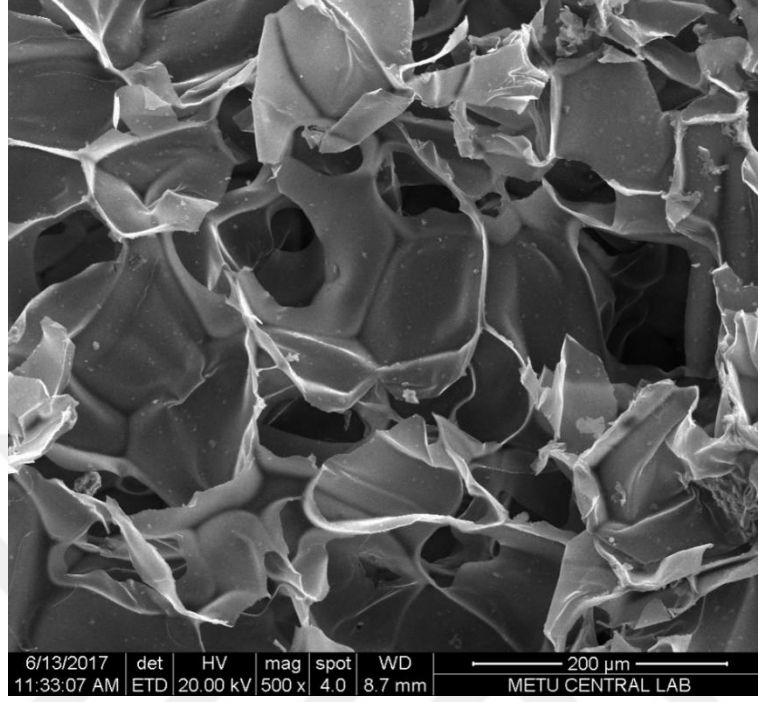
Şekil 4.6. PLGA-SAL nanopartiküllerin a) 50,000 ve b)10,000 büyütmedeki SEM fotoğrafları.

Boş PLGA nanopartiküller ile PLGA-SAL nanopartiküllerin SEM analizi çap verileri kıyaslandığında; ilaç yüklenmiş olan partikül formlarında boş partiküllere nazaran az sayıdaki istisnai değerler haricinde boyut artışı görülmüştür. Partiküle ilaç yükleme işlemine bağlı olarak ortaya çıkan bu sonuç literatür ile uyumludur [146].

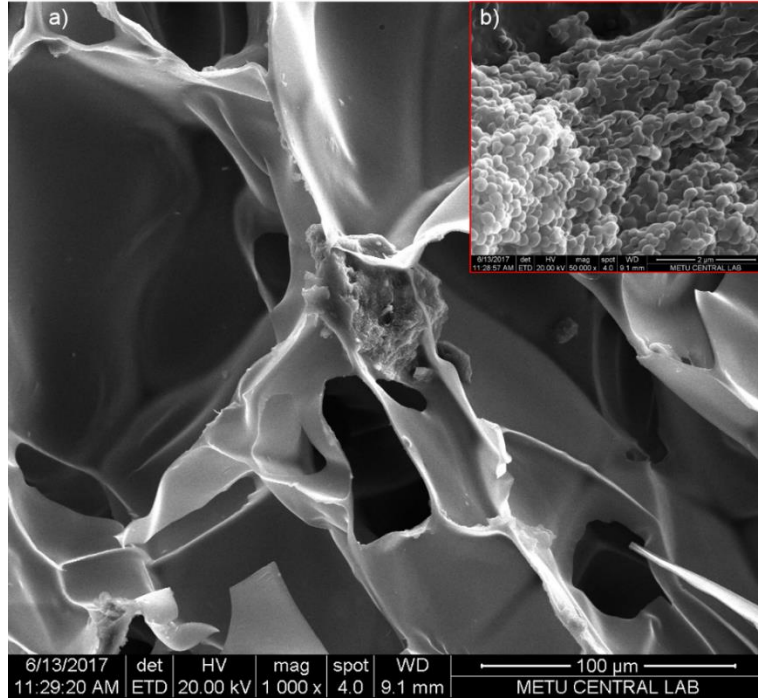
Kitosan Doku İskeleleri

Kitosan doku iskelelerine üretim prosesi sırasında katılanmış olan BnHAp ve PLGA-SAL nanopartiküllerin dağılımını ve morfolojilerini incelemek amacıyla SEM görüntüleri alınmıştır (Şekil 4.7. ve Şekil 4.8.). SEM görüntüleri incelendiğinde doku iskelesine yüklenen partiküllerin yapıya başarıyla katıldığı ve morfolojilerinin düzgün küresel yapıda olduğu gözlenmiştir. Nanopartiküllerin iskeledeki dağılımları incelendiğinde

çoğunlukla içsel bağlantılı gözeneklerin iç duvarlarında yoğunlaştıkları görülmektedir. BnHAp ise kitosan iskelenin yüzeyine ve gözeneklerin içerisine homojen olarak dağılmıştır.



Şekil 4.7. Kitosan/PLGA-SAL doku iskelelerinin 20,000 büyütmedeki SEM fotoğrafı.

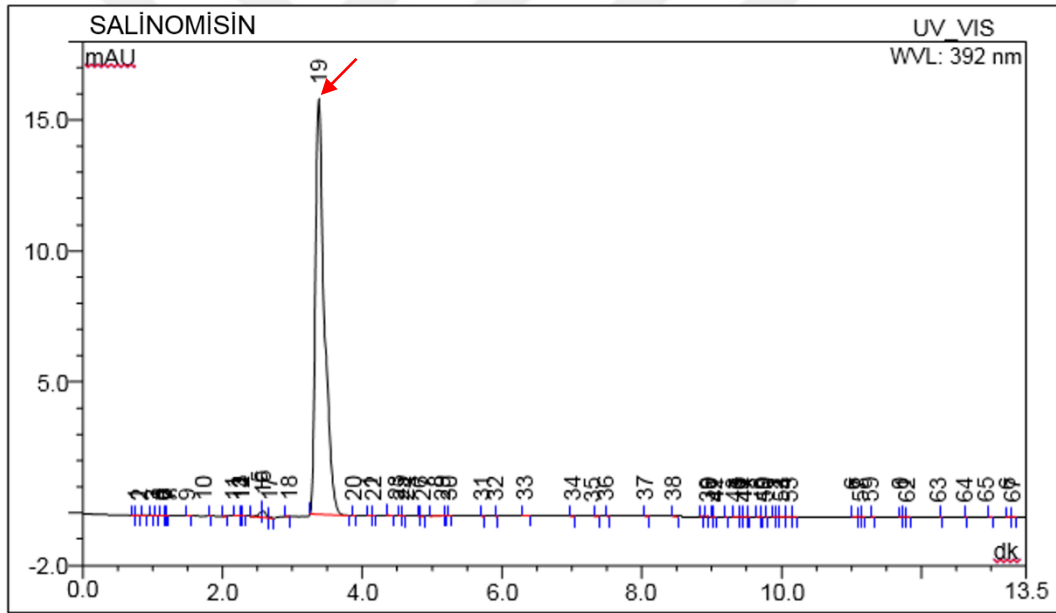


Şekil 4.8. Kitosan/PLGA-SAL doku iskelelerinin a) 20,000 ve b) 50,000 büyütmedeki SEM fotoğrafları.

4.2.3. Salinomisin Enkapsülasyon Veriminin Belirlenmesi

Hazırlanan PLGA bazlı nanopartiküllerin üretimleri sırasında yüklenen salinomisinin ne kadarını enkapsüle edebildiği HPLC analizi ile belirlenmiştir. Enkapsülasyon verimi hesabı yukarıda açıklandığı şekilde yapılmıştır.

Kalibrasyon grafiği oluşturmak için ilk olarak HPLC analizinin yapılacağı absorbans değeri ve salinomisinin bu değerdeki alıkonma süresi belirlenmiştir. Yapılan literatür incelemelerinde salinomisin için farklı absorbans değerleri olduğu görülmüştür [147-149]. Bu değerler incelenerek 392 nm absorbans değeri [137] ve mobil fazlar için de metanol/sulu asetik asit (%1.5) (85:15 v/v) seçilmiştir. Salinomisinin metanol ile 1.5 mg/1 mL derişiminde çözeltisi hazırlanarak HPLC ile 392 nm'de 1 mL/dk akış hızında analiz edilmiştir. Elde edilen kromatoGram Şekil 4.9.'da görülmektedir. Salinomisinin 392 nm absorbans değerindeki alıkonma süresinin 3-3.5. dakikalar arasında olduğu belirlenmiştir.



Şekil 4.9. Salinomisinin HPLC kromatoGramı (Absorbans değeri: 392 nm, akış hızı: 1 mL/dk, mobil fazlar A:Metanol ve B: 1.5% asetik asit çözeltisi, enjeksiyon hacmi: 10 µL).

PLGA (65:35)/SAL nanopartiküllerin enkapsülasyon verimi hesabı 3 kere tekrar edilerek ortalama enkapsülasyon verimi değeri Çizelge 4.2.'de standart sapmasıyla birlikte verilmiştir.

PLGA-SAL nanopartiküllerin enkapsülasyon verimleri yapılan üç denemede de paralellik göstermiştir. Mainardes ve arkadaşları [144] tarafından yapılan bir çalışmada salinomisinin PLGA (50:50) partiküllerle olan veriminin %57-62 aralığında olduğu

rapor edilmiştir. Bir diğer benzer çalışmada ise PLGA (50:50) nanopartiküller için verim en fazla %91 olarak bulunmuştur [145]. Muntimadugu ve arkadaşları, çalışmalarında enkapsülasyon verimini arttırıcı ekstra uygulamalar yaptıkları halde verimleri en fazla %71 civarlarına kadar çıkabilmiştir [138]. Hidrofobik bir ilaç olan salinomisin, literatürden farklı olarak hidrofobisitesi yüksek olan PLGA (65:35) nanopartiküllere yüklenmesi nedeniyle tez çalışması kapsamında elde edilen enkapsülasyon verimi literatürdeki verim değerlerinden daha yüksektir.

Çizelge 4.2. PLGA nanopartiküllere yüklü salinomisinin enkapsülasyon verimi.

Partikül	HPLC Enkapsülasyon Verimi (%)
PLGA (65:35) /SAL	97.4 ± 1.87

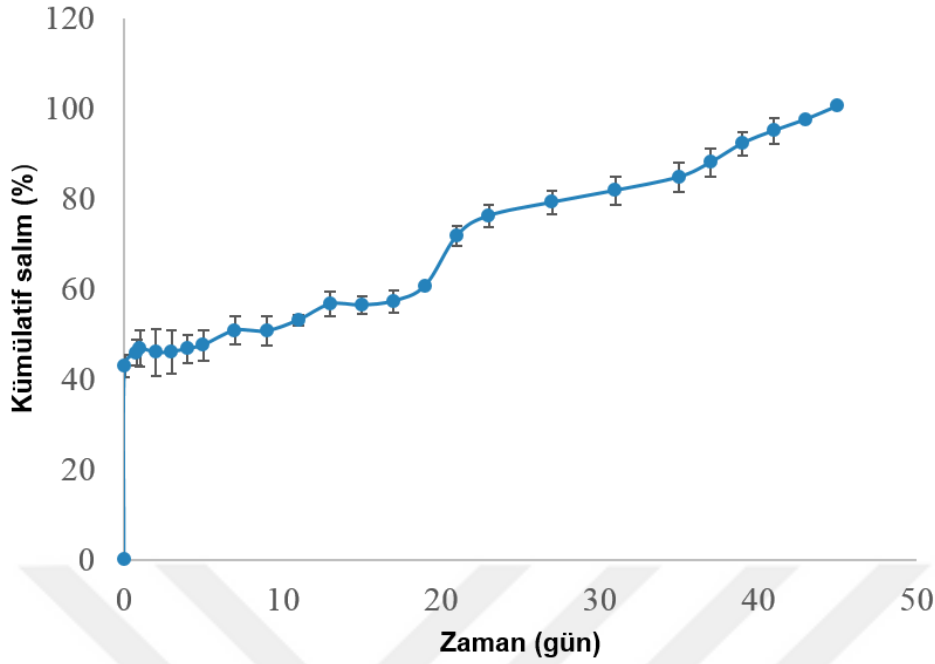
4.3. İn-vitro Salım Çalışmaları ve Salım Kinetiklerinin Belirlenmesi

Salım çalışmaları 2 grup şeklinde yürütülmüştür. Öncelikle PLGA partiküllerden salinomisin salımı incelenmiş, ardından PLGA partiküller kitosan doku iskelelerine yüklenerek doku iskelelerinden ilaç salımı incelenmiştir. Salım çalışmaları her iki grup için de sıfırıncı derece, birinci derece, Hixson-Crowell ve Higuchi olmak üzere dört farklı salım kinetik modeline uygulanmış olup regresyon katsayıları belirlenerek uygun kinetik model tespit edilmiştir.

4.3.1. PLGA Nanopartiküllerden Salinomisin Salımı

PLGA bazlı nanopartiküllerden salınan salinomisin miktarının belirlenmesi için 3 paralel şeklinde diyaliz membran içerisine konarak hazırlanan nanopartiküllerin (4mg) bulunduğu rezervuarlardan belirlenen aralıklarla salım örnekleri (900µL) alınmıştır. Alınan her örnek yerine aynı hacimde taze PBS ilave edilmiştir.

Salım örneklerinin HPLC analizinde kullanmak üzere metanol ile 2,4-DNPh (1 mg/mL) çözeltisi hazırlanmıştır. Her 900 µL'lik salım örneğine analizin hemen öncesinde 100µL 2,4-DNPh çözeltisi ilave edilerek vortekslenmiştir. Ardından bu yeni çözeltiden 20µL alınarak HPLC kolonuna beslenerek salinomisinin alıkonma süresi olan 3-3.5 dk aralığında çıkan pik alanları kaydedilmiştir (EK-2). Elde edilen veriler ile çizilen ortalama kümülatif salım grafiği standart sapmalar da gösterilerek Şekil 4.10.'da verilmiştir.



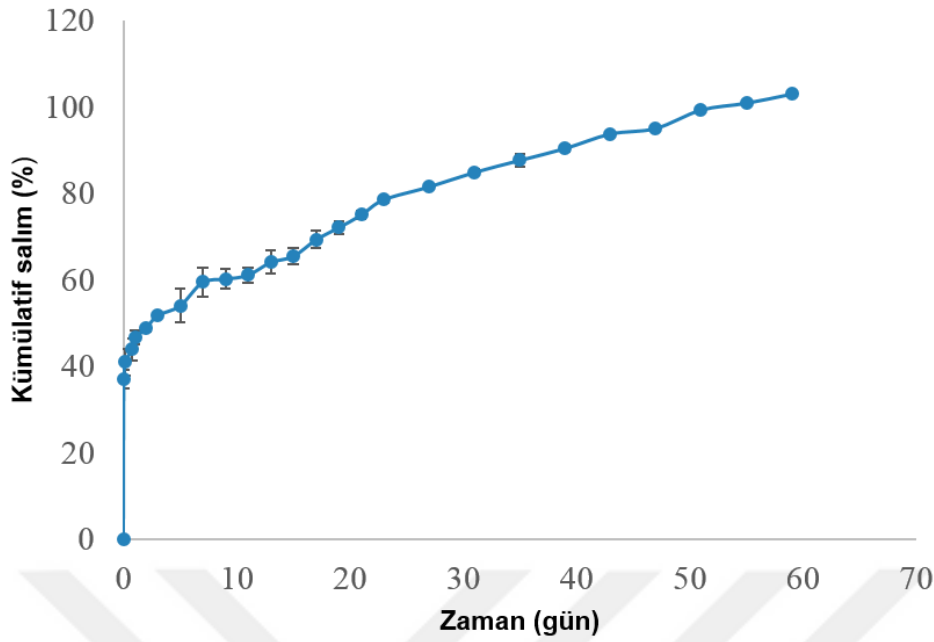
Şekil 4.10. PLGA nanopartikülerden salinomisin salımı için kümülatif salım grafiği.

In vitro salım uygulaması, PBS ortamda 45 gün süresince gerçekleştirilmiştir. Salinomisin salımında 1. saatte ani patlama (burst effect) etkisi gözlenerek kümülatif salım değeri %43'e çıkmıştır. Salım miktarı sonraki süreç boyunca kontrollü biçimde ve genellikle düzenli artarak ilerlemiştir. Kırk beş günlük salım çalışması sonucunda PLGA nanopartiküllerden salınan salinomisin miktarı %100'e ulaşmıştır. PLGA (50:50) bazlı nanopartiküllerden salinomisin salımı gerçekleştirilen benzer bir çalışmada, salım 60 gün boyunca izlenmiştir ve bu sürede salinomisinin sadece %80'i salınabilmiştir [138].

In vitro salım çalışması süresince kümülatif salım grafiğinin oluşmasında PLGA nanopartiküllerin degradasyonu önemli rol oynamaktadır. Nanopartiküllerin bozunma hızları ilaç salım hızına etki etmektedir [150].

4.3.2. PLGA-SAL Nanopartikül Yüklü Kitosan/BnHAp Doku İskelelerinden Salinomisin Salımı

PLGA-SAL nanopartiküller BnHAp ilavesi ile üretilmiş olan 6mm çapındaki kitosan doku iskelelerine yüklenmiş ve salinomisin salımı incelenmiştir. İskeleler PBS rezervuarlarına konmuş ve belirli zaman aralıklarında 900 µL salım örneği alınarak yerine taze PBS ilavesi yapılmıştır.



Şekil 4.11. PLGA-SAL yüklü kitosan/BnHAp doku iskelelerinden salinomisin salımı için kümülatif salım grafiği.

Salım örneklerine HPLC analizi öncesi partikülden salım başlığında anlatıldığı şekilde 2,4-DNPh çözeltisi eklenmiştir. HPLC cihazı ile her bir numune incelenerek 3-3.5 dk alıkonma süresi aralığında ortaya çıkan piklerin alanları kaydedilmiş olup (EK-3) ortalama kümülatif salım grafiği çizilmiştir. Bu salım grafiği standart sapmaları ile birlikte Şekil 4.11.'de gösterilmiştir.

Kitosan bazlı doku iskelelerinden yapılan *in vitro* salım çalışması, PBS ortamında 59 gün boyunca yürütülmüştür. Salinomisin salımın 1. saatinde %36, ilk 24 saatte ise %44'e ulaşan ani patlama göstermiştir. Salım miktarı sonraki salım süresi boyunca düzenli ve kontrollü biçimde artarak ilerlemiş ve 59 günün sonunda %100'e ulaşmıştır.

PLGA-SAL nanopartiküllerden ve kitosan/PLGA-SAL/BnHAp doku iskelelerinden salım 4 farklı kinetik model için uygulanmış ve Çizelge 4.3.'te verilmiştir. Belirlenen regresyon katsayıları incelendiğinde her iki grubunda Hixson-Crowell salım modeline uygun olduğu görülmüştür. Bu salım modeli, hem partikül hem de iskeleden salım grafiklerinde aralıklarla sabitleme ve tekrar artış gerçekleşmesinin sonucu olmaktadır.

Çizelge 4.3. Salinomisin yüklü PLGA nanopartiküllerin ve kitosan doku iskelelerinin salım kinetikleri.

	Kinetik Modeller							
	Sıfırıncı Derece		Birinci Derece		Hixson-Crowell		Higuchi	
	R ²	K ₀ (µg sa ⁻¹)	R ²	K ₁ (sa ⁻¹)	R ²	K _{HC} (sa ^{-1/3})	R ²	K _H (µg sa ^{-1/2})
PLGA-SAL	0.84	1.7826	0.85	0.0559	0.91	0.0559	0.84	12.25
Kitosan/PLGA-SAL/BnHAp	0.80	1.6163	0.86	0.0614	0.94	0.0556	0.90	12.49

4.4. Hücre Kültür Çalışmaları

Tez kapsamında yapılan hücre kültür çalışmaları iki ayrı bölümden oluşmaktadır. Hücre kültür uygulamalarının ilk kısmında nanopartiküllere yüklenmiş olan salinomisin MG-63 osteosarkom hücre hattı üzerine etkileri incelenmiş olup doz belirleme çalışmaları yapılmıştır. İkinci kısmında ise salinomisin (SAL) yüklü nanopartiküllerin bor katkılı nanohidroksiapatit (BnHAp) ve nanohidroksiapatit (nHAp) varlığında MG-63 hücre hattına nasıl etki ettiği ele alınarak kıyaslama yapılmıştır.

Hücre kültürü çalışmaları, boş PLGA nanopartiküller ve salinomisin yüklü PLGA (PLGA-SAL) nanopartiküller ile yürütülmüş olup karşılaştırma yapmak amacıyla SAL, BnHAp ve nHAp'ın doğrudan kültüre ilave edildiği gruplara da yer verilmiştir. Kültür çalışmalarında kullanılan tüm gruplar Çizelge 4.4.'te verilmiştir.

Kültür çalışmaları süresince hücre canlılıklarını belirlemek amacıyla canlı-ölü boyama analizi yapılmıştır. Nanopartiküllerin hücre iskeleti organizasyonu Alexa Fluor/DAPI boyama ve nanopartiküllerin hücre içi alımları ise kristal viyole boyama uygulaması ile incelenmiştir. Son olarak; hücre morfolojisi ve yoğunluğundaki değişimi gözlemlemek amacıyla doz çalışmalarında belirlenmiş olan optimum değerdeki grup kullanılarak bir hücre kültürü uygulaması yapılmış olup hücre sayım/görüntüleme (Juli, Nanoentek, Kore) cihazına bağlanarak incelenmiştir.

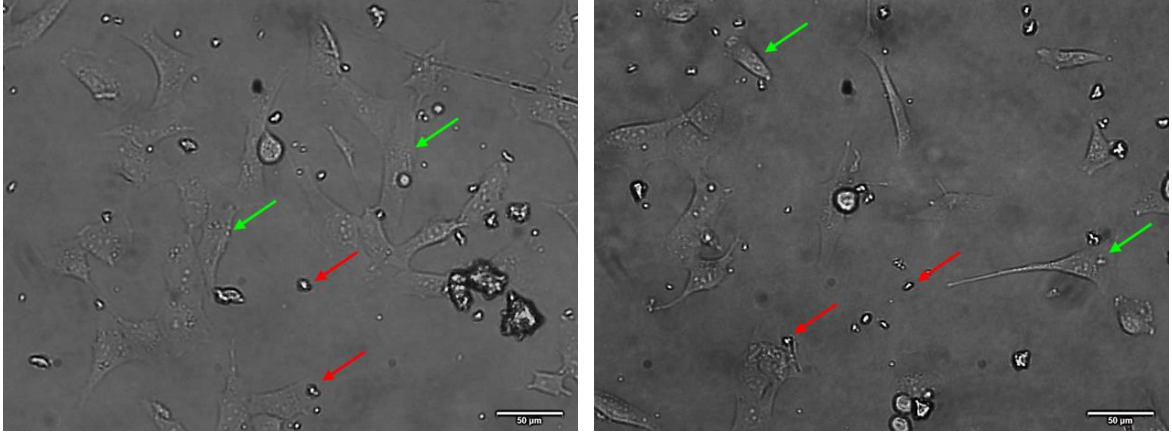
Çizelge 4.4. Hücre kültürü uygulamaları için oluşturulan gruplar.

Grup No	Grup Adı	PLGA Nanopartikül İçeriği	SAL İçeriği
1. Grup	SAL _{2.73 µg}	-	2.73 µg
	SAL _{7.51 µg}	-	7.51 µg
	SAL _{15.02 µg}	-	15.02 µg
2. Grup	Boş PLGA nanopartiküller	0.20 mg	-
3. Grup	(PLGA-SAL) _{0.15 mg}	0.15 mg	2.04 µg
	(PLGA-SAL) _{0.20mg}	0.20 mg	2.73 µg
	(PLGA-SAL) _{0.55 mg}	0.55 mg	7.51 µg
	(PLGA-SAL) _{1.10 mg}	1.10 mg	15.02 µg
4. Grup	(PLGA-SAL) _{0.20mg} /BnHAp	0.20 mg	2.73 µg
5. Grup	(PLGA-SAL) _{0.20mg} /nHAp	0.20 mg	2.73 µg

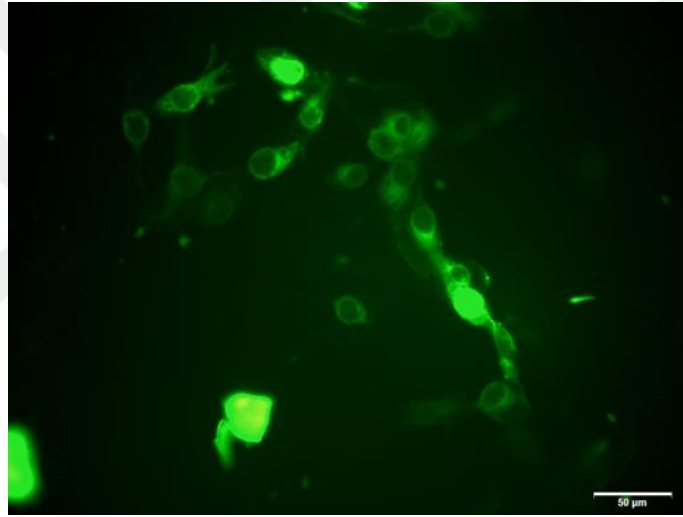
4.4.1. Optik ve Floresan Mikroskop ile Görüntüleme

PLGA-SAL nanopartiküller ve MG-63 osteosarkom hücreleri ile yapılan hücre kültürü uygulamalarına ait optik mikroskop görüntüleri Şekil 4.12.'de bulunmaktadır. Optik görüntülerde kırmızı ok ile nanopartiküller yeşil ok ile MG-63 hücreleri gösterilmiştir.

Üretimi sırasında nanopartiküllerin yapısına FITC katılarak floresan özellikte PLGA-SAL nanopartiküller elde edilmiştir. Üretilen floresan nanopartiküllerin hücre membranından geçerek hücre içine alımını gözlemlemek için floresan mikroskop ile çekilen fotoğrafları Şekil 4.13.'te verilmiştir. Floresan nanopartiküller, MG-63 hücrelerin membranlarından girebilmiş ve bu nedenle hücreler mikroskopta yeşil renkte görüntülenmiştir.



Şekil 4.12. MG-63 hücreleri ile yapılan hücre kültürü uygulamalarına ait optik mikroskop görüntüleri (Kırmızı ok ile nanopartiküller, yeşil ok ile MG-63 hücreleri gösterilmiştir.).



Şekil 4.13. MG-63 hücreleri ile yapılan kültür çalışmalarında FITC içeren PLGA-SAL nanopartiküllerin floresan mikroskop görüntüleri.

4.4.2. Canlı-Ölü Hücre Analizi

Canlı-ölü analizi çalışmaları için öncelikle MG-63 osteosarkom hücreleri, her bir gözde 1 mL ortam ile 2.5×10^4 hücre/cm² yoğunlukta olacak şekilde 24 gözlü hücre kültür kaplarına ekilmiş ve 24 saat boyunca 37°C'ta inkübe edilmiştir. Bu sürenin sonunda hücre besisi ortamı taze ortam ile değiştirilmiştir. Ardından belirlenen gruplar doğrultusunda SAL grupları, boş PLGA nanopartiküller, PLGA-SAL nanopartikül grupları ile nanopartiküllere BnHAp ve nHAp ilave edilen gruplar ortamlara eklenerek hücrelerle etkileşime sokulmuştur. Canlı-ölü hücre analizi için bu gruplarla etkileşimin 3. saat ve 1. gününde Etidyum homodimer-1 ve Kalsein-AM ile boyamalar yapılmıştır. Boyama sonrası floresan mikroskop ile yapılan incelemelerde canlı hücreler yeşil, ölü hücreler ise kırmızı renkte görüntülenmiştir.

Canlı-ölü analizi çalışmalarının ilk adımını kontrol grubu olan MG-63 osteosarkom hücreleri, boş PLGA nanopartiküller, 2.73 µg salinomisin (SAL_{2.73µg}) ve 0.20 mg PLGA-SAL nanopartikül ((PLGA-SAL)_{0.20mg}) grupları oluşturmaktadır. İlaç yüklü nanopartiküllerin 2 mg'ının içerdiği salinomisin miktarı 2.73 µg olduğu için uygulama grubu olarak aynı miktarda SAL seçilmiştir.

Şekil 4.14.'te bu grupların 3. saat ve 1. günde yapılan canlı-ölü boyamaları sonucu elde edilen görüntüleri yer almaktadır. Görüntülerden elde edilen sonuçlar ile her bir grubun MG-63 hücrelerinin morfolojisine ve canlılığına olan etkisi incelenmiştir. Sonuçlara bağlı olarak boş PLGA nanopartiküllerin literatürle uyumlu olarak [15] hücreler üzerinde toksik etkiye sahip olmadığı, aksine hücrelerin kontrol grubunda olduğu gibi artış gösterdiğine kanaat getirilmiştir. SAL_{2.73µg} ve (PLGA-SAL)_{0.20mg} nanopartikül grupları kıyaslandığında; SAL_{2.73µg} grubundaki hücre ölümlerinin (PLGA-SAL)_{0.20mg} nanopartikül grubuna kıyasla yok denecek kadar az olduğu görülmüştür. SAL_{2.73µg} grubunda MG-63 hücre canlılığında anlamlı bir değişiklik olmazken nanopartikül içeren grupta hem 3. saat hem de 1. gün sonunda yapılan incelemelerde ölüm oranlarının SAL_{2.73µg} grubuna kıyasla oldukça yüksek olduğu belirlenmiştir.

Canlı-ölü analizinin devamında konsantrasyonları yukarıda anlatıldığı şekilde belirlenmiş olan SAL_{7.51µg}, (PLGA-SAL)_{0.55mg} nanopartiküller ile SAL_{15.02µg} ve (PLGA-SAL)_{1.10mg} nanopartikül grupları ile çalışılmıştır. PLGA-SAL nanopartikül ve SAL içeren gruplar arasında tam bir kıyaslama yapabilmek amacıyla çalışma planı bu şekilde oluşturulmuştur. Şekil 4.15.'te de görüldüğü üzere sadece SAL içeren gruplara kıyasla PLGA-SAL gruplarında MG-63 hücre canlılığı önemli ölçüde azalmıştır.

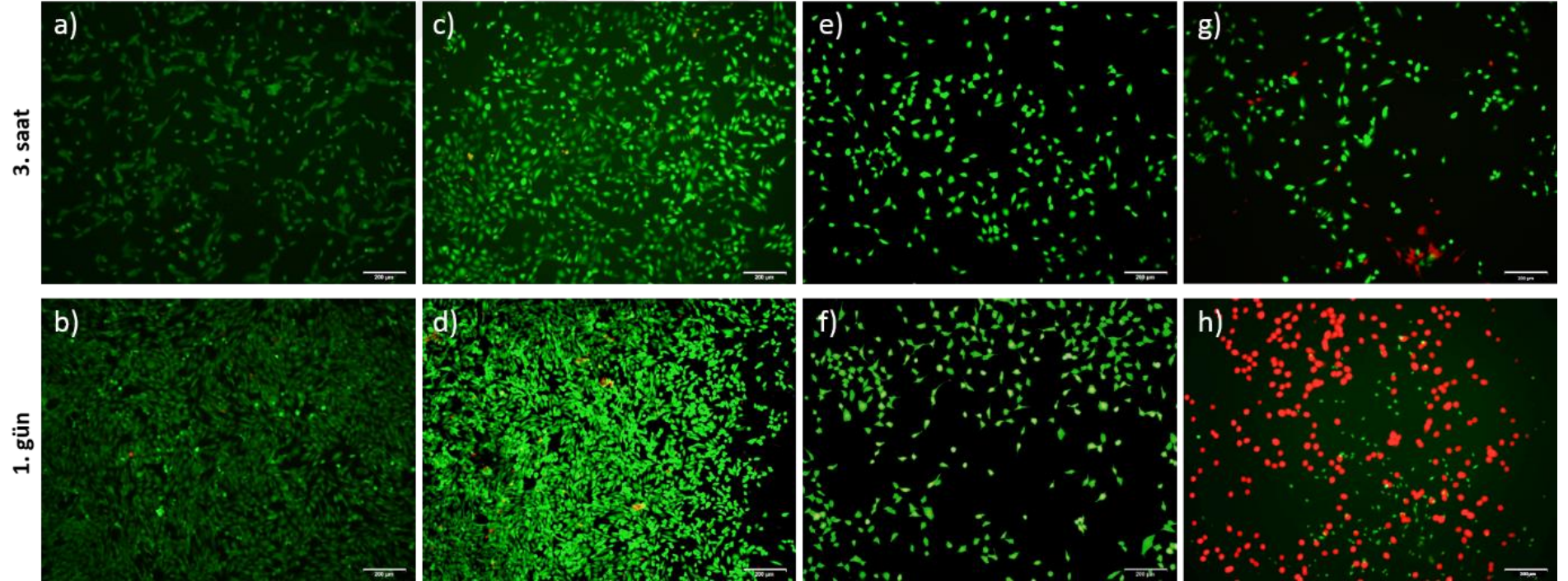
Hücre kültürü uygulamalarının doz belirleme çalışması sonucunda optimum nanopartikül konsantrasyonu olarak (PLGA-SAL)_{0.20mg} nanopartikül grubu seçilmiştir. PLGA-SAL nanopartiküllerin MG-63 osteosarkom hücreleri üzerinde 0.20 mg kullanımı ile kültür çalışmasında en iyi ve beklenene en uygun sonuçlar elde edilebilmiştir. Bunun sebebi hücrelerin bu dozda, nekroza uğramadan kontrollü bir şekilde apoptoz davranışını göstermiş olmasıdır. Daha yüksek miktarda nanopartikül grupları ((PLGA-SAL)_{0.55mg} ve (PLGA-SAL)_{1.10mg}) ile çalışıldığında hücre membranlarında ani parçalanmalar ve kültür ortamında canlı hücre çekirdekleri görülmüştür ki bu davranış nekroz olarak yorumlanmıştır. Daha az miktarda nanopartikül ile ((PLGA-SAL)_{0.15mg}) uygulama yapıldığında ise ilaç miktarı yetersiz kaldığı için hücre canlılık oranları istenenden daha yüksek oranlarda sonuç vermiştir.

Canlı-ölü boyama analizinin ilk aşamasında farklı dozlar için alınan görüntüler incelenerek optimum dozu belirleme çalışması yapmak amacı ile 3. sa ve 1. gün için "Image J" proGramı kullanılarak hücre sayımları yapılmıştır. Canlı hücre ve ölü hücre sayılarından yola çıkılarak kontrol grubu, boş PLGA nanopartikül, (PLGA-SAL)_{0.15mg}, (PLGA-SAL)_{0.20mg}, (PLGA-SAL)_{0.55mg} ve (PLGA-SAL)_{1.10mg} nanopartikül grupları için yüzde canlılık hesabı yapılmıştır. Hesaplamalardan elde edilen sonuçlar grafiksel olarak Şekil 4.16'da verilmiş olup sayısal değerleri incelendiğinde alınan görüntüler ile paralellik gösterdiği görülmüştür.

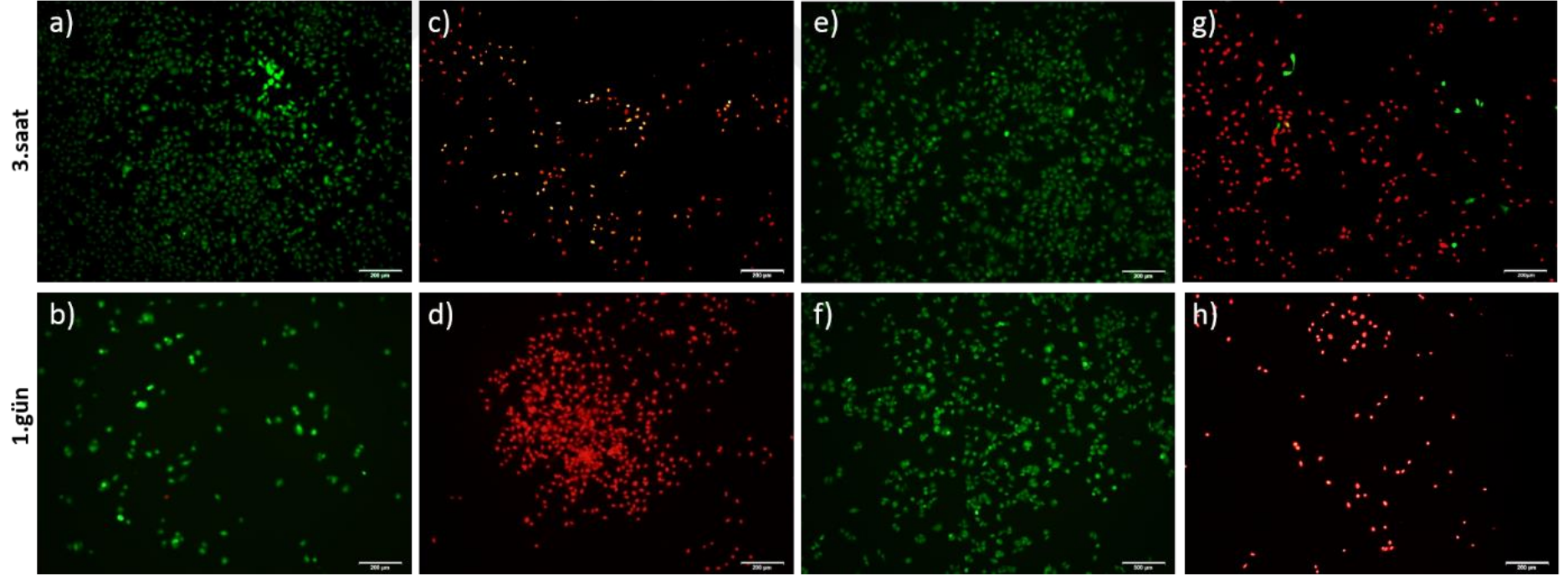
Canlılık (%) – zaman (sa) grafiğinde de görüldüğü gibi hücre kültürünün 3. saatinde alınan sonuçlarda, hücrelerin canlılık oranlarında yalnızca (PLGA-SAL)_{0.55mg} ve (PLGA-SAL)_{1.10mg} nanopartikül gruplarında anlamlı farklılık verileri elde edilmiştir (MG-63 $p<0.01$, Boş PLGA nanopartikül $p<0.05$). Hücre kültürünün ilk 3 saatinde boş PLGA nanopartiküllerden alınan ortalama yüzde canlılık sonuçları %89.6 olarak hesaplanmış olup %97.9 olan kontrol grubu ile çok yakın değerlerde seyretmektedir. Buna ek olarak (PLGA-SAL)_{0.15mg} ve (PLGA-SAL)_{0.20mg} nanopartikül gruplarında ortalama yüzde canlılık değerleri sırası ile %57.9 ve %67.1 bulunmuştur.

Kültürün 24. saatinde elde edilen hücre canlılık verileri incelendiğinde en yüksek düşüş (PLGA-SAL)_{0.20mg} nanopartikül grubunda tespit edilmiş olup ortalama yüzde canlılık değeri %27.83 olarak hesaplanmıştır. (PLGA-SAL)_{0.20mg} nanopartikül grubu ile hem kontrol grubu hem de boş PLGA nanopartikül grubunun yüzde canlılık değerleri arasındaki farklılık oldukça anlamlı bulunmuştur (MG-63 $p<0.01$, Boş PLGA nanopartikül $p<0.05$).

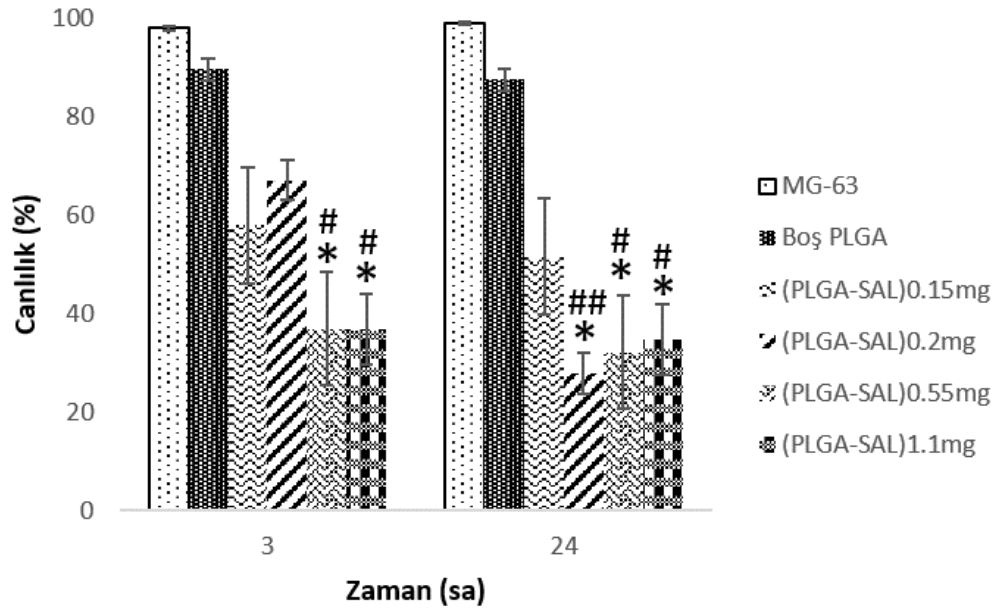
Canlı-ölü boyama analizinde elde edilen bu sonuçlar ışığında; PLGA-SAL nanopartiküller için optimum değer olarak (PLGA-SAL)_{0.20mg} nanopartikül grubu seçilerek uygulamalara devam edilmiştir.



Şekil 4.14. Canlı/Ölü Boyama Görüntüleri (10x) a,b) MG-63 hücre hattı c,d) Boş PLGA nanopartiküller e,f) SAL_{2.73μg} g,h) (PLGA-SAL)_{0.20mg} (Canlı hücreler yeşil, ölü hücreler kırmızı renkte gözlenmektedir.).



Şekil 4.15. Canlı/Ölü Boyama Görüntüleri (10x) a,b) SAL_{7.51}µg c,d) (PLGA-SAL)_{0.55}mg e,f) SAL_{15.02} µg g,h) (PLGA-SAL)_{1.10}mg (Canlı hücreler yeşil, ölü hücreler kırmızı renkte gözlenmektedir.).



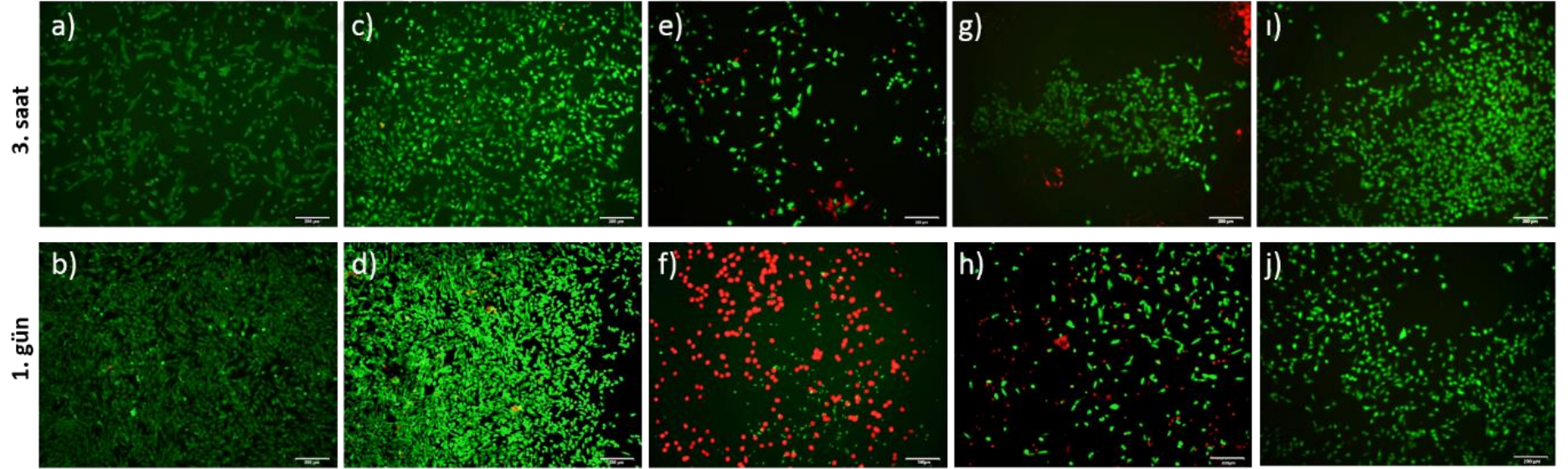
Şekil 4.16. MG-63 hücreleri, boş PLGA nanopartiküller, (PLGA-SAL)_{0.15mg} nanopartiküller, (PLGA-SAL)_{0.20mg} nanopartiküller, (PLGA-SAL)_{0.55mg} nanopartiküller ve (PLGA-SAL)_{1.10mg} nanopartiküllere ait canlı-ölü boyama ortalama yüzde canlılık sonuçları (İstatistiksel olarak anlamlı farklılık, n=2, kontrol grubu MG-63 hücreleri iken * p<0.01; kontrol grubu Boş PLGA nanopartiküller iken # p<0.05, ## p<0.01).

Canlı-ölü analizi çalışmasının ikinci adımında kontrol grubu, boş PLGA nanopartiküller (2. Grup), (PLGA-SAL)_{0.20mg} nanopartiküller (3. Grup), BnHAp ilaveli (PLGA-SAL)_{0.20mg} nanopartiküller (4. Grup) ve nHAp ilaveli (PLGA-SAL)_{0.20mg} nanopartiküller (5. Grup) olmak üzere beş farklı gruba yer verilmiştir. Bu çalışmada yapılan analizlerle, optimum değer olan (PLGA-SAL)_{0.20mg} nanopartikül grubu ile 4. ve 5. grupların sonuçları kıyaslanmıştır. Yapılan analizde; BnHAp'taki bor varlığında kanser hücreleri üzerindeki salinomisin öldürücü etkilerine paralel bir etkinin oluşup oluşmayacağı incelenmek istenmiştir. Canlı-ölü boyama analizinde Şekil 4.17.'de de görüldüğü gibi hem 3. saatte hem de 1. günde alınan görüntülerde 4. gruptaki MG-63 hücrelerinin canlılık oranları 3. gruba kıyasla çok daha yüksektir. Hidroksiapatitin MG-63 osteosarkom hücreleri üzerindeki geliştirici ve proliferasyonunu artırıcı etkileri bilinmektedir [151, 152]. Yapılan tez çalışmasında literatürden farklı olarak bor, hidroksiapatit içerisine katkılanarak hücre kültür ortamında incelenmiştir. Bu etkileri sebebiyle 4. grupta yer alan BnHAp içeriğindeki çok az miktarda bor, MG-63 hücrelerinin canlılığında bir azalma sağlayamamıştır. Bunun aksine hidroksiapatit

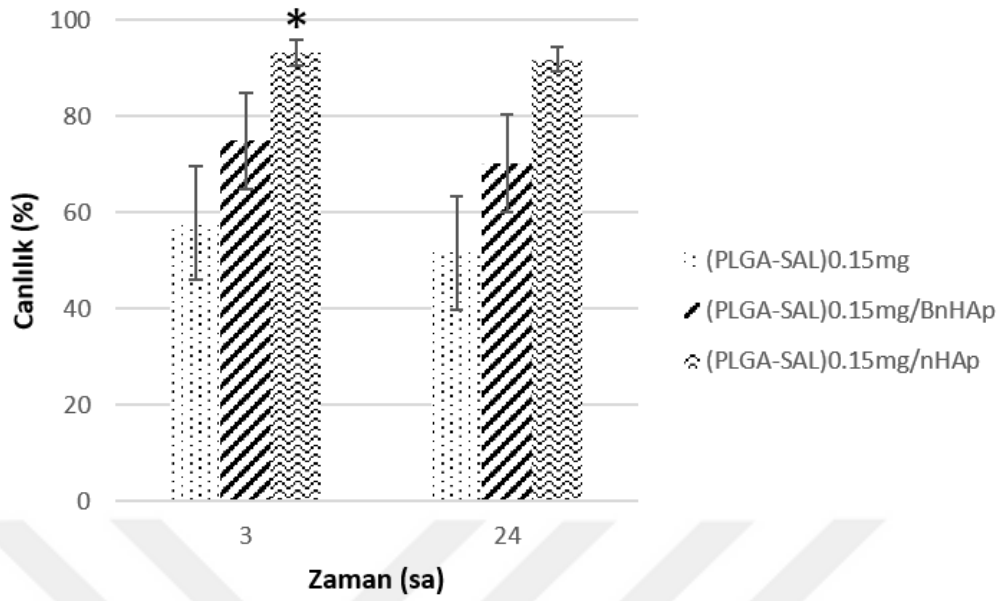
etkisi ile kontrol grubuna ve boş PLGA nanopartikül grubuna oranla hücre canlılığı daha fazla artmıştır. Aynı şekilde 5. grupta da hücre canlılığı belirgin şekilde artmıştır.

Canlı-ölü boyama analizinin ikinci aşamasında alınan görüntüler incelenerek (PLGA-SAL)_{0.15mg} ve (PLGA-SAL)_{0.20mg} nanopartiküller ile bu partiküllerin BnHAp ve nHAp varlığındaki etkilerinin incelendiği bir çalışma yapmak amacı ile 3. sa ve 1. gün için "Image J" proGramı kullanılarak hücre sayımları yapılmıştır. Canlı hücre ve ölü hücre sayılarından yola çıkılarak (PLGA-SAL)_{0.15mg} nanopartikül, (PLGA-SAL)_{0.15mg}/BnHAp ve (PLGA-SAL)_{0.15mg}/nHAp grupları için yüzde canlılık hesabı yapılmıştır. Hesaplamalardan elde edilen sonuçlar grafiksel olarak Şekil 4.18'de verilmiş olup sayısal değerleri incelendiğinde alınan görüntüler ile paralellik gösterdiği görülmüştür. Elde edilen veriler incelendiğinde BnHAp ve nHAp varlığında hücre canlılık oranları çok yüksek olup 1. günün sonunda herhangi bir düşüş gözlenmemiştir. Hesaplanan ortalama yüzde canlılık verileri kıyaslandığında yalnızca (PLGA-SAL)_{0.15mg} ve (PLGA-SAL)_{0.15mg}/nHAp grupları arasında 3. saatte anlamlı farklılık değeri elde edilmiştir ($p<0.01$).

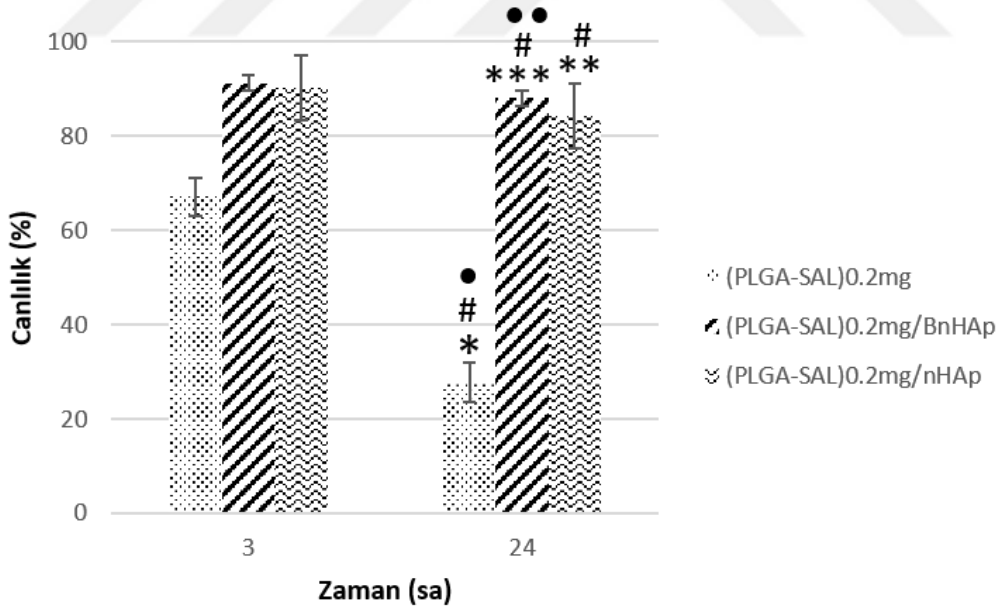
Canlı hücre ve ölü hücre sayılarından yola çıkılarak optimum nanopartikül değeri olan (PLGA-SAL)_{0.20mg} nanopartikül, (PLGA-SAL)_{0.20mg}/BnHAp ve (PLGA-SAL)_{0.20mg}/nHAp grupları için yüzde canlılık hesabı yapılmıştır. Hesaplamalardan elde edilen sonuçlar grafiksel olarak Şekil 4.19'da verilmiş olup sayısal değerleri incelendiğinde alınan görüntüler ile paralellik gösterdiği görülmüştür. Elde edilen veriler incelendiğinde BnHAp ve nHAp varlığında hücre canlılık oranları çok yüksek olup 1. günün sonunda çok fazla düşüş gözlemlenmemiştir. Buna karşın (PLGA-SAL)_{0.20mg} nanopartikül grubunda ortalama yüzde canlılık verisi en düşük değer olarak kaydedilmiştir. Hesaplanan ortalama yüzde canlılık verileri kıyaslandığında tüm gruplar arasında kültürün 24. saatinde anlamlı farklılık değerleri elde edilmiştir ((PLGA-SAL)_{0.20mg} $p<0.05$, (PLGA-SAL)_{0.20mg}/BnHAp $p<0.001$, (PLGA-SAL)_{0.20mg}/nHAp $p<0.05$).



Şekil 4.17. Canlı/Ölü Boyama Görüntüleri (10x) a,b) MG-63 hücre hattı c,d) Boş PLGA nanopartiküller e,f) (PLGA-SAL)_{0.20mg} g,h) (PLGA-SAL)_{0.20mg}/BnHAp ı,j) (PLGA-SAL)_{0.20mg}/nHAp (Canlı hücreler yeşil, ölü hücreler kırmızı renkte gözlenmektedir.).



Şekil 4.18. (PLGA-SAL)_{0.15mg} nanopartiküller, (PLGA-SAL)_{0.15mg}/BnHAp ve (PLGA-SAL)_{0.15mg}/nHAp gruplarına ait canlı-ölü boyama ortalama yüzde canlılık sonuçları (İstatistiksel olarak anlamlı farklılık, n=1, kontrol grubu (PLGA-SAL)_{0.15mg} iken * p<0.01).



Şekil 4.19. (PLGA-SAL)_{0.20mg} nanopartiküller, (PLGA-SAL)_{0.20mg}/BnHAp ve (PLGA-SAL)_{0.20mg}/nHAp gruplarına ait canlı-ölü boyama ortalama yüzde canlılık sonuçları (İstatistiksel olarak anlamlı farklılık, n=3, kontrol grubu (PLGA-SAL)_{0.20mg} iken * p<0.05, ** p<0.01, *** p<0.001; kontrol grubu (PLGA-SAL)_{0.20mg}/BnHAp iken # p<0.001; kontrol grubu (PLGA-SAL)_{0.20mg}/nHAp iken • p<0.05, •• p<0.001).

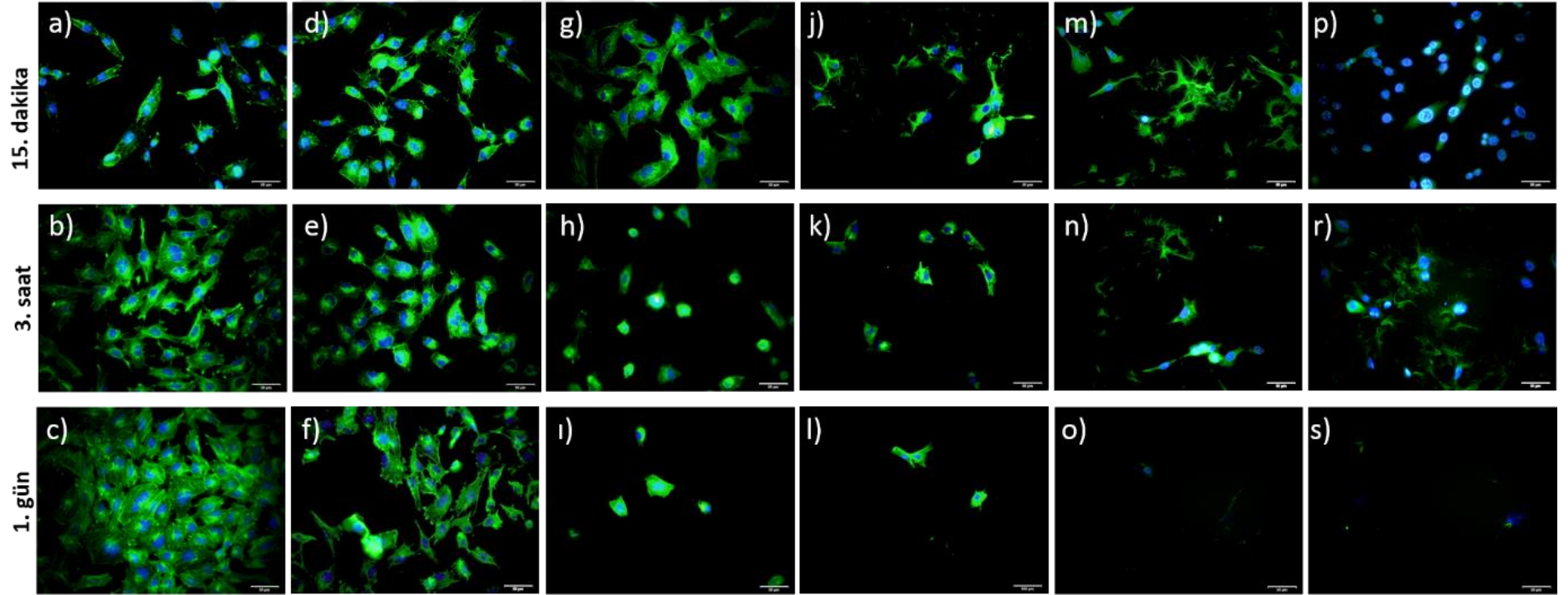
4.4.3. Hücre Canlılığı ve Morfolojisini Görüntüleme

4.4.3.1. Alexa Fluor/DAPI boyama

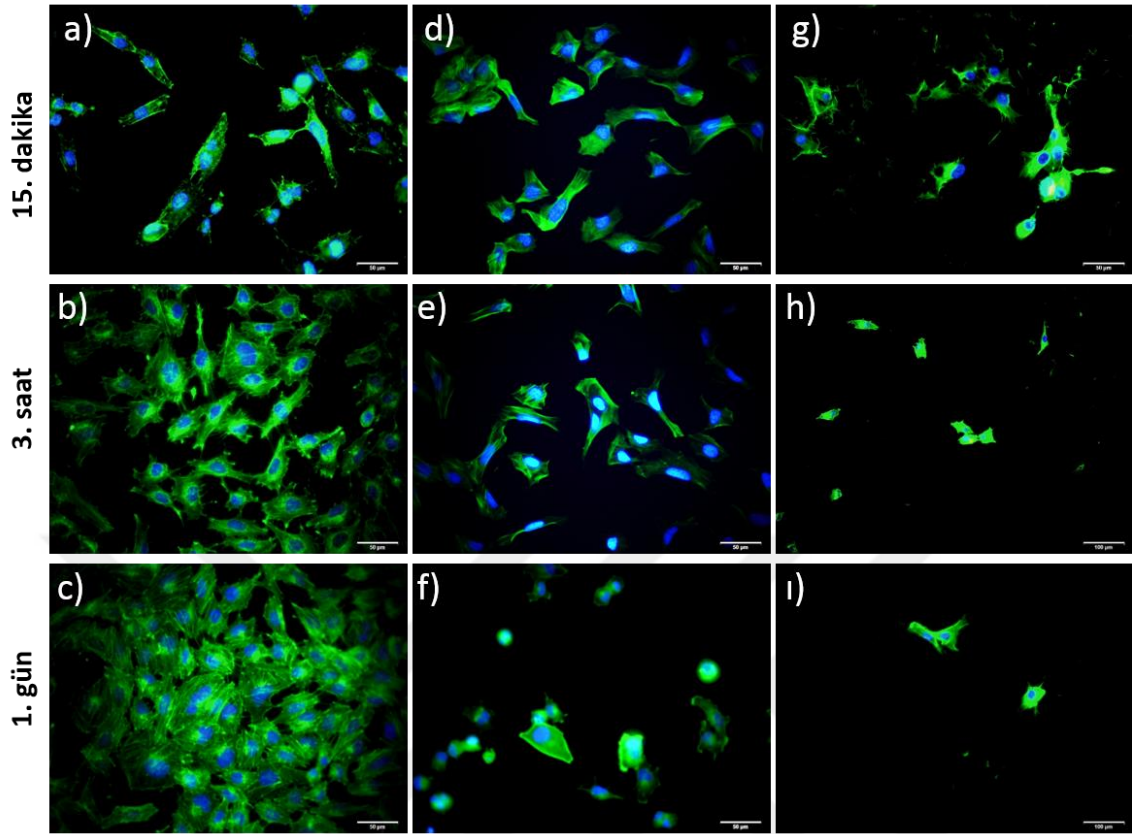
Hücre canlılığı ve morfolojisinin görüntülenmesi çalışmaları için öncelikle MG-63 osteosarkom hücreleri, her bir gözde 2.5×10^4 hücre/cm² yoğunlukta olacak şekilde 24 gözlü hücre kültür kaplarına ekilmiş ve 24 saat boyunca 37°C'ta inkübe edilmiştir. Bu sürenin sonunda hücre besi ortamı taze ortam ile değiştirilmiştir. Ardından belirlenen gruplar kültür ortamlarına ilave edilmiştir. Alexa Fluor/DAPI boyama uygulamaları, hücrelerin bu gruplarla etkileşiminin 15. dk, 3. sa ve 1. gününde yapılmıştır. Boyama sonrası floresan mikroskop ile yapılan incelemelerde hücre membranları yeşil, çekirdekleri ise mavi renkte görüntülenmiştir.

Hücre morfolojisi ve canlılığındaki değişimi gözlemlemek üzere hazırlanmış olan Şekil 4.20.'de de görüldüğü üzere, sadece MG-63 osteosarkom hücreleri ekili gruplarda ve boş PLGA nanopartikül ilaveli gruplarda artan hücre yoğunluğu, PLGA-SAL nanopartikül grubunda azalmıştır. PLGA-SAL gruplarının Alexa Fluor/DAPI boyama görüntüleri değerlendirilip partiküllerin MG-63 osteosarkom hücreleri üzerindeki etkileri göz önüne alınarak 0.20 mg nanopartikül içeren grup ((PLGA-SAL)_{0.20mg}) optimum değer olarak seçilmiştir. (PLGA-SAL)_{0.15mg} nanopartikül grubundaki salinomisin miktarı, hücre canlılığındaki düşüş istenenden az olduğu için yetersiz bulunmuştur. (PLGA-SAL)_{0.55mg} ve (PLGA-SAL)_{1.10mg} gruplarında ise hücre membranlarının ani biçimde parçalanarak dağıldığı ve buna karşın birçok görüntüde çekirdeklerin dağılmadan kaldığı gözlemlenmiştir. Gözlenen bu hızlı membran parçalanması, yapılan ilaç salım çalışması doğrultusunda tercih edilmemektedir [153]. Tüm bu sonuçlar optimum nanopartikül değerinin (PLGA-SAL)_{0.20mg} olarak belirlenmesine etki etmiştir.

(PLGA-SAL)_{0.20mg} nanopartikül grubu ile SAL_{2.73µg} grubunun MG-63 hücre hattı üzerine etkisi kıyaslanmak üzere Alexa Fluor (yeşil)/ DAPI (mavi) boyama ile görüntülenerek Şekil 4.21.'de gösterilmiştir. SAL_{2.73µg} grubunda hücre morfolojilerinin değiştiği ve bozulduğu görülmüştür ancak; hücre membranlarında herhangi bir dağılma ve yıkım sağlanamamış ve hücre canlılığı beklenen ölçüde azalmamıştır. (PLGA-SAL)_{0.20mg} nanopartikül grubunda 15. dk'dan itibaren alınan görüntülerde görüldüğü üzere hücre canlılığı giderek azalmış ve 1. günde yapılan incelemelerde çok az hücre görüntülenebilmiştir. Aynı miktarda salinomisin içeren SAL_{2.73µg} grubu ile (PLGA-SAL)_{0.20mg} grubu çok farklı iki sonuç ortaya çıkarmıştır.



Şekil 4.20. Alexa Fluor (yeşil)/DAPI (mavi) boyama görüntüleri (40x). a,b,c) MG-63 hücre hattı d,e,f) Boş PLGA nanopartiküller g,h,i) (PLGA-SAL)_{0.15mg} j,k,l) (PLGA-SAL)_{0.20mg} m,n,o) (PLGA-SAL)_{0.55mg} p,r,s) (PLGA-SAL)_{1.10mg}

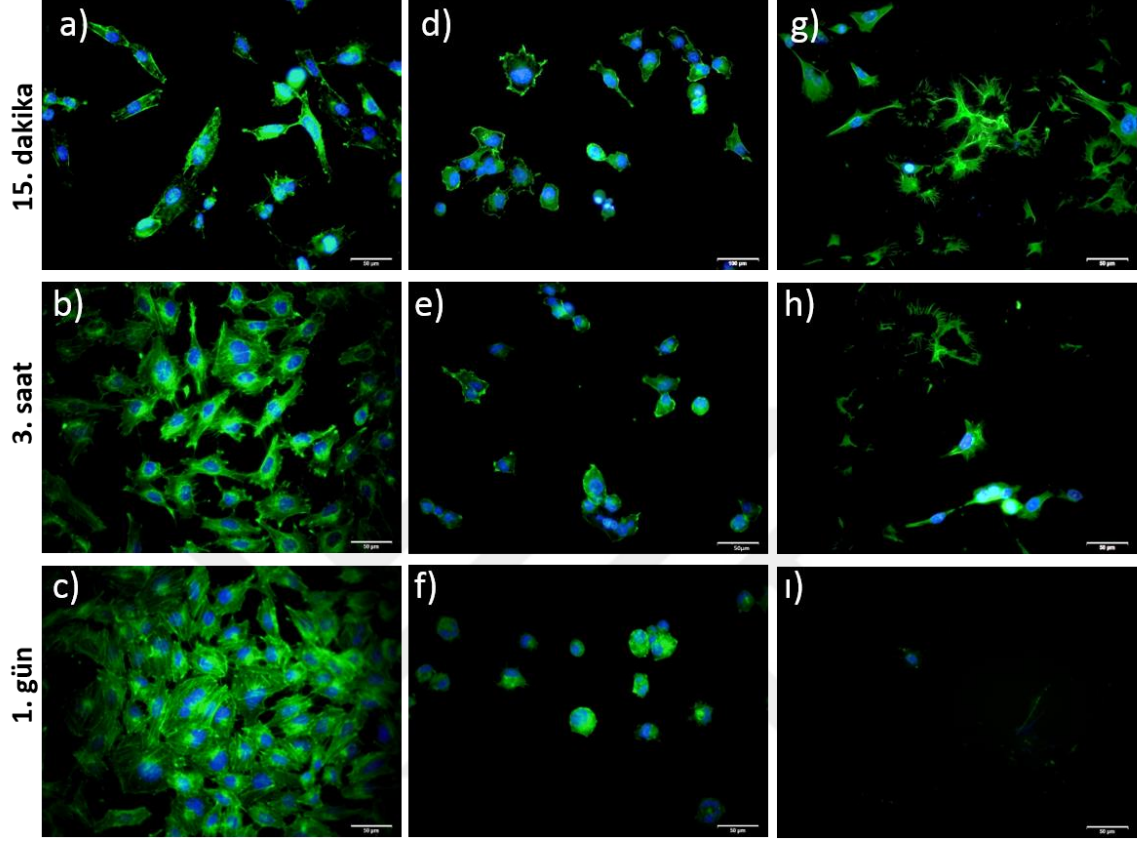


Şekil 4.21. Alexa Fluor (yeşil)/ DAPI (mavi) boyama görüntüleri (40x). a,b,c) MG-63 hücre hattı d,e,f) SAL_{2.73µg} g,h,i) (PLGA-SAL)_{0.20mg}

Nano boyutta olan PLGA nanopartiküllerin hücre membranından kolayca girerek içerisine enkapsüle olan SAL'i hücre içinde salması ve böylece hücre canlılığını kontrollü biçimde azaltabilmesi buna sebep olmaktadır [154]. Buna karşın SAL_{2.73µg} grubunda salinomisin sadece hücrelerin morfolojisinde değişime ve bozulmalara sebep olabildiği gözlenmiştir.

MG-63 osteosarkom hücre hattı üzerine etkileri incelenen SAL_{7.51µg} grubu ve bu gruba aynı miktarda salinomisin içeren (PLGA-SAL)_{0.55mg} nanopartikül grubunun kıyaslanması için yapılan Alexa Fluor/DAPI boyama görüntüleri Şekil 4.22.'de verilmiştir. Bu kıyaslama çalışması, Şekil 4.21.'de verilen (PLGA-SAL)_{0.20mg} nanopartikül ve SAL_{2.73µg} ilaveli gruplar ile yapılan çalışmalara benzer sonuçlar vermiştir. (PLGA-SAL)_{0.55mg} nanopartikül grubunda hücre membranları 15. dk'da dağılmış olup hücre çekirdekleri yok olmaya başlamıştır. Birinci günde yapılan uygulamanın sonuçlarında ise hücre canlılığına rastlanamamıştır. Buna karşın

SAL_{7.51µg} içeren gruplarda hücreler küresel forma gelerek morfoloji değiştirmiş ve canlılıklarında yeterli azalma gözlemlenmemiştir.

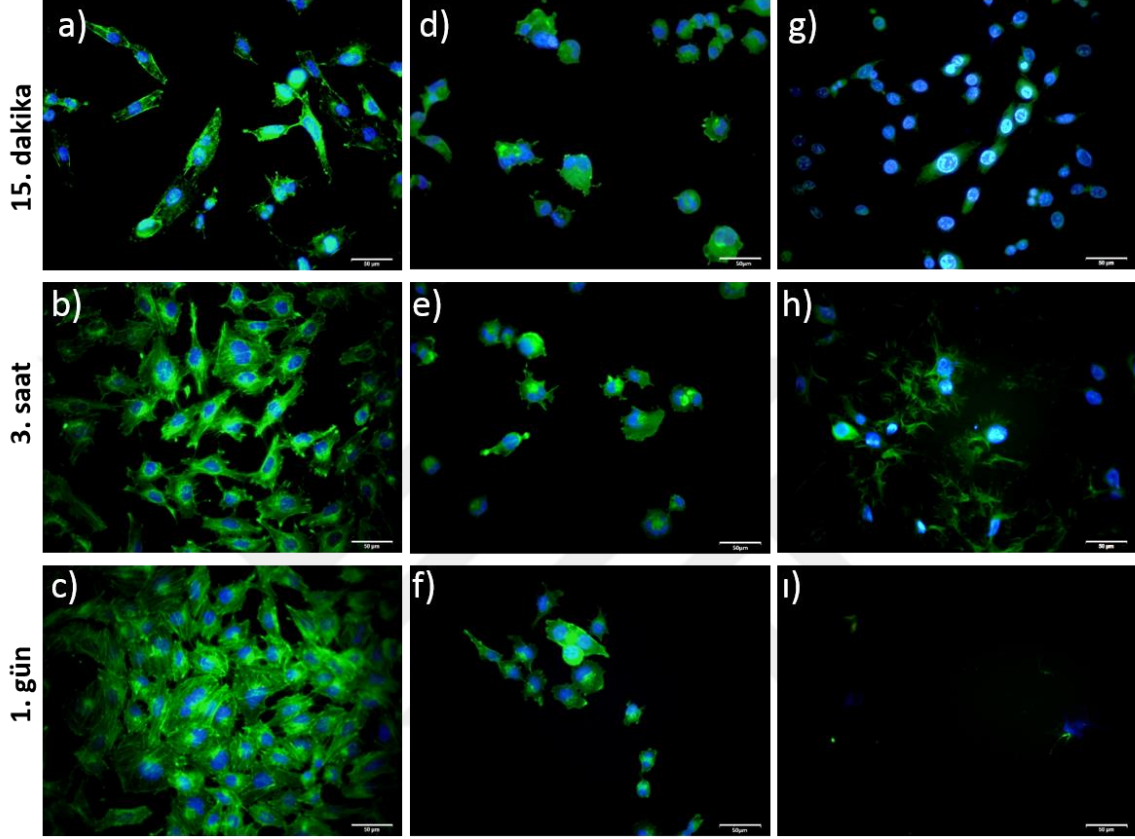


Şekil 4.22. Alexa Fluor (yeşil)/ DAPI (mavi) boyama görüntüleri (40x). a,b,c) MG-63 hücre hattı d,e,f) SAL_{7.51µg}, g,h,i) (PLGA-SAL)_{0.55mg}

SAL_{15.02µg} ve aynı miktarda salinomisin içeren (PLGA-SAL)_{1.10mg} nanopartikül gruplarının karşılaştırılması için yapılan bir diğer çalışmanın floresan mikroskop ile çekilen görüntüleri Şekil 4.23.'te verilmiştir. Bu çalışmadan, Şekil 4.21. ve Şekil 4.22.'de gösterilmiş olan sonuçlar ile benzer sonuçlar elde edilmiş olup aynı şekilde yorumlanmıştır.

Alexa Fluor/DAPI boyama ile MG-63 osteosarkom hücrelerinin canlılıkları ve morfolojilerindeki değişimi gözlemlemek üzere yapılan son çalışma; (PLGA-SAL)_{0.20mg} nanopartiküller, BnHAp ilaveli (PLGA-SAL)_{0.20mg} nanopartiküller ve nHAp ilaveli (PLGA-SAL)_{0.20mg} nanopartikül gruplarından hazırlanan görüntülerden oluşmaktadır. Şekil 4.24.'te görüldüğü üzere BnHAp ilaveli gruplarda hücre morfolojileri bozulmuş ancak; salinomisin etkinliğinin azalması nedeniyle hücre canlılığında artış gözlenmiştir. NanoHAp'ler daha önce de belirtildiği gibi MG-63 osteosarkom

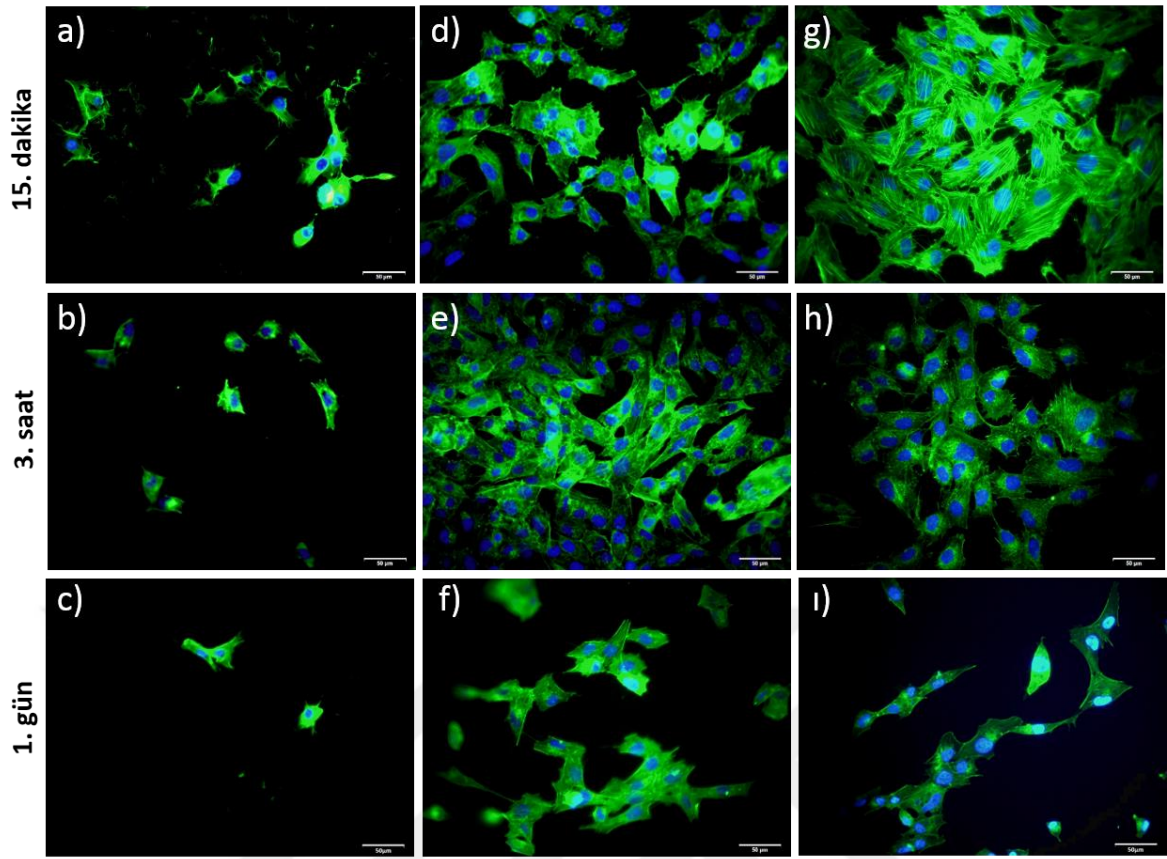
hücrelerinin proliferasyonunu pozitif yönde etkilemektedir. Bu sebeple; nHAp ilaveli gruplarda literatüre paralel olarak, salinomisin aktivitesinde düşüş ve hücre canlılığında artış görülmüştür [155].



Şekil 4.23. Alexa Fluor (yeşil)/ DAPI (mavi) boyama görüntüleri (40x). a,b,c) MG-63 hücre hattı d,e,f) SAL_{15.02µg}, g,h,i) (PLGA-SAL)_{1.10mg}

4.4.3.2. Kristal Viyole Boyama

MG-63 hücreleri üzerine etkileri incelenen (PLGA-SAL)_{0.20mg} nanopartikül grubu, 4. grup (g, h, i) ve 5. Grup (j, k, l) ile yapılan karşılaştırma çalışmaları için alınmış olan 15. dk, 3.saat ve 1. gün kristal viyole boyama görüntüleri Şekil 4.25.'te verilmiştir. Sonuçlarda da açık biçimde gözleendiği gibi nanopartiküller hücre membranlarından içeri çok iyi girebilmiştir. Hücre canlılığında 4. grupta azalma olmadığı gibi (PLGA-SAL)_{0.20mg} nanopartikül grubuna göre daha yüksek hücre canlılığı gözlemlenmiştir. Ayrıca nHAp ilaveli grupta da hücre canlılığı artmıştır.

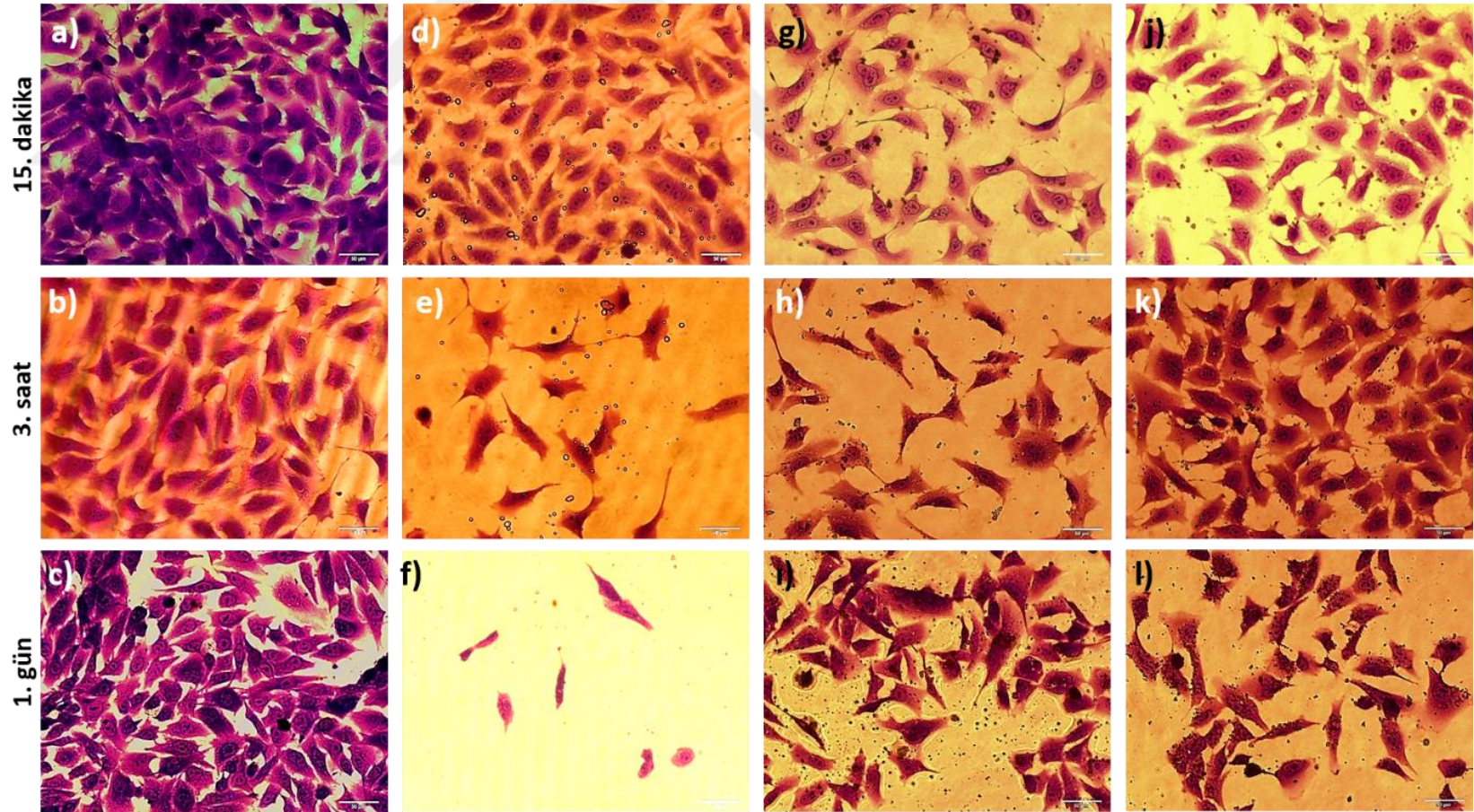


Şekil 4.24. Alexa Fluor (yeşil)/ DAPI (mavi) boyama görüntüleri (40x). a,b,c) (PLGA-SAL)_{0.20mg} d,e,f) (PLGA-SAL)_{0.20mg}/BnHAp g,h,i) (PLGA-SAL)_{0.20mg}/nHAp

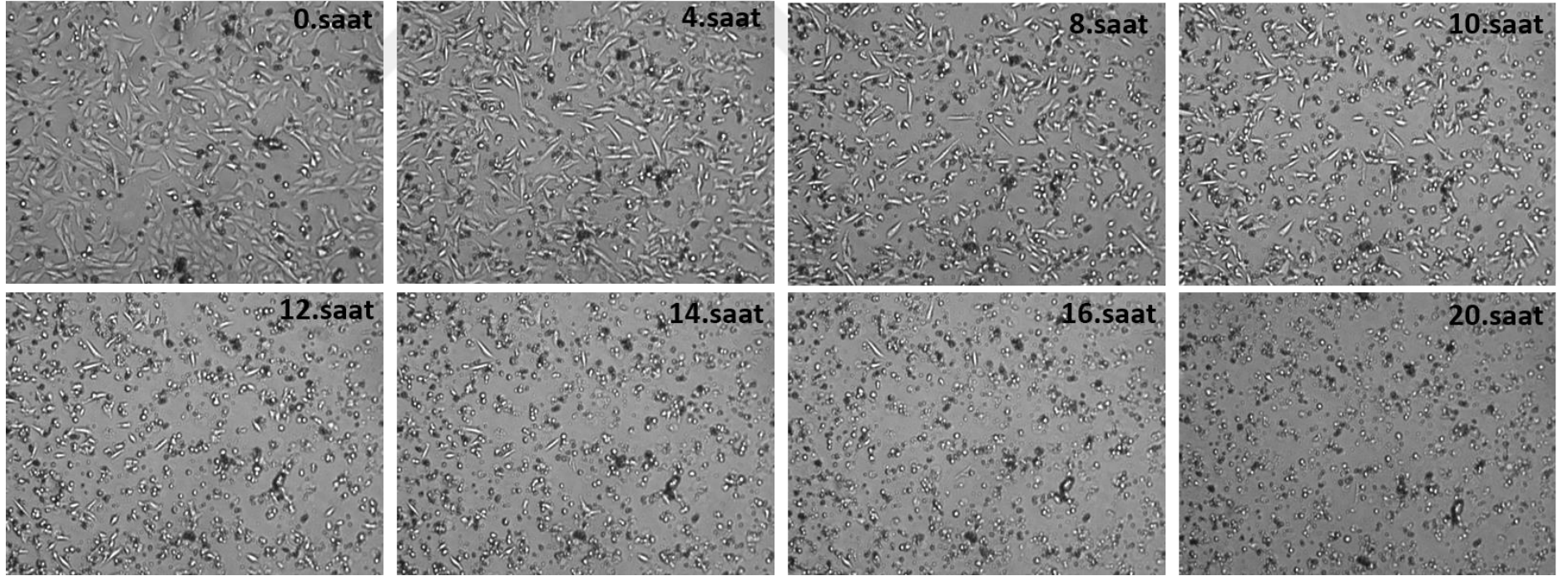
4.4.4. Hücre Morfolojisinde ve Yoğunluğundaki Değişimi Görüntüleme

Hücre morfolojisinde ve yoğunluğundaki değişimi incelemek amacıyla (PLGA-SAL)_{0.20mg} nanopartikül grubuna hücre sayım/görüntüleme cihazı ile görüntülemeler yapılmış ve sonuçlar Şekil 4.26.'da verilmiştir. Sonuçlardan da görüldüğü üzere 20.saat sonunda hücre canlılığı sona ermiş ve hücre morfolojileri küresel duruma gelmiştir.

Nanopartiküller ile yapılan hücre kültür çalışmalarından alınan sonuçlar ışığında; nanopartiküllerin hücre membranından girerek aktiflik gösterdiği ve MG-63 osteosarkom hücrelerini öldürdüğü gözlenmiştir. Nanopartiküller iskele yapısına katkılı iken membran içerisine alımı gerçekleşmeyeceği için kitosan/PLGA-SAL doku iskeleleri ile bir kültür çalışması yürütülmemiştir.



Şekil 4.25. Kristal Viyole boyama görüntüleri (40x). a,b,c) MG-63 hücre hattı d,e,f) (PLGA-SAL)_{0.20mg} g,h,i) (PLGA-SAL)_{0.20mg}/BnHAp j,k,l) (PLGA-SAL)_{0.20mg}/nHAp.

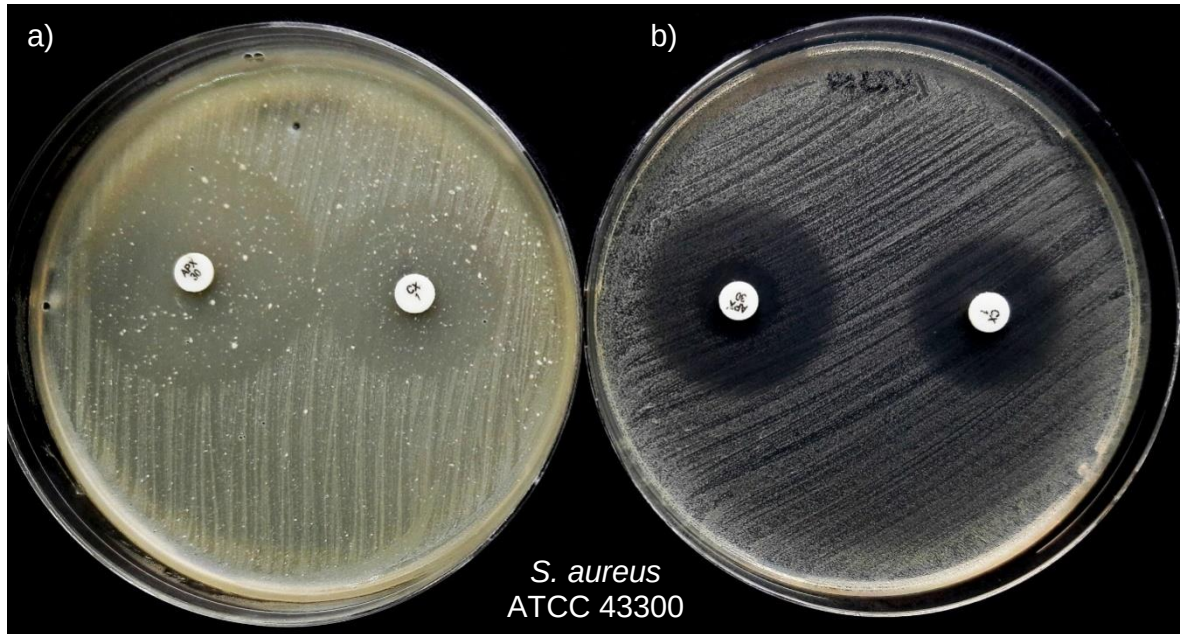


Şekil 4.26. Hücre morfolojisi ve yoğunluğundaki değişimi görüntüleme cihazı ile (PLGA-SAL)_{0.20mg} nanopartikül grubu için alınan görüntüler.

4.5. Bakteri Kültür Çalışmaları

Bakteri kültürü çalışmaları, *Staphylococcus aureus* (ATCC 25923), metisiline dirençli *Staphylococcus aureus* (MRSA - ATCC 43300) ve kontrol grubu olan metisiline duyarlı *Staphylococcus aureus* (MSSA - ATCC 29213) bakterileri ile yapılmıştır. Her biri 20 µL DPBS ile seyreltilen 5, 10, 20 ve 30 µg konsantrasyonlarında salinomisin çözeltisi yüklenen antibiyogram disklerin yanı sıra 19 farklı antibiyogram disk kullanılarak MRSA, MSSA ve *S. aureus* Gram pozitif bakteri suşları ekilmiş olup inhibisyon alanlarındaki değişimlerin incelenmesi yapılmıştır. Bakteri kültürü çalışmaları, disk difüzyon yöntemi (normal antibiyogram) , çift disk sinerji (panç) yöntemi ve agar dilüsyon yöntemi olmak üzere 3 farklı teknik kullanılarak yürütülmüştür.

Çalışmanın ilk basamağında, normal antibiyogram metodu ile antibiyogram disklerin standart inhibisyon alanları tespit edilmiştir. Sonraki basamakta, panç metodu ve agar dilüsyon metodu uygulanmış olup standart inhibisyon alanları göz önünde bulundurularak değerlendirmeler yapılmıştır. BnHAp varlığında yürütülen agar dilüsyon metodu sonucunda belirlenen inhibisyon alanlarının standart inhibisyon değerlerinden daha geniş olduğu görülmüş olup duyarlılık çapları Çizelge 4.5'te verilmiştir. BnHAp, antibiyogram disklerin etki bölgesini genişleterek inhibisyon alanlarında büyüme sağlamış ve antibakteriyel etkilerini arttırmıştır. *S. aureus* bakteri suşu kullanılarak uygulanan normal antibiyogram metodu ile agar dilüsyon metoduna ait örnek görüntüler Şekil 4.27., Şekil 4.28. ve Şekil 4.29.'da verilmiştir.



Şekil 4.27. APX ve CX antibiyogram diskleri ile yapılan a) agar dilüsyon ve b) normal antibiyogram yöntemleri.

Çizelge 4.5. Standart antibiyotikler ile birlikte BnHAp'ın ve sadece standart antibiyotiklerin antimikrobiyal etkinlikleri.

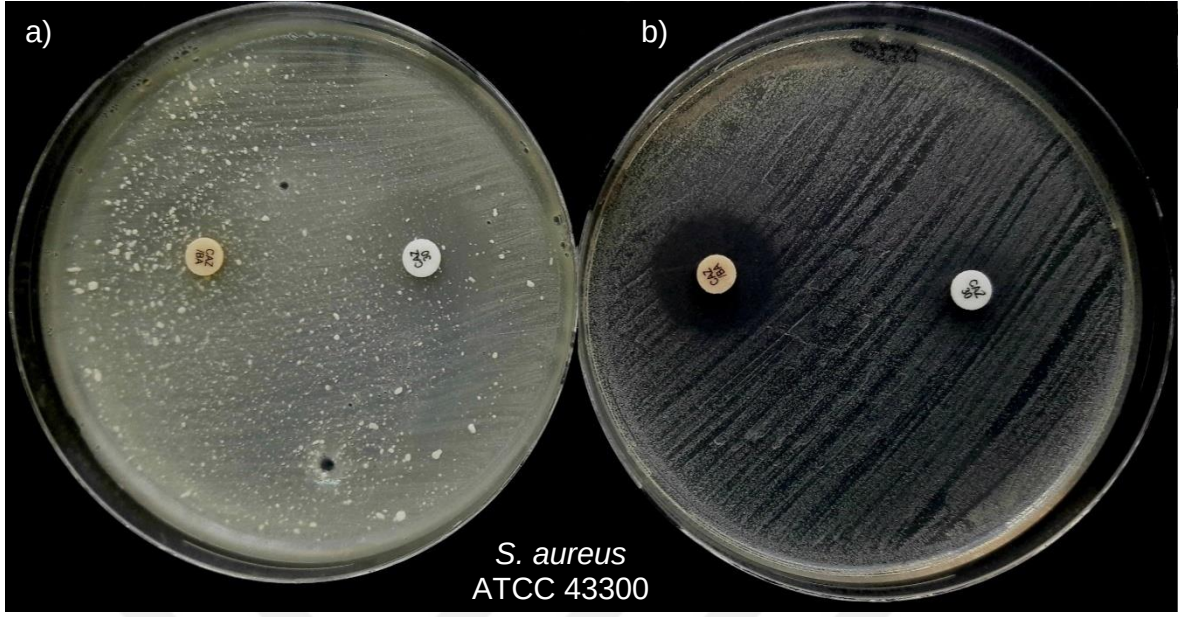
Standart Antibiyotikler ve BnHAp

Suşlar	Duyarlılık çapı (mm)																								
	AX	AMC	AM	CTX	CTX/BA	CTC	CTS	TCX	CTT	CAZ	CAZ/BA	CZC	TCA	CRO	CFC	CX	APX	CN	ME	VA	S5	S10	S20	S30	
<i>S. aureus</i> ATCC 25923	33	36	35	31	31	30	30	28	23	20	22	21	21	28	25	23	38	26	20	21	0	15	15	15	
<i>S. aureus</i> ATCC 43300	16	18	9	0	28	0	0	0	0	0	20	0	0	10	0	0	14	7	0	21	0	13	14	14	
<i>S. aureus</i> ATCC 29213	29	35	26	34	37	33	32	30	20	19	23	23	23	31	32	21	31	26	25	21	0	13	13	14	

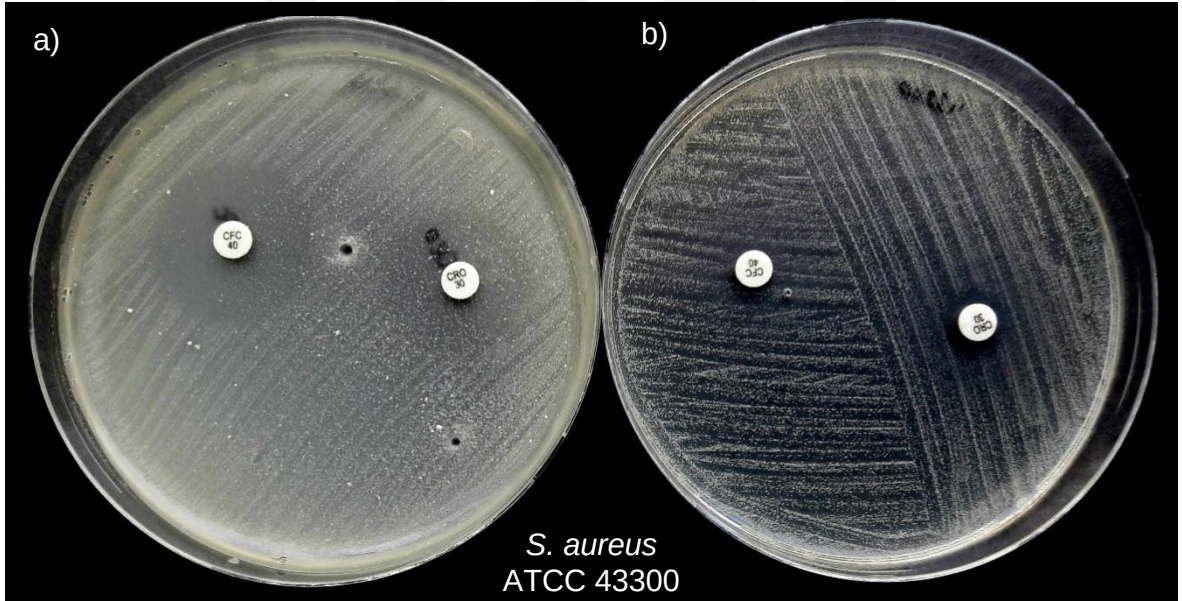
Standard Antibiyotikler

Suşlar	Duyarlılık çapı (mm)																							
	AX	AMC	AM	CTX	CTX/BA	CTC	CTS	TCX	CTT	CAZ	CAZ/BA	CZC	TCA	CRO	CFC	CX	APX	CN	ME	VA	S5	S10	S20	S30
<i>S. aureus</i> ATCC 25923	41	39	42	35	36	33	39	39	25	24	23	30	28	29	31	24	40	35	-	30	12	19	20	21
<i>S. aureus</i> ATCC 43300	18	20	14	30	30	25	28	24	0	22	24	22	18	25	28	25	38	0	-	28	0	14	15	22
<i>S. aureus</i> ATCC 29213	30	35	29	34	-	33	32	30	20	21	26	23	23	31	32	21	30	26	-	23	13	14	13	20

AX: Amoksisilin; AMC: Amoksisilin/Klavulanik asit; AM: Ampisilin; CTX: Sefotaksim; CTX/BA: Sefotaksim/Boronik asit; CTC: Sefotaksim/ Klavulanik asit; CTS: Sefotaksim/Sulbaktam; TCX: Sefotaksim/Tazobaktam; CTT: Sefotetan; CAZ: Seftazidim; CAZ/BA: Seftazidim/Boronik asit; CZC: Seftazidim/Klavulanik Asit; TCA: Seftazidim/Tazobaktam; CRO: Seftriakson; CFC: Seftriakson/Klavulanik asit; CX: Kloksasilin APX: Kloksasilin/Ampisilin; CN: Gentamisin; ME: Metisilin; VA: Vankomisin; S: Salinomisin.



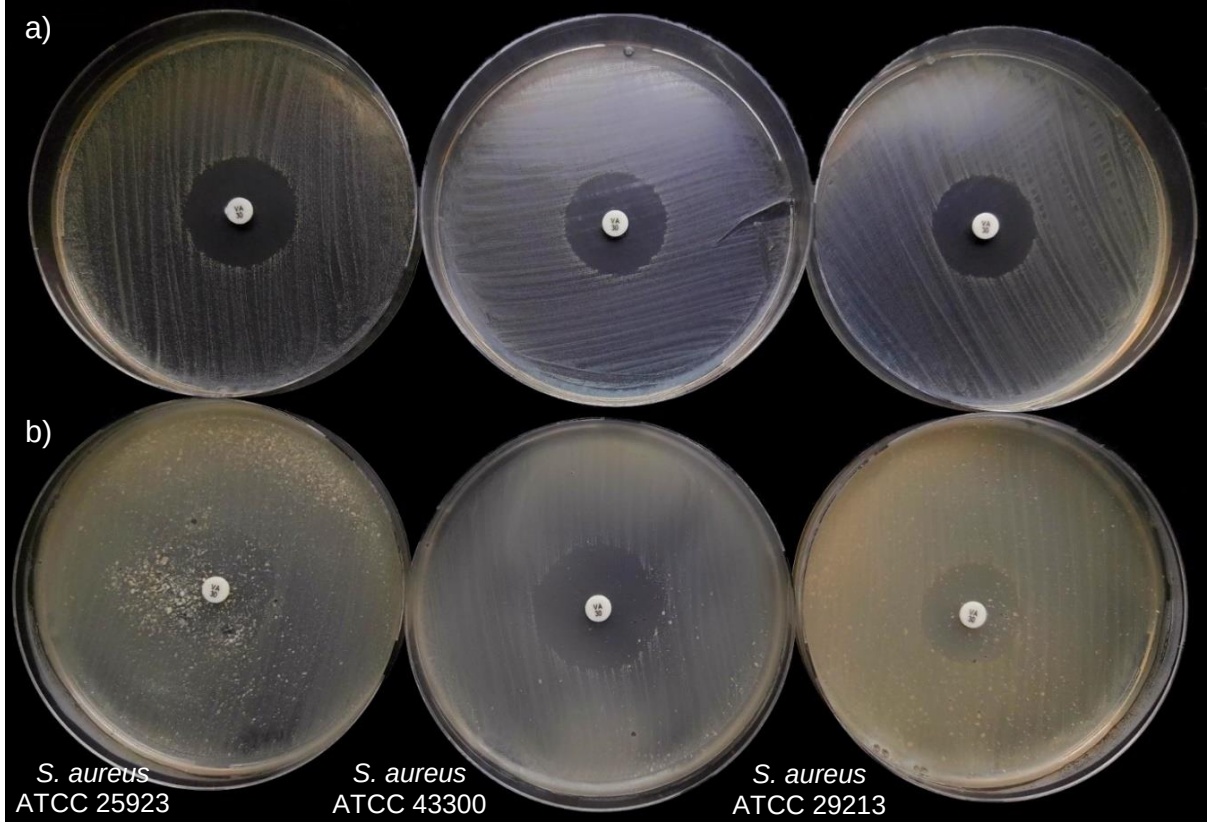
Şekil 4.28. CAZ ve CAZ/BA antibiyogram diskleri ile yapılan a) agar dilüsyon ve b) normal antibiyogram yöntemleri.



Şekil 4.29. CRO ve CFC antibiyogram diskleri ile yapılan a) agar dilüsyon ve b) normal antibiyogram yöntemleri.

Vankomisin antibiyogram diskinin inhibisyon alanları, üç farklı bakteri suşu kullanılarak uygulanan normal antibiyogram ve agar dilüsyon metodları ile gözlemlenmiş olup alınan sonuçlar Şekil 4.30.'da verilmiştir. Sonuçlar incelendiğinde; MRSA (ATCC 43300) ve *S. aureus* (ATCC 25923) bakteri suşlarında, agar dilüsyon

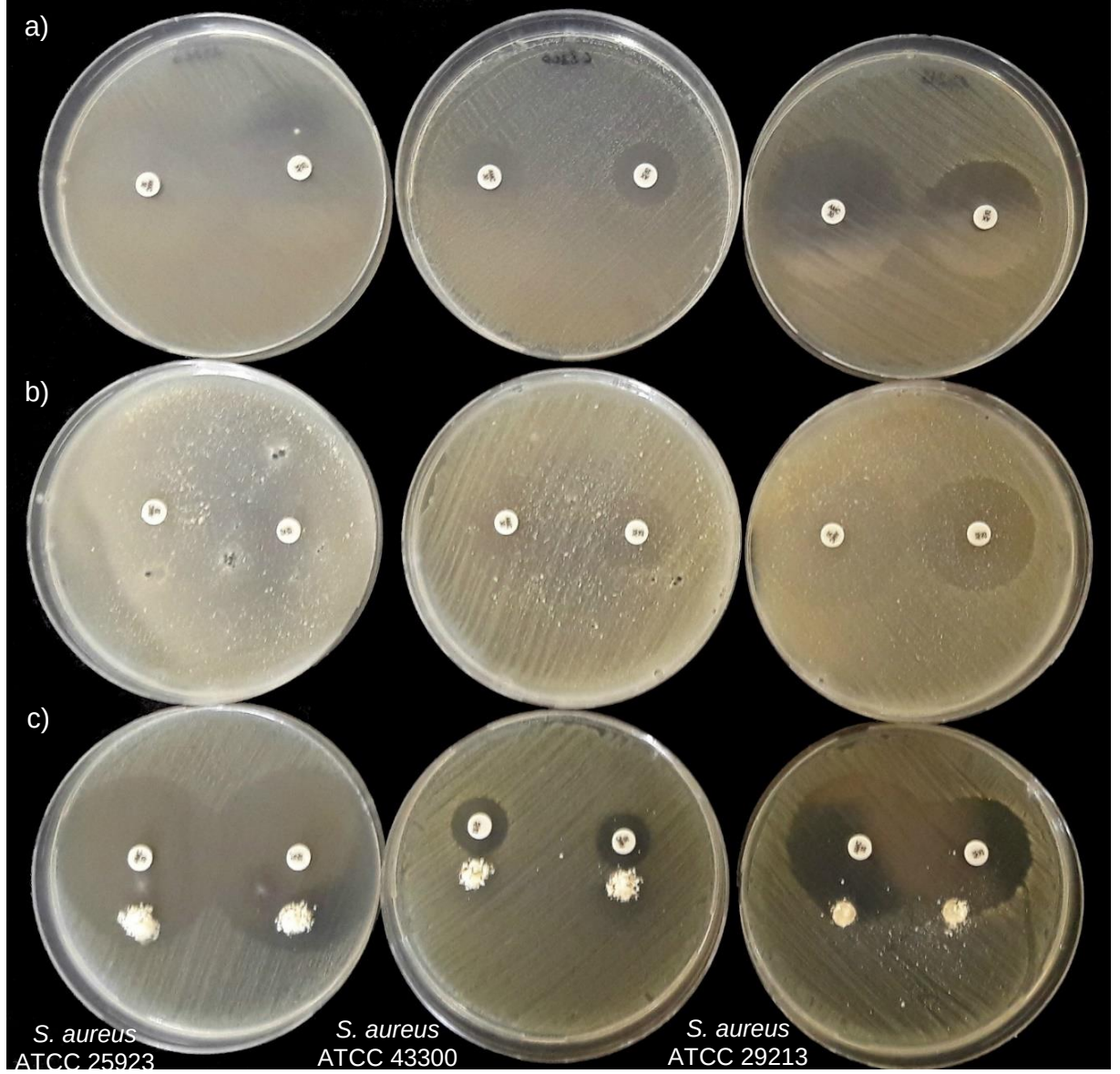
metodundaki inhibisyon alanlarının normal antibiyogram metodu inhibisyon alanlarına göre üçte bir büyüme gösterdiği belirlenmiştir. Agar dilüsyon metodunda agara karıştırılarak kullanılan BnHAp, antibiyogram diskler ile sinerjik etki göstermiştir. Bu sinerjik etkinin sonucunda antibakteriyel etki artmış olup antibiyogram disklerin inhibisyon alanları genişlemiştir. Çalışmada kontrol grubu olarak kullanılan MSSA (ATCC 29213) bakteri suşunda ise BnHAp katkısı ile inhibisyon alanı beklenen bir sonuç olarak önemli ölçüde değişmemiştir.



Şekil 4.30. VA antibiyogram diski kullanılarak üç farklı bakteri suşu ile yapılan a) normal antibiyogram ve b) agar dilüsyon yöntemleri.

Amoksisilin/klavulanik asit ve amoksisilin antibiyogram diskleri ile uygulanan normal antibiyogram, agar dilüsyon ve panç metodlarından alınan sonuçlar Şekil 4.31.'de verilmiştir. Sonuçlar incelendiğinde, *S. aureus* (ATCC 25923) ve *MRSA* (ATCC 43300) bakteri suşları ekili olan gruplarda agar dilüsyon ve panç metodlarındaki BnHAp varlığı ile standart inhibisyon alanlarından daha geniş alanlara ulaşılmıştır. Diğer bakteri suşu olan *MSSA* (ATCC 29213)'nın sonuçlarında ise inhibisyon alanlarında herhangi bir değişim olmamış sinerjik etki gözlenmemiştir. Bu sonuca göre, *S. aureus* (ATCC 25923) ve *MRSA* (ATCC 43300) bakteri suşları bulunan gruplarda, amoksisilin/klavulanik asit ve amoksisilin antibiyogram diskleri BnHAp ile sinerjik etki

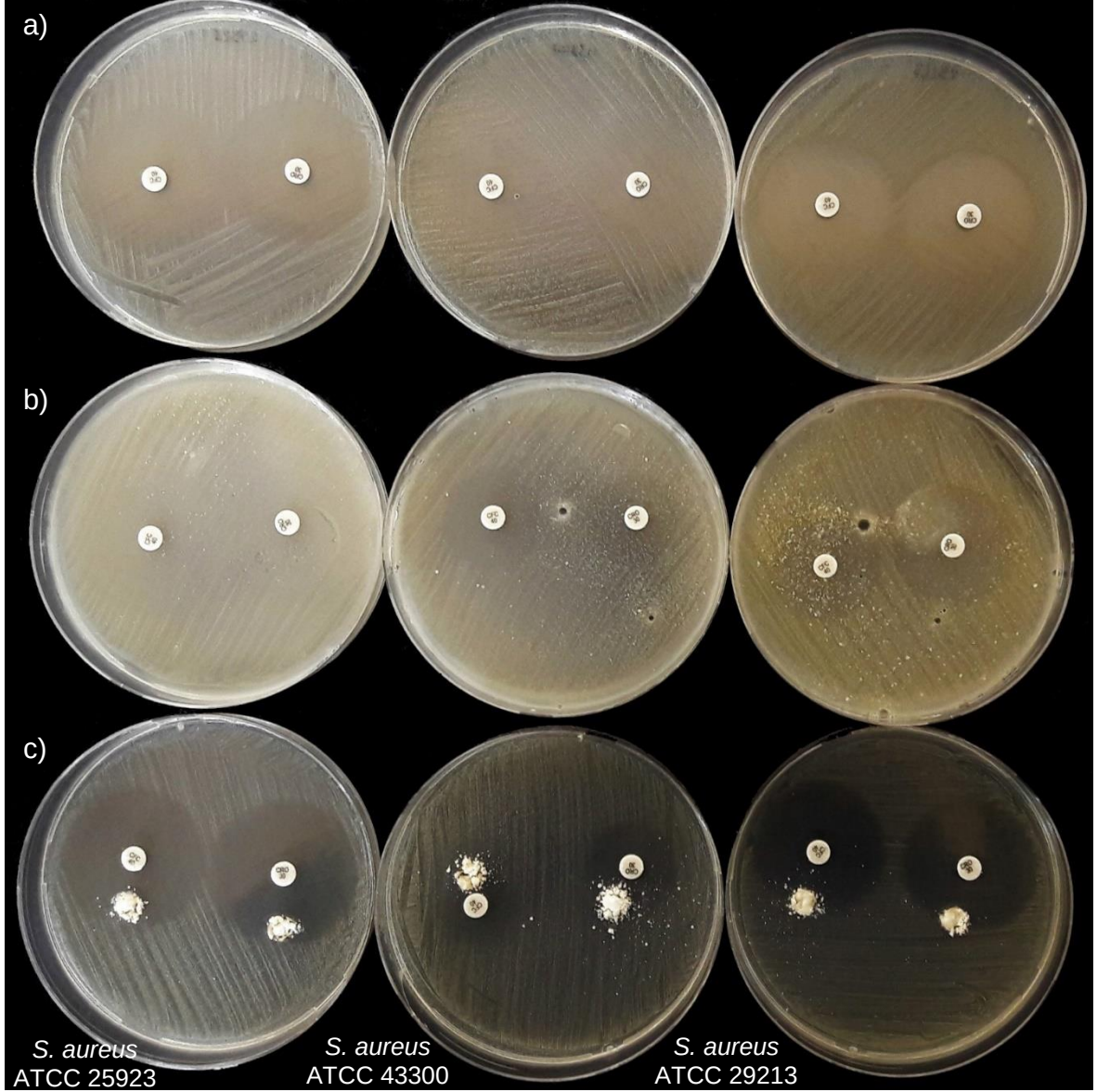
gösterek etki alanlarını arttırabilmektedir. Özellikle agar dilüsyon metodunda bu artış oldukça yüksektir.



Şekil 4.31. AMC ve AX antibiyogram diskleri ve üç farklı bakteri suşu ile yapılan a) normal antibiyogram, b) agar dilüsyon ve c) panç yöntemleri.

Seftriakson ve seftriakson/klavulanik asit antibiyogram diskleri ile uygulanan normal antibiyogram, agar dilüsyon ve panç metodlarından alınan sonuçlar Şekil 4.32.'de verilmiştir. Sonuçlar incelendiğinde, *S. aureus* (ATCC 25923) bakteri grubunda normal antibiyogram yöntemine kıyasla diğer iki metodta inhibisyon alanında az bir değişim gözlenirken *MRSA* (ATCC 43300) bakteri suşu ekili olan grupta bu fark çok yüksektir. *MRSA* (ATCC 43300) bakteri grubunda özellikle agar dilüsyon metodu örneklerinde ölçülen inhibisyon alanı çapları, normal antibiyogram yönteminde ölçülen sonuçları

ikiye katlamıştır. Panç metodunda ise normal antibiyogramda elde edilen inhibisyon alanı çaplarından daha yüksek ama yakın değerler okunmuştur. Diğer bakteri suşu olan MSSA (ATCC 29213) bakteri suşu sonuçlarında ise inhibisyon alanlarında herhangi bir değişim gözlenmemiştir.

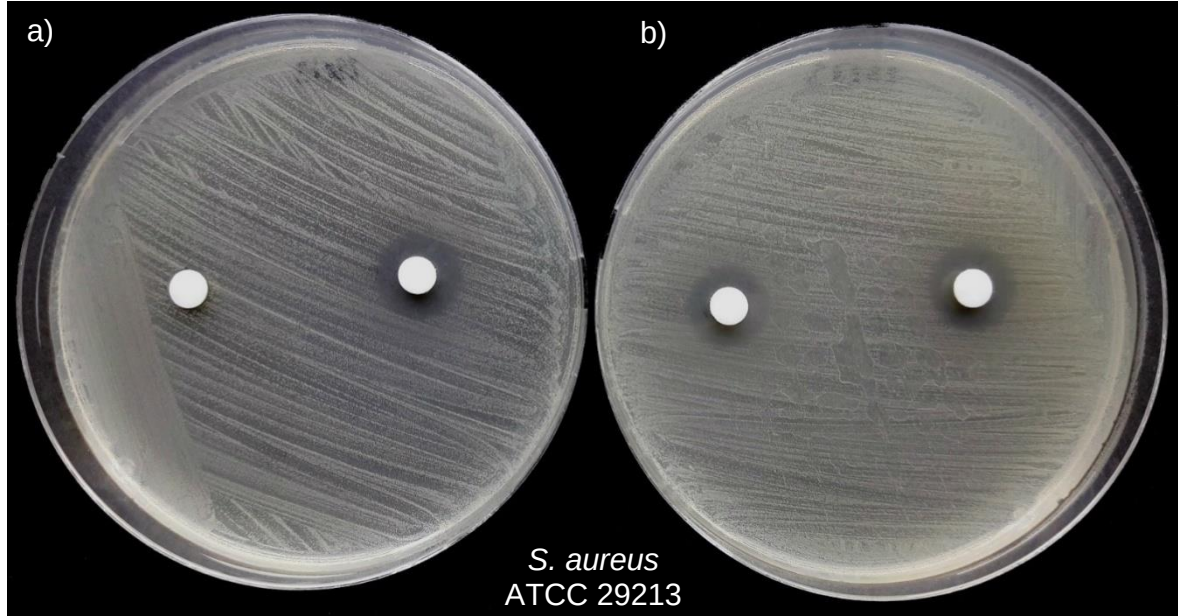


Şekil 4.32. CRO ve CFC antibiyogram diskleri ve üç farklı bakteri suşu ile yapılan a) normal antibiyogram, b) agar dilüsyon ve c) panç yöntemleri.

4.5.1. Salinomisin Yüklü Antibiyogram Diskler ile Bakteri Kültürü Çalışmaları

Farklı konsantrasyonlarda salinomisin yüklenen antibiyogram diskler ile yapılan bakteri kültürü çalışmaları yapılan tez çalışmasında önemli bir yer tutmaktadır. Üç farklı bakteri suşu ile yapılan bu uygulamalarda önceki bölümlerde olduğu gibi üç

teknik kullanılmıştır. Bunlar; disk difüzyon yöntemi (normal antibiyogram), çift disk sinerji (panç) yöntemi ve agar dilüsyon yöntemidir.



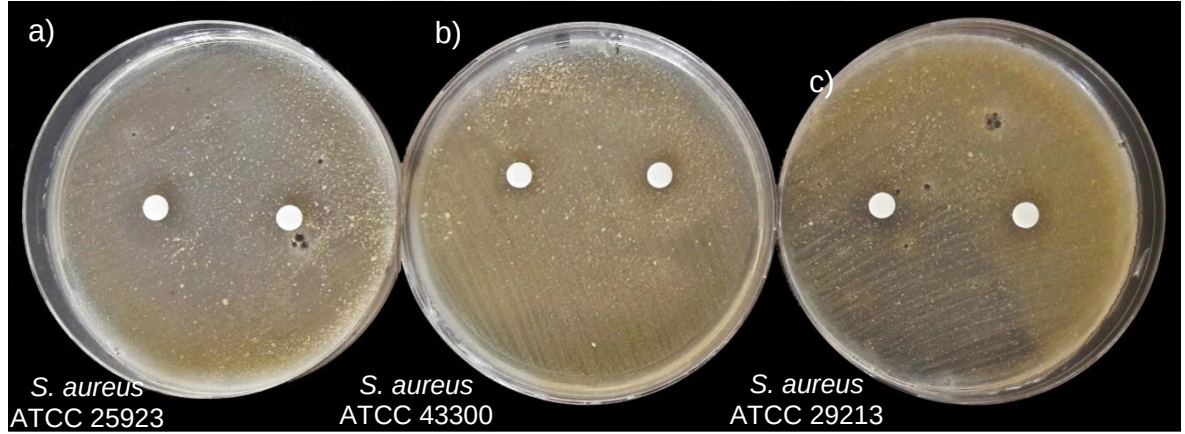
Şekil 4.33. Salinomisin yüklü antibiyogram diskler ile uygulanan normal antibiyogram yöntemi. Sırası ile her biri 20 µL DPBS ile seyreltilmiş olan a) 5 µg ve 30 µg b) 20 µg ve 10 µg salinomisin yüklü antibiyogram diskler.

Belirlenen konsantrasyonlarda seyreltilerek boş antibiyogram disklere yüklenen salinomisin ile *MRSA* (ATCC 43300) ve *MSSA* (ATCC 29213) ve *S. aureus* (ATCC 25923) bakteri suşlarının ekili olduğu gruplara normal antibiyogram yöntemi uygulanmıştır. Bu uygulamalara ait olan örnek bir görüntü Şekil 4.33.'te verilmiştir. Yapılan bu normal antibiyogram çalışması ile salinomisin antibiyogram disklerin standart inhibisyon alanı çapları ölçülmüştür. Her bir bakteri suşu için salinomisin antibiyogram disklerin inhibisyon alanlarına ait sonuçlar Çizelge 4.6.'da verilmiştir.

SAL20 ve SAL10 antibiyogram diskleri ile üç farklı bakteri suşu kullanılarak yapılan agar dilüsyon yönteminin görüntüleri Şekil 4.34.'te verilmiştir. Agar dilüsyon metodu ile ilk aşamada belirlenmiş olan normal antibiyogram inhibisyon alanı sonuçlarına göre daha geniş inhibisyon alanı çaplarına ulaşılabilmektedir. Özellikle *MRSA* (ATCC 43300) bakteri suşu ile yapılan incelemelerde BnHAp ile salinomisinin oluşturduğu sinerjik etki sonucu inhibisyon alanının diğer bakteri suşlarındakine oranla çok daha fazla artış gösterdiği gözlenmiştir.

Çizelge 4.6. Üç bakteri suşu ile salinomisin yüklü antibiyogram disklerle uygulanan disk difüzyon metodu sonuçları.

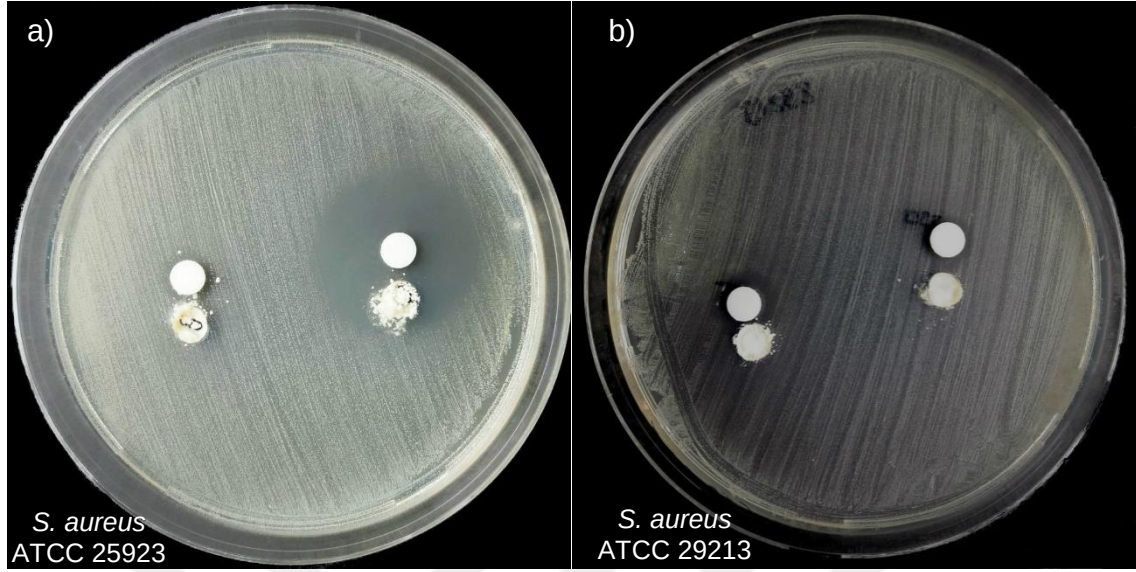
Salinomisin Konsantrasyonu (Her biri 20µL DPBS ile çözülmüştür.)	İnhibisyon Alanı Çapları (mm)		
	<i>S. aureus</i> (ATCC 25923)	<i>MRSA</i> (ATCC 43300)	<i>MSSA</i> (ATCC 29213)
5µg (SAL5)	0	0	0
10µg (SAL10)	15	13	13
20µg (SAL20)	15	14	13
30µg (SAL30)	16	14	14



Şekil 4.34. Salinomisin yüklü antibiyogram diskler ile üç farklı bakteri suşu kullanılarak yapılan agar difüzyon yöntemi. Her grupta (a, b, c) SAL20 (solda) ve SAL10 (sağda) antibiyogram diskler bulunmaktadır.

Örnek olarak Şekil 4.35.'te görüldüğü üzere SAL30 antibiyogram disk ile *S. aureus* (ATCC 25923) bakteri suşu kullanılarak uygulanan panç metodu, inhibisyon alanı çapında normal antibiyogramla kıyasla büyük bir artış sağlamıştır. Panç metodunda panç deliğinde bulunan BnHAp varlığında SAL30 aktivitesi artarak inhibisyon alanı çapı iki katına çıkmıştır. *S. aureus* (ATCC 25923) bakteri suşu ile normal antibiyogram yönteminde hiçbir inhibisyon alanı göstermeyen SAL5 antibiyogram diskinin inhibisyon alanında da panç metodu ile BnHAp varlığında az miktarda artış gözlenmiştir. *MRSA* (ATCC 43300) bakteri suşu için de sonuçlar *S. aureus* (ATCC 25923) ile tamamen aynıdır. Ancak; *MSSA* (ATCC 29213) bakteri suşu ile yapılan

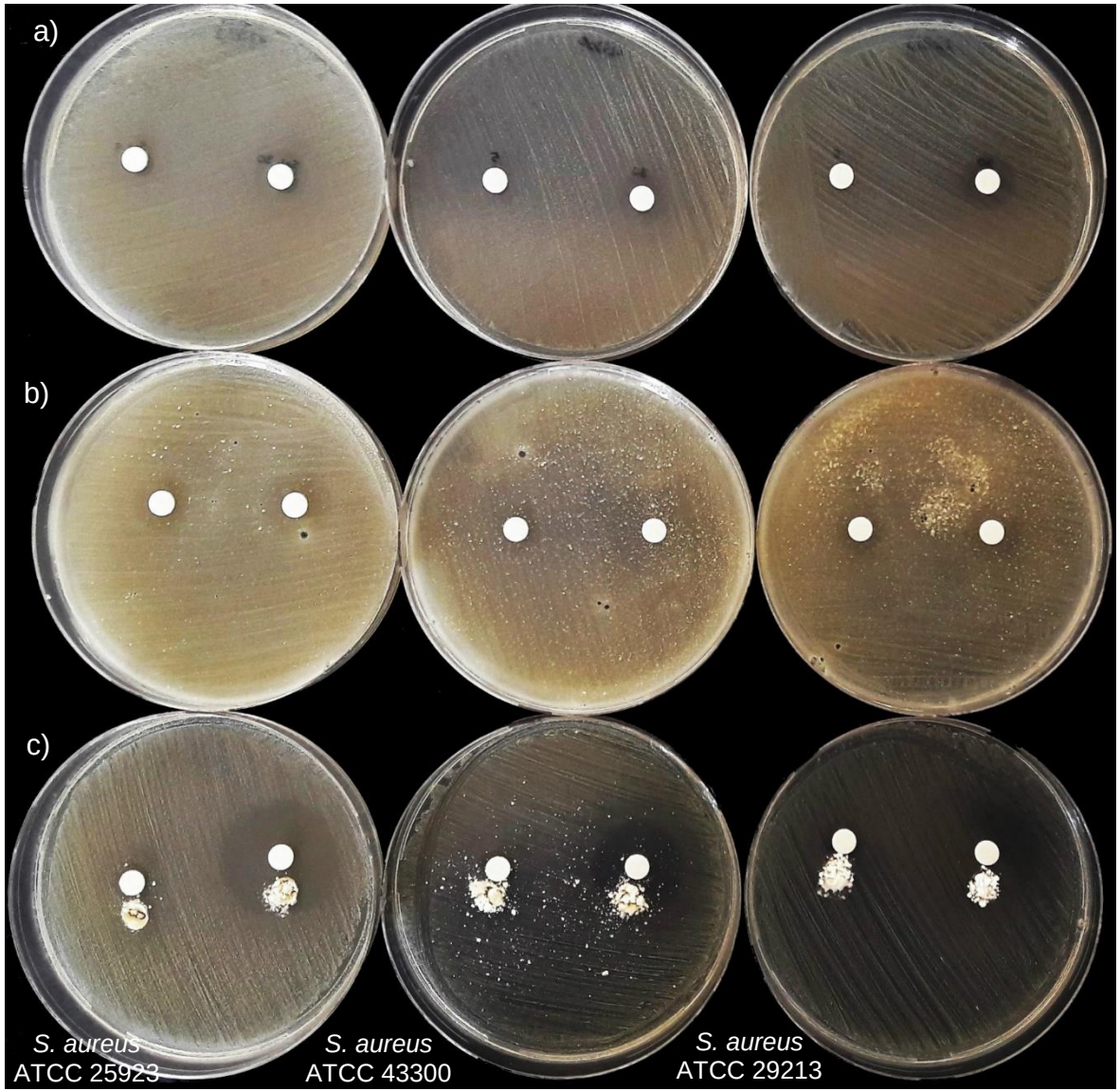
Çalışma sonuçlarına göre SAL30 antibiyogram diskinin inhibisyon alanında hiçbir değişim oluşmazken SAL5'te kaydadeğer bir artış yaşanmıştır.



şekil 4.35. Salinomisin yüklü antibiyogram diskler ile yapılan panç yöntemi. Sırası ile her grupta SAL5 ve SAL30 antibiyogram diskler bulunmaktadır.

Normal antibiyogram, agar dilüsyon ve panç yöntemleri SAL5, SAL10, SAL20 ve SAL30 antibiyogram diskleri ile 3 farklı bakteri suşu kullanılarak uygulanmış olup bakteri kültürü sonuçlarına ait örnek görüntüler şekil 4.36.'da gösterilmiştir. Bu uygulamaların sonuçlarına göre; üç yöntemden elde edilen sonuçlar kıyaslandığında en yüksek inhibisyon alanı değerleri agar dilüsyon metodunda alınmıştır. Agar dilüsyon metodunda uygulama öncesinde agarın yapısına karıştırılan BnHAp ile antibiyogram disk arasında bir sinerjik etki oluşarak antibiyogram disklerin etki alanı genişletilmiş olup antibakteriyel etkinlikleri arttırılmıştır. Panç metodu sonuçlarında ölçülen inhibisyon alanı sonuçları da yine aynı şekilde BnHAp varlığında oluşan sinerjik etki nedeniyle normal antibiyogram yönteminde okunan inhibisyon alanı değerlerinden önemli derecede fazladır.

Yapılan tüm bakteri kültür uygulamaları değerlendirildiğinde BnHAp, salinomisin ile sinerjik etki oluşturarak salinomisin yüklü antibiyogram disklerin inhibisyon alanlarını standart değerin üzerine taşımıştır. Özellikle agar dilüsyon metodunda BnHAp agarın içerisine homojen olarak dağıtılarak kültür uygulaması yapılması sinerjik etkinin artması açısından avantaj sağlayarak 3 yöntem arasında en yüksek inhibisyon alanlarına ulaşılabilmesine olanak vermiştir.



Şekil 4.36. Salinomisin yüklü antibiyogram diskler ile üç farklı bakteri suşu kullanılarak yapılan a) normal antibiyogram (üstte), b) agar dilüsyon (ortada) ve c) panç (altta) metodları. Her grupta sırası ile SAL5 ve SAL30 antibiyogram diskler bulunmaktadır.

5. GENEL SONUÇLAR

Sunulan tez kapsamında, osteosarkom tedavisine yönelik olarak salinomisin ve bor katkılı nanohidroksiapatitlerin (BnHAp) bir arada kullanılması ile ortaya çıkan etkiler incelenmiştir. Bu amaçla; antikanserojen ve antibakteriyel bir ilaç olan salinomisin yüklü poli (laktik-ko-glikolik asit) (PLGA-SAL) nanopartiküller sentezlenmiş, *in vitro* salım çalışmaları yürütülmüş, PLGA-SAL nanopartiküller ve BnHAp valığında MG-63 osteosarkom hücreleri ile hücre kültür çalışmaları gerçekleştirilmiş ve son olarak salinomisin yüklenen antibiyogram disklerle BnHAp bir arada kullanılarak *Staphylococcus aureus* (ATCC 25923), metisiline dirençli *Staphylococcus aureus* (MRSA - ATCC 43300) ve metisiline duyarlı *Staphylococcus aureus* (MSSA - ATCC 29213) bakterileri kullanılarak bakteri kültür çalışmaları yapılmıştır. Tüm çalışmalar sonucunda elde edilen genel sonuçlar aşağıda özetlenmiştir.

- Poli (laktik-ko-glikolik asit) (PLGA) kopolimerinin seçiminde, nanopartiküllere enkapsüle edilecek olan salinomisin hidrofobik yapıda bir ilaç olduğu için poli (laktik asit)/ poli (glikolik asit) (PLA/PGA) bileşimi 65:35 olarak tercih edilerek kopolimerin içeriğinde PLA'nın hidrofobik özelliğinin yüksek olması istenmiştir. Emülsiyon hazırlama – çözücü buharlaştırma yöntemi ile hem boş hem de %2.5 (w/v) ilaç konsantrasyonuna sahip salinomisin yüklü PLGA nanopartiküller sentezlenmiştir. Küresel formda ve ortalama çapı 187 nm olan PLGA-SAL nanopartiküller elde edilmiştir. Nanopartiküllerin karakterizasyonları taramalı elektron mikroskop (SEM) ve Zetasizer ile yapılmıştır. PLGA-SAL nanopartiküllerin enkapsülasyon verimleri ortalama 97.4 ± 1.87 bulunmuştur.
- PLGA nanopartiküllerden salinomisin salım çalışması *in vitro* ortamda 45 gün boyunca sürdürülmüştür. Bu salım çalışmasının ilk 1 saatinde salinomisinin %43'ü ani patlama ile salınmıştır. Ardından kontrollü ve düzenli biçimde salım devam etmiş ve 45 günde %100'e ulaşmıştır.
- Kitosan doku iskeleleri dondurarak kurutma cihazı ile üretilmiştir. Salinomisin yüklü nanopartiküller, yapıya katma ve emdirme tekniği olmak üzere iki farklı şekilde 6x1 mm boyutlarda hazırlanan kitosan iskelelere katılanmıştır. Kitosan ve kitosan/SAL doku iskelelerinin karakterizasyonu SEM analizi ile yapılmıştır. İskeleden salım çalışmaları her iki grup için de başlatılmış olup emdirilen iskele salımından alınan dengesiz veriler sonucu, salım çalışmalarına sadece ilacın

yapıya katıldığı grup ile devam edilmiştir. Yapısına PLGA-SAL nanopartiküller ve BnHAp ilave edilerek üretilen kitosan iskelelerden salımın 1. gününde ani patlama etkisi ile ilacın %44'ü salınmış ve %100 salım yaklaşık olarak 59 gün sürmüştür.

- Nanopartiküllerin ve iskelelerin salinomisin salım kinetikleri incelendiğinde her ikisinin de Hixson-Crowell salım kinetik modeline uygun olduğu belirlenmiştir.
- Hücre kültür çalışmaları; nanopartiküllere yüklenmiş olan salinomisin MG-63 osteosarkom hücre hattı üzerine etkilerinin incelenmesi ve doz belirleme çalışmaları ile PLGA-SAL nanopartiküllerin ayrı ayrı BnHAp ve nHAp varlığında MG-63 hücre hattı üzerindeki etkilerin kıyaslanması olmak üzere iki kısım şeklinde yürütülmüştür.
- Hücre kültür çalışmaları süresince optik mikroskopla görüntüleme, canlı-ölü boyama analizi, Alexa Fluor/DAPI boyama ve Kristal viyole boyama yapılmıştır. Canlı ölü boyama analizi sonuçlarına göre canlı ve ölü hücre sayımı yapılarak yüzde canlılıklar hesaplanmıştır. Ayrıca sentezi sırasında FITC (Floresan izotiyosiyanat) katkılanan PLGA-SAL nanopartiküllerin hücre içine alımları incelenerek floresan mikroskop ile görüntülenmiştir.
- Kültür çalışmalarının ilk aşamasında; 0.15 mg, 0.20 mg, 0.55 mg ve 1.10 mg PLGA-SAL nanopartikül grupları oluşturularak MG-63 osteosarkom hücre hattı üzerindeki etkileri tespit edilmiştir. Kontrol grubu olarak boş PLGA nanopartiküllere yer verilmiştir. Analiz sonuçları ışığında 0.20 mg PLGA-SAL nanopartikül (PLGA-SAL)_{0.20mg} içeren grup optimum değer olarak belirlenmiştir. Optimum değer belirlenirken; (PLGA-SAL)_{0.15mg} nanopartikülleri ile yapılan çalışmada hücre canlılığının istenenden yüksek olması (PLGA-SAL)_{0.55mg} ve (PLGA-SAL)_{1.10mg} gruplarında ise MG-63 hücrelerinde ani ölümlerin yaşanması, hücre çeperi dağılırken çekirdeklerin canlı kalması gibi sonuçların gözlemlenmesi göz önünde bulundurulmuştur. Ayrıca boş PLGA nanopartiküllerin canlılık oranları incelenerek kontrol grubu olan sadece MG-63 hücreleri ekili grup ile kıyaslandığında partiküllerin MG-63 osteosarkom hücreleri üzerinde herhangi bir toksik etki yaratmadıkları görülmüştür. Hücre kültür çalışmalarının ilk aşamasında son olarak; (PLGA-SAL)_{0.20mg}, (PLGA-SAL)_{0.55mg} ve (PLGA-SAL)_{1.10mg} gruplarının içerdiği salinomisine eşdeğer miktarda boş salinomisin (sırasıyla 2.73 µg, 7.51 µg ve 15.02 µg) içeren gruplar oluşturularak karşılaştırma yapılmıştır. Yapılan incelemeler ile kültür

ortamında MG-63 hücrelerine boş salinomisin gönderilen gruplarda hücre canlılıklarında beklenen düşüşün olmadığı sadece hücrelerin morfolojilerinde bozulmaların meydana geldiği görülmüştür. Salinomisinin nanopartiküle enkapsüle edilerek kültür ortamına gönderildiği gruplarda, nanopartiküllerin kolay hücre içine alım özellikleri avantaj yaratmıştır.

- Hücre kültür çalışmalarının ikinci aşamasında, PLGA-SAL grupları ile BnHAp ve nHAp ilaveli gruplar arasında ayrı ayrı kıyaslamalar yapılmıştır. Her bir grup incelendiğinde nanohidroksiapatitin MG-63 hücreleri üzerindeki proliferasyonu destekleyici özelliği nedeniyle içerisine katılan bor, salinomisin ile sinerjik etki gösterememiştir. Hem BnHAp hem de nHAp ilaveli grupların hücre canlılıklarında sadece PLGA-SAL gruplarına göre artış tespit edilmiştir. Hücre canlılığındaki bu artışların kontrol grubu olan boş PLGA nanopartiküller ile kıyaslandığında da daha yüksek olması hidroksiapatitin MG-63 hücreleri üzerinde pozitif yönde etkinlik gösterdiğini desteklemektedir.
- Bakteri kültür çalışmaları; *S. aureus*, *MRSA* ve kontrol grubu olan *MSSA* ile farklı konsantrasyonlarda salinomisin yüklü antibiyogram diskler ve BnHAp varlığında yürütülmüştür. Bakteri kültür çalışmalarının ilk basamağında, disk difüzyon metodu ile 19 standart antibiyogram disk ve beraberlerinde her biri 20 µL DPBS ile çözülüp seyreltilerek hazırlanan 30 µg, 20 µg, 10 µg ve 5 µg derişimlerinde salinomisin yüklü antibiyogram disklerin inhibisyon alanları incelenmiştir. Böylece Gram-pozitif bakterilere karşı antibakteriyel etkilere sahip bir ilaç olan salinomisinin farklı derişimlerde 3 farklı bakteri suşuna karşı sergilediği standart inhibisyon alanları belirlenmiştir.
- Bakterilerle yürütülen çalışmaların ikinci basamağında ilk olarak, antibiyogram diskler ile agara katılanmış BnHAp kullanılarak agar dilüsyon metodu çalışılmıştır. Sonuçlar incelendiğinde, salinomisin ve BnHAp'ın sinerjik etki göstererek antibiyogram disklerin inhibisyon alanlarını standart alanlarına göre genişletmekte ve etki alanlarını arttırmakta olduğu görülmüştür. Son olarak; bakteri kültüründe panç metodu yürütülmüş ve sonucunda antibiyogram disklerin inhibisyon alanlarının agarda BnHAp bulunan noktaya doğru genişlediği gözlenmiştir. Salinomisin ve BnHAp, bakteri kültür çalışmalarında çok iyi sinerjik etki göstermiştir.

Sonuç olarak tez kapsamında, MG-63 osteosarkom hücreleri üzerinde salinomisin yüklü ve boş PLGA nanopartiküllerin etkileri hem yalnız hem de BnHAp ve nHAp

varlığında incelenmiştir. Salinomisinin MG-63 osteosarkom hücreleri üzerinde çok iyi antikanserojen etki gösterdiği fakat nanopartiküle katkılanarak kullanılan bor ile sinerjik davranış sergilemediği gözlenmiştir. Yürütülen bakteri kültür çalışmalarında disk difüzyon, agar dilüsyon ve panç metodu ile çalışılmış olup *S. aureus*, *MRSA*, ve kontrol grubu olan *MSSA* bakteri suşları üzerinde salinomisinin antibakteriyel etkisi görülmüştür. Aynı zamanda BnHAp ve salinomisin sinerjik davranış sergilemiş, salinomisinin bakteriler üzerindeki etki alanı genişlemiştir.



KAYNAKLAR

- [1] Atala, A., Tissue engineering and regenerative medicine: concepts for clinical application, *Rejuvenation Research*, 7, 15-31, **2004**.
- [2] Beşkardeş, I.G., Hayden, R. S., Glettig, D. L., Kaplan, D. L., Gümüşderelioğlu, M., Bone tissue engineering with scaffold-supported perfusion co-cultures of human stem cell-derived osteoblasts and cell line-derived osteoclasts, *Process Biochemistry*, **2016**.
- [3] Langer, R., Biomaterials for drug delivery and tissue engineering, *MRS Bulletin*, 31, 477-485, **2006**.
- [4] Hosseinkhani, H., Hosseinkhani, M., Gabrielson, N. P., Pack, D. W., DNA nanoparticles encapsulated in 3D tissue-engineered scaffolds enhance osteogenic differentiation of mesenchymal stem cells, *Journal of Biomedical Materials Research Part A*, 85, 47-60, **2008**.
- [5] Place, E. S., Evans, N. D., Stevens, M. M., Complexity in biomaterials for tissue engineering, *Nature Materials*, 8, 457-470, **2009**.
- [6] Saravanan, S., Leena, R., Selvamurugan, N., Chitosan based biocomposite scaffolds for bone tissue engineering, *International Journal of Biological Macromolecules*, 93, 1354-1365, **2016**.
- [7] Couvreur, P., Nanoparticles in drug delivery: past, present and future, *Advanced Drug Delivery Reviews*, 65, 21-23, **2013**.
- [8] Çakmak, S., Çakmak, A. S., Gümüşderelioğlu, M., PNIPAAm - grafted thermoresponsive microcarriers: Surface-initiated ATRP synthesis and characterization, *Materials Science and Engineering: C*, 33, 3033-3040, **2013**.
- [9] Xia, Y., Pack, D. W., Uniform biodegradable microparticle systems for controlled release, *Chemical Engineering Science*, 125, 129-143, **2015**.
- [10] Gümüşderelioğlu, M., Doku mühendisliğinde nanoteknoloji. Bilim ve Teknik: Yeni Ufuklara, 1-12, **2007**.
- [11] Makadia, H. K., Siegel, S. J, Poly lactic-co-glycolic acid (PLGA) as biodegradable controlled drug delivery carrier, *Polymers*, 3, 1377-1397, **2011**.
- [12] Ojo, O. O., Bhadauria, S., Rath, S. K., Dose-dependent adverse effects of salinomycin on male reproductive organs and fertility in mice, *Plos One*, 8, **2003**.
- [13] Kaplan, F., Salinomisinin insan over kanseri hücre serisi (ovcar-3) üzerine olan apoptotik ve sitotoksik etkilerinin araştırılması, Yüksek Lisans Tezi, Ankara Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü, Ankara, **2014**.
- [14] Zhou, S., Wang, F., Wong, E., Fonkem, E., Hsieh, T., Salinomycin: a novel anti-cancer agent with known anti-coccidial activities, *Current Medicinal Chemistry*, 20, 4095-4101, **2013**.
- [15] Ni, M., Xiong, M., Zhang, X., Cai, G., Chen, H., Zeng, Q., Yu, Z., Poly (lactic-co-glycolic acid) nanoparticles conjugated with CD133 aptamers for targeted salinomycin delivery to CD133+ osteosarcoma cancer stem cells, *International Journal of Nanomedicine*, 10, 2537-2554, **2015**.
- [16] Ratner, B.D., Hoffman, A. S., Schoen, F. J., Lemons, J. E., Biomaterials science: An introduction to materials in medicine, *Mrs Bulletin*, 31, 59-60, **2006**.

- [17] 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**.
- [18] Warnke, P., Wiltfang, J., Eufinger, H., Wehmöller, M., Russo, P., Bolte, H., Growth and transplantation of a custom vascularised bone graft in a man, *The Lancet*, 364, 766-770, **2004**.
- [19] Schimming, R., Schmelzeisen, R., Tissue-engineered bone for maxillary sinus augmentation, *Journal of Oral and Maxillofacial Surgery*, 62, 724-729, **2004**.
- [20] Barrère, F., Blitterswijk, C.A., Groot, K., Bone regeneration: molecular and cellular interactions with calcium phosphate ceramics, *International Journal of Nanomedicine*, 1, 317-332, **2006**.
- [21] Stevens, M.M., Biomaterials for bone tissue engineering, *Materials today*, 11, 18-25, **2008**.
- [22] O'brien, F.J., Biomaterials & scaffolds for tissue engineering, *Materials Today*, 14, 88-95, **2011**.
- [23] Gümüşderelioğlu, M., Aday, S., Heparin-functionalized chitosan scaffolds for bone tissue engineering, *Carbohydrate research*, 346, 606-613, **2011**.
- [24] Bonassar, L.J., Vacanti, C.A., Tissue engineering: the first decade and beyond, *Journal of Cellular Biochemistry*, 72, 297-303, **1998**.
- [25] Çakmak, S., Kemik Doku Onarımı İçin Hidroksiapatit Peptit Amfifil Bazlı Nanokompozit Doku İskelelerinin Geliştirilmesi, Hacettepe Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü, Ankara, **2015**.
- [26] Mavis, 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**.
- [27] Liao, S., Chan, C. K., Ramakrishna, S., Stem cells and biomimetic materials strategies for tissue engineering, *Materials Science and Engineering: C*, 28, 1189-1202, **2008**.
- [28] Hutmacher, D.W., Scaffold design and fabrication technologies for engineering tissues—state of the art and future perspectives, *Journal of Biomaterials Science*, 12, 107-124, **2001**.
- [29] Akman, A.C., Tıǧlı, R. S., Gümüşderelioğlu, M., BFGF-loaded HA-chitosan: A promising scaffold for periodontal tissue engineering, *Journal of Biomedical Materials Research Part A*, 92, 953-962, **2010**.
- [30] Hench, L.L., Bioactive materials: the potential for tissue regeneration, *Journal of Biomedical Materials Research Part A*, 41, 511-518, **1998**.
- [31] Ambrosio, A., Sahota, J. S., Khan Y., Laurencin, C. T., A novel amorphous calcium phosphate polymer ceramic for bone repair: I. Synthesis and characterization, *Journal of Biomedical Materials Research*, 58, 295-301, **2001**.
- [32] Thein-Han, W., Misra, R., Biomimetic chitosan–nanohydroxyapatite composite scaffolds for bone tissue engineering, *Acta biomaterialia*, 5, 1182-1197, **2009**.
- [33] Liu, X., Ma, P.X., Polymeric scaffolds for bone tissue engineering, *Biomaterials*, 4749-4757, **2004**.

- [34] Tıǧlı, R. S., Karakeçili, A., Gümüşderelioǧlu, M., In vitro characterization of chitosan scaffolds: influence of composition and deacetylation degree, *Journal of Materials Science: Materials in Medicine*, 18, 1665-1674, **2007**.
- [35] Guarnieri, D., Capua, A. D., Ventre, M., Borzacchiello, A., Pedone, C., Marasco, D., Ruvo, M., Covalently immobilized RGD gradient on PEG hydrogel scaffold influences cell migration parameters, *Acta Biomaterialia*, 6, 2532-2539, **2010**.
- [36] Gümüşderelioǧlu, M., Türkoǧlu, H., Biomodification of non-woven polyester fabrics by insulin and RGD for use in serum-free cultivation of tissue cells, *Biomaterials*, 23, 3927-3935, **2002**.
- [37] Li, W. J., Laurencin, C. T., Caterson, E. J., Tua, R. S., Ko, F. K., Electrospun nanofibrous structure: a novel scaffold for tissue engineering, *Journal of Biomedical Materials Research*, 60, 613-621, **2002**.
- [38] Dhandayuthapani, B., Yoshida, Y., Maekawa, T., Kumar, D. S., Polymeric scaffolds in tissue engineering application: a review, *International Journal of Polymer Science*, 1-19, **2011**.
- [39] Corradini, P., Voena, C., Tarella, C., Astolfi, M., Ladetto, M., Palumbo, A., Lint, M. T. V., Molecular and clinical remissions in multiple myeloma: role of autologous and allogeneic transplantation of hematopoietic cells, *Journal of Clinical Oncology*, 17, 208-208, **1999**.
- [40] Kim, N.W., Piatyszek, M. A., Powse, K. R., Harley, C. B., West, M. D., Ho, P. L., Specific association of human telomerase activity with immortal cells and cancer, *Science*, 2011-2015, **1994**.
- [41] Discher, D.E., Mooney, D.J., Zandstra, P.W., Growth factors, matrices, and forces combine and control stem cells, *Science*, 324, 1673-1677, **2009**.
- [42] Nilsson, T., Pypaert, M., Hoe M. H., Slusarewicz, Berger, E. G., Overlapping distribution of two glycosyltransferases in the Golgi apparatus of HeLa cells, *The Journal of Cell Biology*, 120, 5-13, **1993**.
- [43] Han, F., Cellular modulation by the elasticity of biomaterials, *Journal of Materials Chemistry B*, 4, 9-26, **2016**.
- [44] Cabrita, G.J., Hematopoietic stem cells: from the bone to the bioreactor, *Trends in Biotechnology*, 21, 233-240, **2003**.
- [45] Ito, Y., Surface micropatterning to regulate cell functions, *Biomaterials*, 20, 2333-2342, **1999**.
- [46] Ito, Y., Covalently immobilized biosignal molecule materials for tissue engineering, *Soft Matter*, 4, 46-56, **2008**.
- [47] Cavallaro, U., Christofori, G., Cell adhesion and signalling by cadherins and Ig-CAMs in cancer, *Nature Reviews*, 4, 118-132, **2004**.
- [48] Yamada, Y., Minoru, U., Hideharu, H., Shunsuke, B., A novel approach to periodontal tissue regeneration with mesenchymal stem cells and platelet-rich plasma using tissue engineering technology: A clinical case report, *International Journal of Periodontics & Restorative Dentistry*, 26, 362-369, **2006**.
- [49] Sommerfeldt, D., Rubin, C., Biology of bone and how it orchestrates the form and function of the skeleton, *European Spine Journal*, 10, 86-95, **2001**.

- [50] Babensee, J.E., McIntire, L.V., Mikos, A.G., Growth factor delivery for tissue engineering, *Pharmaceutical Research*, 17, 497-504, **2000**.
- [51] Lee, K., Silva, E.A., Mooney, D.J., Growth factor delivery-based tissue engineering: general approaches and a review of recent developments, *Journal of the Royal Society Interface*, 8, 153-170, **2011**.
- [52] Danforth, H.D., Anticoccidial activity of salinomycin in battery raised broiler chickens, *Poultry science*, 56, 926-932, **1977**.
- [53] Dubois, M., Pierret, G., Delahaut, P., Efficient and sensitive detection of residues of nine coccidiostats in egg and muscle by liquid chromatography–electrospray tandem mass spectrometry, *Journal of Chromatography B*, 813, 181-189, **2004**.
- [54] Linde-Sipman, J., Ingh, V. D., Nes, V., Salinomycin-induced polyneuropathy in cats: morphologic and epidemiologic data, *Veterinary pathology*, 36, 152-156, **1999**.
- [55] Gupta, P.B., Onder, T. T., Jiang, G., Kuperwasser, C., Weinberg, R. A., Identification of selective inhibitors of cancer stem cells by high-throughput screening, *Cell*, 138, 645-659, **2009**.
- [56] Scherzed, A., Hackenberg, S., Froelich, K., Rak, K., Techau, A., Radeloff, A., Effects of salinomycin on human bone marrow-derived mesenchymal stem cells in vitro, *Toxicology Letters*, 218, 207-214, **2013**.
- [57] Beug, H., Breast cancer stem cells: eradication by differentiation therapy, *Cell*, 138, 623-625, **2009**.
- [58] Basu, D., Montone, K., Wang, L., Gimotty, P. A., Hammond, R., Diehl, J. A., Detecting and targeting mesenchymal-like subpopulations within squamous cell carcinomas, *Cell Cycle*, 10, 2008-2016, **2011**.
- [59] Scherzad, A., Hackenberg, S., Froelich, K., Rak, K., Hagen, R., Chronic exposure of low dose salinomycin inhibits MSC migration capability in vitro, *Biomedical Reports*, 4, 325-330, **2016**.
- [60] Huczynski, A., Salinomycin—a new cancer drug candidate, *Chemical biology & drug design*, 79, 235-238, **2012**.
- [61] Boehmerle, W., Endres, M., Salinomycin induces calpain and cytochrome c-mediated neuronal cell death, *Cell death & disease*, 2, 168-178, **2011**.
- [62] Riccioni, R., The cancer stem cell selective inhibitor salinomycin is a p-glycoprotein inhibitor, *Blood Cells, Molecules, and Diseases*, 45, 86-92, **2010**.
- [63] Fuchs, D., Heinold, A., Opelz, G., Daniel, V., Naujokat, C., Salinomycin induces apoptosis and overcomes apoptosis resistance in human cancer cells, *Biochemical and biophysical research communications*, 390, 743-749, **2009**.
- [64] Shi, A., Tao, Z. Q., Li, H., Wang, Y. Q., Zhao, J., Cancer stem cells targeting agents—a review, *Eur Rev Med Pharmacol Sci*, 19, 4064-4067, **2015**.
- [65] Lu, D., Choi, M. Y., Castro, J. E., Kipps, T. J., Carson, D. A., Salinomycin inhibits Wnt signaling and selectively induces apoptosis in chronic lymphocytic leukemia cells, *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 108, 13253-13257, **2011**.
- [66] Basu-Roy, U., Basilico, C., Mansukhani, A., Perspectives on cancer stem cells in osteosarcoma, *Cancer Letters*, 338, 158-167, **2013**.

- [67] Yan, G.N., Lv, Y. F., Guo, Q.N., Advances in osteosarcoma stem cell research and opportunities for novel therapeutic targets, *Cancer Letters*, 370, 268-274, **2016**.
- [68] Tang, Q.L., Zhao, Z. Q., Liang, Y., Yin, J. Q., Salinomycin inhibits osteosarcoma by targeting its tumor stem cells, *Cancer letters*, 311, 113-121, **2011**.
- [69] Kim, S.H., Choi, Y. J., Kim, K. Y., Yu, S. N., Salinomycin simultaneously induces apoptosis and autophagy through generation of reactive oxygen species in osteosarcoma U2OS cells, *Biochemical And Biophysical Research Communications*, 473, 607-613, **2016**.
- [70] Zhu, L.Q., Zhen, Y., Zhang, Y., Guo, Z., Salinomycin activates AMP-activated protein kinase-dependent autophagy in cultured osteoblastoma cells: a negative regulator against cell apoptosis, *Plos One*, 8, 84-175, **2013**.
- [71] Zhen, Y.F., Li, S., Zhu, Y., Wang, X., Identification of DNA-PKcs as a primary resistance factor of salinomycin in osteosarcoma cells, *Oncotarget*, 7, 79417-79427, **2016**.
- [72] Antoszczak, M., Synthesis, antiproliferative and antibacterial activity of new amides of salinomycin, *Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters*, 24, 1724-1729, **2014**.
- [73] Lagas, J.S., P-glycoprotein limits oral availability, brain penetration, and toxicity of an anionic drug, the antibiotic salinomycin, *Antimicrobial Agents And Chemotherapy*, 52, 1034-1039, **2008**.
- [74] Kuo, S.Z., Blair, K. J., Rahimy, E., Kiang, A., Abhold, E., Fan, J., Salinomycin induces cell death and differentiation in head and neck squamous cell carcinoma stem cells despite activation of epithelial-mesenchymal transition and Akt, *BMC Cancer*, 12, 556-570, **2012**.
- [75] Lu, D., Carson, D.A., Inhibition of Wnt signaling and cancer stem cells, *Oncotarget*, 2, 587, **2011**.
- [76] Miyazaki, Y., Salinomycin, a new polyether antibiotic, *The Journal of Antibiotics*, 27, 814-821, **1974**.
- [77] Huczyński, A., Synthesis and antimicrobial activity of amide derivatives of polyether antibiotic-salinomycin, *Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters*, 22, 4697-4702, **2012**.
- [78] White, D.G., Ayers, S., Maurer, J. J., Thayer, S. G., Hofacre, C., Antimicrobial susceptibilities of *Staphylococcus aureus* isolated from commercial broilers in northeastern Georgia, *Avian Diseases*, 47, 203-210, **2003**.
- [79] Danforth, H.D., Ruff, M. D., Reid, M., Johnson, J., Anticoccidial activity of salinomycin in floor-pen experiments with broilers, *Poultry Science*, 56, 933-938, **1977**.
- [80] Yvorė, P., Raynaud, J. P., Conan, L., Naciri, M., Evaluation of the efficacy of salinomycin in the control of coccidiosis in chicks, *Poultry Science*, 59, 2412-2416, **1980**.
- [81] Keleş, O., Yıldırım, M., Gargılı A., Arslan, M. Ö., Salinomisinin Aralıklı Uygulamasının Antikoksidial Etkisi, *İstanbul Üniv Vet Fak Dergisi*, 21, 327-333, **1995**.

- [82] Holm, C., Jespersen, L., A flow-cytometric Gram-staining technique for milk-associated bacteria, *Applied and Environmental Microbiology*, 69, 2857-2863, **2003**.
- [83] Wang, X., Gibson, G., Effects of the in vitro fermentation of oligofructose and inulin by bacteria growing in the human large intestine, *Journal of Applied Bacteriology*, 75, 373-380, **1993**.
- [84] Kasimoglu, A., Gencay, Y.E., Ayaz, N.D., Prevalence and antibiotic resistance profiles of Enterococcus species in chicken at slaughter level; absence of vanA and vanB genes in E. faecalis and E. faecium, *Research in Veterinary Science*, 89, 153-158, **2010**.
- [85] Lowy, F.D., Staphylococcus aureus infections, *New England Journal of Medicine*, 339, 520-532, **1998**.
- [86] Goh, S.H., Identification of Staphylococcus species and subspecies by the chaperonin 60 gene identification method and reverse checkerboard hybridization, *Journal of Clinical Microbiology*, 35, 3116-3121, **1997**.
- [87] Kloos, W., Systematics and the natural history of staphylococci, *Journal of Applied Bacteriology*, 69, 25-37, **1990**.
- [88] Karapınar, M., Gönül, Ş., Gıda kaynaklı mikrobiyal hastalıklar, *Gıda Mikrobiyolojisi*, **1998**.
- [89] Tunail, N., *Mikrobiyal enfeksiyonlar ve intoksikasyonlar*, Gıda Mikrobiyolojisi ve Uygulamaları, Ankara Üniversitesi Ziraat Fakültesi Gıda Mühendisliği Bölümü, Ankara, **2000**.
- [90] Tükel, Ç. Doğan, H.B., Staphylococcus aureus, *Gıda Mikrobiyolojisi Ve Uygulamaları*, 2, 357-66, **2000**.
- [91] Madigan, M.T., Martinko, J.M., Parker, J., Brock biology of microorganisms, Prentice Hall Upper Saddle River, NJ, **1997**.
- [92] Çakır, P., Güven, K., Gıda ve insan kaynaklı Staphylococcus aureus strainlerinin karakterizasyonu, Yüksek Lisans Tezi, Anadolu Üniversitesi, Eskişehir, **2007**.
- [93] Kemal, Y., Coğul Dirençli Stafilokokların Neden Olduğu İnfeksiyonların Tedavisi, *Ankem Dergisi*, 6, 301-303, **1992**.
- [94] Rice, L.B., Antimicrobial Resistance In Gram-Positive Bacteri, *American Journal of Infection Control*, 34, 11-19, **2006**.
- [95] Korten, V., Çok İlaça Dirençli Gram Pozitif Bakteriler (MRSA ve VRE): Tedavi Ve Kontrol, *Ankem Dergisi*, 27, 57-62, **2013**.
- [96] Mutlu, G., Temel ve klinik Mikrobiyoloji, Güneş Kitabevi, Ankara, 571-577, **1999**.
- [97] Duman, T., Tavuk Karkaslarından İzole Edilen Staphylococcus' ların Virülans Faktörleri ve Antibiyotik Dirençliliği, Gazi Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Yüksek Lisans Tezi, Ankara, **2007**.
- [98] Woodford, N. Livermore, D.M., Infections caused by Gram-positive bacteria: a review of the global challenge, *Journal of Infection*, 59, 4-16, **2009**.
- [99] Buke, C., Lefevre, L., Lolom, I., Guerinot, W., Epidemiology of multidrug-resistant bacteria in patients with long hospital stays, *Infection Control & Hospital Epidemiology*, 28, 1255-1260, **2007**.

- [100] Altun, B., Çeşitli hastanelerde izole edilen stafilokok suşlarının fusidik asit ve sık kullanılan diğer antibiyotiklere duyarlılıkları, *Türk Mikrobiyol Cem Dergisi*, 33, 8-11, **2003**.
- [101] Bilgiç, M., Dayik, M., Borun Özellikleri ve Tekstil Endüstrisinde Kullanımıyla Sağladığı Avantajlar, *Electronic Journal of Vehicle Technologies/Tasit Teknolojileri Elektronik Dergisi*, 7, **2013**.
- [102] Argust, P., Distribution of boron in the environment, *Biological trace element research*, 66, 131-143, **1998**.
- [103] Yenmez, N., Stratejik bir maden olarak bor minerallerin Türkiye için önemi, *Coğrafya Dergisi*, 59-94, **2009**.
- [104] Yiğitbaşıoğlu, H., Türkiye için önemli bir maden: bor, *Ankara Üniversitesi Coğrafi Bilimler Dergisi*, 13-25, **2004**.
- [105] Çalik, A., Türkiye'nin bor madenleri ve özellikleri, *Mühendis ve Makine Dergisi*, 508, 1-9, **2002**.
- [106] Scorei, R., Is boron a prebiotic element? A mini-review of the essentiality of boron for the appearance of life on Earth, *Origins of Life and Evolution of Biospheres*, 42, 3-17, **2012**.
- [107] Eren, M., Bor'un Biyolojik Önemi ve Metabolizma Üzerine Etkileri, *Erciyes Üniversitesi Veteriner Fakültesi Dergisi*, 1, **2004**.
- [108] Devirian, T.A., Volpe, S.L., The physiological effects of dietary boron., *Crit Rev Food Sci Nutr*, 219-231, **2003**.
- [109] Ku, W.W., Tissue disposition of boron in male Fischer rats, *Toxicology and Applied Pharmacology*, 111, 145-151, **1991**.
- [110] Nielsen, F.H., Effect of dietary boron on mineral, estrogen, and testosterone metabolism in postmenopausal women, *The Faseb Journal*, 1, 394-397, **1987**.
- [111] Panyam, J., Labhasetwar, V., Biodegradable nanoparticles for drug and gene delivery to cells and tissue, *Advanced Drug Delivery*, 55, 329-347, **2003**.
- [112] Mudshinge, S.R., Nanoparticles: emerging carriers for drug delivery, *Saudi Pharmaceutical Journal*, 19, 129-141, **2011**.
- [113] Zhang, L., Nanoparticles in medicine: therapeutic applications and developments, *Clinical Pharmacology And Therapeutics*, 83, 761-769, **2008**.
- [114] Desai, N., Challenges in development of nanoparticle-based therapeutics, *The AAPS Journal*, 14, 282-295, **2012**.
- [115] Rose, J., Auffan, M., Proux, O., Niviere, V., Bottero, J., Physicochemical Properties of Nanoparticles in Relation with Toxicity, *In Encyclopedia of Nanotechnology*, 2085-2085, **2012**.
- [116] Yokoyama, M., Miyauchi, M., Yamada, N., Okano, T., Sakurai, Y., Kataoka, K., Inoue, S., Characterization and anticancer activity of the micelle-forming polymeric anticancer drug adriamycin-conjugated poly (ethylene glycol)-poly (aspartic acid) block copolymer, *Cancer Research*, 50, 1693-1700, **1990**.
- [117] Felice, B., Drug delivery vehicles on a nano-engineering perspective, *Materials Science and Engineering: C*, 41, 178-195, **2014**.
- [118] Nagavarma, B., Different techniques for preparation of polymeric nanoparticles-a review, *Asian J. Pharm. Clin. Res*, 5, 16-23, **2012**.

- [119] Staff, R.H., Schaeffel, D., Turshatov, A., Donadio, D., Butt, H., Landfester, K., Particle Formation in the Emulsion-Solvent Evaporation Process, *Small*, 9, 3514-3522, **2013**.
- [120] Desgouilles, S., Vauthier, C., Bazile, D., Vacus, J., The design of nanoparticles obtained by solvent evaporation: a comprehensive study, *Langmuir*, 19, 9504-9510, **2003**.
- [121] Staff, R.H., Landfester, K., Crespy, D., Recent advances in the emulsion solvent evaporation technique for the preparation of nanoparticles and nanocapsules, in Hierarchical Macromolecular Structures: 60 Years after the Staudinger Nobel Prize II, *Springer*, 329-344, **2013**.
- [122] Andreas, K., Zehbe, R., Kazubek, M., Grzeschik, K., Biodegradable insulin-loaded PLGA microspheres fabricated by three different emulsification techniques: investigation for cartilage tissue engineering, *Acta Biomaterialia*, 7, 1485-1495, **2011**.
- [123] Dash, S., Murthy, P. N., Nath, L., Chowdhury, P., Kinetic modeling on drug release from controlled drug delivery systems, *Acta Pol Pharm*, 67, 217-23, **2010**.
- [124] Irmak, G., Demirtaş, T. T., Altındal, D. Ç., Gümüşderelioğlu, M., Sustained release of 17 β -estradiol stimulates osteogenic differentiation of adipose tissue-derived mesenchymal stem cells on chitosan-hydroxyapatite scaffolds, *Cells Tissues Organs*, 199, 37-50, **2014**.
- [125] Derman, S., Kizilbey, K., Akdeste, Z.M., Polymeric Nanoparticles, *Sigma*, 31, 107-120, **2013**.
- [126] Eberhard W, N., Synthetic polymers as drug-delivery vehicles in medicine, *Metal-Based Drugs*, 1-19, **2008**.
- [127] Lu, Y., Chen, S., Micro and nano-fabrication of biodegradable polymers for drug delivery, *Advanced Drug Delivery*, 56, 1621-1633, **2004**.
- [128] Cutright, D. E., Beasley, J. D., Perez, B., Histologic comparison of polylactic and polyglycolic acid sutures, *Oral Surgery, Oral Medicine, Oral Pathology*, 32, 165-173, **1971**.
- [129] Racey, G., Wallace, W. R., Cavalaris, C. J., Marguard, J. V., Comparison of a polyglycolic-poly-lactic acid suture to black silk and plain catgut in human oral tissues, *Journal of Oral Surgery (American Dental Association: 1965)*, 36, 766-770, **1978**.
- [130] Kumari, A., Yadav, S.K., Yadav, S.C., Biodegradable polymeric nanoparticles based drug delivery systems, *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*, 75, 1-18, **2010**.
- [131] Ivanova, E.P., Bazaka, K., Crawford, R.J., Natural polymer biomaterials: advanced applications-2, **2014**.
- [132] Elgadir, M.A., Impact of chitosan composites and chitosan nanoparticle composites on various drug delivery systems: A review. *Journal Of Food And Drug Analysis*, 23, 619-629, **2015**.
- [133] Demirtaş, T.T., Kaynak, G., Gümüşderelioğlu, M., Bone-like hydroxyapatite precipitated from 10 $\times$ SBF-like solution by microwave irradiation, *Materials Science and Engineering: C*, 49, 713-719, **2015**.

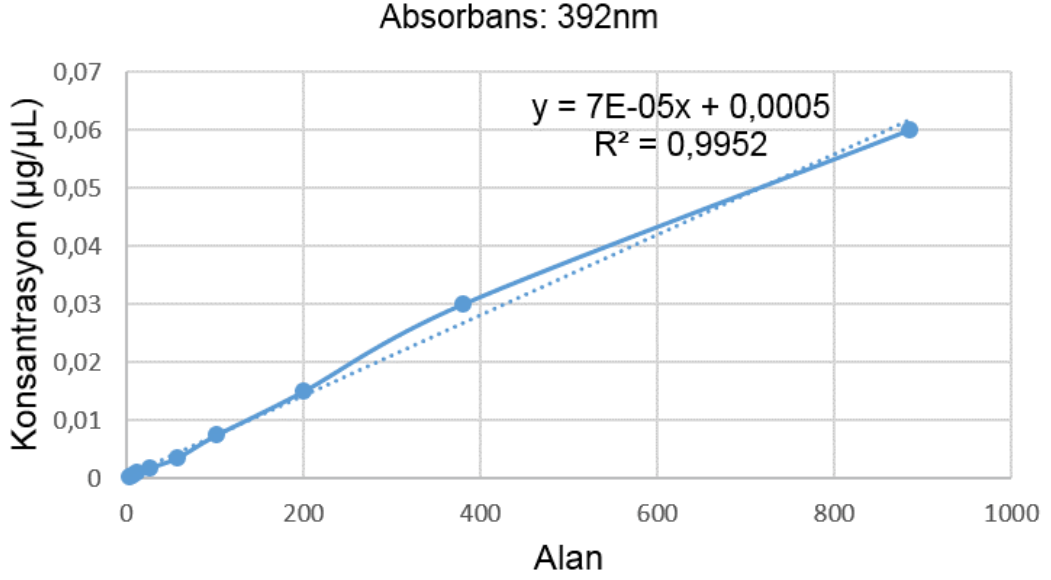
- [134] Tunçay, E.Ö., Demirtaş, T.T., Gümüşderelioğlu, M., Microwave-induced production of boron-doped HAp (B-HAp) and B-HAp coated composite scaffolds, *Journal of Trace Elements in Medicine and Biology*, 40, 72-81, **2017**.
- [135] Tunçay, Ö.E., Biyomimetik yöntemle bor katkılı doku iskelelerinin geliştirilmesi ve kemik doku mühendisliğindeki etkinliklerinin araştırılması, Yüksek Lisans Tezi, Hacettepe Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü, Ankara, **2013**.
- [136] Gümüşderelioğlu, M., Agi, P., Adsorption of concanavalin A on the well-characterized macroporous chitosan and chitin membranes, *Reactive and Functional Polymers*, 61, 211-220, **2004**.
- [137] Zhang, Y., Zhang, H., Wang, X., Wang, J., Zhang, X., Zhang, Q., The eradication of breast cancer and cancer stem cells using octreotide modified paclitaxel active targeting micelles and salinomycin passive targeting micelles, *Biomaterials*, 33, 679-691, **2012**.
- [138] Muntimadugu, E., Kumar, R., Saladi, S., Rafeeqi, T. A., Kan, W., CD44 targeted chemotherapy for co-eradication of breast cancer stem cells and cancer cells using polymeric nanoparticles of salinomycin and paclitaxel, *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*, 143, 532-546, **2016**.
- [139] Ternane, R., Introduction of boron in hydroxyapatite: synthesis and structural characterization, *Journal of Alloys and Compounds*, 333, 62-71, **2002**.
- [140] Gümüşderelioğlu, M., Tunçay, E. Ö., Kaynak, G., Demirtaş, T. T., Aydın, S. T., Hakkı, S. S., Encapsulated boron as an osteoinductive agent for bone scaffolds, *Journal of Trace Elements in Medicine and Biology*, 31, 120-128, **2015**.
- [141] Farzadi, A., Hashjin, M. S., Aminian, B. A., Synthesis and characterization of hydroxyapatite/ β -tricalcium phosphate nanocomposites using microwave irradiation, *Ceramics International*, 37, 65-71, **2011**.
- [142] Irmak, G., B-Estradiol Yüklü Doku İskeleleri ile *In-Vitro* Kemik Doku Mühendisliği, Yüksek Lisans Tezi, Hacettepe Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü, Ankara, **2013**.
- [143] Mittal, G., Sahana, D. K., Bhardwaj, V., Kumar, 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**.
- [144] Nafee, N., Taetz, S., Schneider, M., Chitosan-coated PLGA nanoparticles for DNA/RNA delivery: effect of the formulation parameters on complexation and transfection of antisense oligonucleotides, *Biology and Medicine*, 3, 173-183, **2007**.
- [145] Aydın, R., Herceptin-decorated salinomycin-loaded nanoparticles for breast tumor targeting, *Journal of Biomedical Materials Research Part A*, 101, 1405-1415, **2013**.
- [146] Mainardes, R. M., Evangelista, R. C., PLGA nanoparticles containing praziquantel: effect of formulation variables on size distribution, *International Journal of Pharmaceutics*, 290, 137-144, **2005**.
- [147] Izumikawa, M., Murata, M., Tachibana, K., Ebizuka, Y., Fujii, I., Cloning of modular type I polyketide synthase genes from salinomycin producing strain of *Streptomyces albus*, *Bioorganic & Medicinal Chemistry*, 11, 3401-3405, **2003**.

- [148] Dusi, G., Gamba, V., Liquid chromatography with ultraviolet detection of lasalocid, monensin, salinomycin and narasin in poultry feeds using pre-column derivatization, *Journal of Chromatography A*, 835, 243-246, **1999**.
- [149] Blazsek, M., Surovcová, A., LC determination of salinomycin in fermentation broths and premixes, *Journal of pharmaceutical and biomedical analysis*, 31, 291-298, **2003**.
- [150] Avgoustakis, K., Beletsi, A., Panagi, Z., PLGA–mPEG nanoparticles of cisplatin: in vitro nanoparticle degradation, in vitro drug release and in vivo drug residence in blood properties, *Journal of Controlled Release*, 79, 123-135, **2002**.
- [151] Shi, Z., Huang, X., Cai, Y., Tang, R., Yang, D., Size effect of hydroxyapatite nanoparticles on proliferation and apoptosis of osteoblast-like cells, *Acta Biomaterialia*, 5, 338-345, **2009**.
- [152] Qing, F., Wang, Z., Hong, Y., Liu, M., Guo, B., Luo, H., Selective effects of hydroxyapatite nanoparticles on osteosarcoma cells and osteoblasts, *Journal of Materials Science: Materials in Medicine*, 23, 2245-2251, **2012**.
- [153] Ji, Z., Jin, X., George, S., Xia, T., Meng, H., Wang, X., Suarez, E., Dispersion and stability optimization of TiO₂ nanoparticles in cell culture media, *Environmental Science & Technology*, 44, 7309-7314, **2010**.
- [154] Mailänder, V., Landfester, K., Interaction of nanoparticles with cells. *Biomacromolecules*, 10, 2379-2400, **2009**.
- [155] Liuyun, J., Yubao L., Chengdong, X., Preparation and biological properties of a novel composite scaffold of nano-hydroxyapatite/chitosan/carboxymethyl cellulose for bone tissue engineering, *Journal of Biomedical Science*, 16, 65-75, **2009**.

EKLER

EK-1 HPLC Kalibrasyon Grafiği

Salinomisin enkapsülasyon verimi hesabının anlatıldığı Bölüm 4.2.'de enkapsülasyon verimi hesabında kullanılmak üzere çizilen kalibrasyon grafiği aşağıda gösterilmiştir.



EK-2 PLGA Nanopartiküllerden Salinomisin Salımı 1. Paralel Verileri

Bölüm 4.3.1.'de anlatılan belirli aralıklar ile PLGA nanopartiküllerden salinomisin salım örnekleri alınarak yapılan HPLC analizi sonuçlarının 1.paralel verileri aşağıdaki tabloda gösterilmiştir.

t (gün)	Pik Alanı	C (µg/µL)	Salınan SAL (µg)	2,4-DNPh Seyreltmesi	Atılan SAL (µg)	Toplam SAL (µg)	Kümülatif Salım (%)	Salınan Miktar (µg SAL/ mg partikül)
0	0	0	0	0	0	0	0	0
0,0417	67,7874	0,0052	52,4511	58,2790	4,7206	58,2791	45,6620	14,5698
0,1667	67,3887	0,0052	52,1720	57,9689	4,6955	62,6896	49,1176	15,6724
0,7917	65,1715	0,0051	50,6200	56,2445	4,5558	65,6606	51,4454	16,4151
1	60,2782	0,0047	47,1947	52,4386	4,2475	66,4105	52,0330	16,6026

2	53,1065	0,0042	42,1745	46,8606	3,7957	65,0800	50,9905	16,2700
3	47,052	0,0038	37,9364	42,1515	3,4143	64,1667	50,2749	16,0417
5	44,4097	0,0036	36,0867	40,0964	3,2478	65,5258	51,3398	16,3815
7	45,1047	0,0037	36,5732	40,6369	3,2916	69,3142	54,3080	17,3286
9	35,2914	0,0030	29,7039	33,0044	2,6734	64,9732	50,9069	16,2433
11	33,3104	0,0028	28,3172	31,4636	2,5486	66,1058	51,7943	16,5265
13	33,0172	0,0028	28,1120	31,2356	2,5301	68,4263	53,6124	17,1066
15	36,9181	0,0031	30,8426	34,2696	2,7758	73,9904	57,9719	18,4976
17	35,3008	0,0030	29,7105	33,0117	2,6740	75,5084	59,1612	18,8771
19	35,2130	0,0030	29,6491	32,9434	2,6684	78,1141	61,2028	19,5285
21	50,7689	0,0041	40,5382	45,0425	3,6484	92,8815	72,7731	23,2204
23	55,3665	0,0044	43,7566	48,6184	3,9381	100,1059	78,4335	25,0265
27	55,3665	0,0044	43,7566	48,6184	3,9381	104,0439	81,5190	26,0110
31	56,5682	0,0045	44,5977	49,5530	4,0138	108,9167	85,3368	27,2292
35	56,5682	0,0045	44,5977	49,5530	4,0138	112,9305	88,4816	28,2326
37	56,0797	0,0044	44,2558	49,1731	3,9830	116,5643	91,3288	29,1411
39	56,6613	0,0045	44,6629	49,6255	4,0197	120,9997	94,8039	30,2499
41	56,9234	0,0045	44,8464	49,8293	4,0362	125,2232	98,1130	31,3058
43	51,2121	0,0041	40,8485	45,3872	3,6764	124,8173	97,7950	31,2043
45	51,0525	0,0041	40,7368	45,2631	3,6663	128,3695	100,5782	32,0924
47	51,3548	0,0041	40,9484	45,4982	3,6854	132,2709	103,6350	33,0677
49	51,9547	0,0041	41,3683	45,9648	3,7231	136,4229	106,8880	34,1057

EK-3 PLGA-SAL np ve BnHAp Yüklü Kitosan Doku İskelelerinden Salinomisin Salımı 1. Paralel Verileri

t (gün)	Pik Alanı	C (µg/µL)	Salınan SAL (µg)	2,4-DNPh Seyreltmesi	Atılan SAL (µg)	Toplam SAL (µg)	Kümülatif Salım (%)	Salınan Miktar (µg SAL/ mg partikül)
0		0	0	0	0	0	0	0
0,0417	45,9001	0,0037	37,1300	41,2556	3,3417	44,9104	35,1876	11,2276
0,1667	50,2735	0,0040	40,1914	44,6567	3,6172	47,9989	37,6074	11,9997
0,7917	51,6672	0,0041	41,1670	45,7411	3,7050	52,7001	41,2908	13,1750
1	52,8818	0,0042	42,0172	46,6858	3,7816	57,3498	44,9339	14,3375
2	54,7745	0,0043	43,3421	48,1579	3,9008	62,6035	49,0501	15,6509
3	53,7791	0,0043	42,6453	47,3837	3,8381	65,7301	51,4998	16,4325
5	47,2877	0,0038	38,1013	42,3348	3,4291	64,5193	50,5512	16,1298
7	56,1253	0,0044	44,2877	49,2085	3,9859	74,8221	58,6235	18,7055
9	49,2977	0,0040	39,5083	43,8982	3,5558	73,4976	57,5858	18,3744
11	47,4355	0,0038	38,2048	42,4498	3,4384	75,6050	59,2369	18,9013
13	48,7727	0,0039	39,1408	43,4898	3,5227	80,0835	62,7458	20,0209
15	48,4941	0,0039	38,9458	43,2731	3,5051	83,3895	65,3361	20,8474
17	48,6469	0,0039	39,0528	43,3920	3,5148	87,0135	68,1755	21,7534
19	49,9385	0,0040	39,9569	44,3966	3,5961	91,5328	71,7164	22,8832
21	50,7197	0,0041	40,5037	45,0042	3,6453	95,7365	75,0100	23,9341
23	51,0041	0,0041	40,7028	45,2254	3,6633	99,6031	78,0395	24,9008
27	52,7856	0,0042	41,9499	46,6110	3,7755	104,6519	81,9953	26,1630
31	53,5789	0,0043	42,5052	47,2280	3,8255	109,0444	85,4369	27,2611

35	51,4578	0,0041	41,0204	45,5782	3,6918	111,2202	87,1416	27,8050
39	52,4521	0,0042	41,7164	46,3516	3,7545	115,6853	90,6401	28,9213
43	49,1106	0,0039	39,3774	43,7526	3,5440	116,8409	91,5454	29,2102
47	47,5965	0,0038	38,3175	42,5750	3,4486	119,2072	93,3995	29,8018
51	48,6645	0,0039	39,0651	43,4057	3,5159	123,4865	96,7523	30,8716
55	49,5847	0,0040	39,7092	44,1214	3,5738	127,7180	100,0677	31,9295
59	49,0012	0,0039	39,3008	43,6676	3,5371	130,8380	102,5123	32,7095



ÖZGEÇMİŞ

KİŞİSEL BİLGİLER

Doğum Yeri ve Tarihi : ANKARA, 01.01.1991
Medeni Hâl : Bekâr
Adres : Batıkent, ANKARA
Tel : 0506 606 11 35
E-mail : meltemgamzeozturk@gmail.com

EĞİTİM

Hacettepe Üniversitesi

Yüksek Lisans Eğitimi, Biyomühendislik
Eylül 2015 – Temmuz 2017

Ankara Üniversitesi

Lisans Eğitimi, Kimya Mühendisliği
Eylül 2009 – Haziran 2015

PROJE

Periodontal doku mühendisliği uygulamalarında kullanılmak üzere üç fazlı PCL (nHA ve BMP-7 içeren) doku iskelelerinin elektroğirme ve çözücü döküm/parçacık uzaklaştırma teknikleri ile üretimi ve karakterizasyonu

(Fabrication of PCL (nHA and BMP-7) based three phases tissue scaffolds via electrospinning and solvent casting/particulate leaching for periodontal tissue engineering applications and characterization)

Ocak 2013 – Şubat 2014

BAP

Proje sunumu, Ulusal Kimya Mühendisliği Öğrenci Kongresi II'de gerçekleştirilmiştir.

DENEYİM

AR-GE Mühendisi ve Laboratuvar Sorumlusu

FG GRUP - BIOLAS

Temmuz 2017 – devam etmekte

Araştırmacı – Hücre ve Doku Mühendisliği Araştırma Grubu

(Cell and Tissue Engineering Research Group)

Hacettepe Üniversitesi

Eylül 2015 – Temmuz 2017

Araştırmacı – Doku Mühendisliği

Ankara Üniversitesi

Ocak 2013 – Şubat 2014

Stajyer Mühendis

Drogsan Pharmaceuticals – Üretim ve AR-GE Departmanları

Haziran 2013 – Temmuz 2013 Ankara, Türkiye

Stajyer Mühendis

Atatürk Orman Çiftliği Süt ve Süt Ürünleri Fabrikası – Üretim Departmanı

Ağustos 2012 – Eylül 2012 Ankara, Türkiye

YABANCI DİL

İngilizce – Profesyonel Çalışma Yetkinliği

Türkçe – Ana Dil

GÖNÜLLÜ ÇALIŞMALAR

LÖSEV Gönüllüsü Kasım 2012 – devam etmekte

TEMA Gönüllüsü Ocak 2010 – devam etmekte



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

HACETTEPE ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLER ENSTİTÜSÜ
BİYOMÜHENDİSLİK ANABİLİM DALI BAŞKANLIĞI'NA

Tarih: 01/03/2018

Tez Başlığı / Konusu: SALİNOMİSİN ve BnHAp YÜKLÜ DOKU İSKELELERİNİN ANTİKANSEROJEN ve ANTİBAKTERİYEL ETKİNLİĞİNİN ARAŞTIRILMASI

Yukarıda başlığı/~~konusu~~ gösterilen tez çalışmamın a) Kapak sayfası, b) Giriş, c) Ana bölümler d) Sonuç kısımlarından oluşan toplam 95 sayfalık kısmına ilişkin, 01/03/2018 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 Orijinallik 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

Adı Soyadı: Meltem Gamze ÖZTÜRK
Öğrenci No: N15228497
Anabilim Dalı: BİYOMÜHENDİSLİK
Programı: YÜKSEK LİSANS
Statüsü: ☒ Y.Lisans ☐ Doktora ☐ Bütünleşik Dr.

01.03.2018

DANIŞMAN ONAYI

UYGUNDUR.

Prof.Dr. Menemşe Gümüşderelioğlu

(Unvan, Ad Soyad, İmza)