

**POLİ(BÜTİLENADİPAT-KO-TEREFTALAT) (PBAT) MİKRO  
ve NANOPARTİKÜLLER: SENTEZ, KARAKTERİZASYON  
ve KURKUMİN SALIM KİNETİĞİNİN İNCELENMESİ**

**POLY(BUTYLENEADIPATE-CO-TEREPHTHALATE)  
(PBAT) MICRO AND NANOPARTICLES: SYNTHESIS,  
CHARACTERIZATION AND INVESTIGATION OF  
CURCUMIN RELEASE KINETICS**

**EBRU TAMAHKAR**

**Prof. Dr. Menemşe GÜMÜŞDERELİOĞLU**

**Tez Danışmanı**

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

2016

**EBRU TAMAHKAR'** in hazırladığı "Poli(Bütülenadipat-ko-Tereftalat) (PBAT) Mikro ve Nanopartiküller: Sentez, Karakterizasyon ve Kurkumin Salım Kinetiğinin İncelenmesi" adlı bu çalışma aşağıdaki jüri tarafından **KİMYA MÜHENDİSLİĞİ ANABİLİM DALI'** nda **YÜKSEK LİSANS TEZİ** olarak kabul edilmiştir.

Prof. Dr. Zümriye AKSU

Başkan

.....

Prof. Dr. Menemşe GÜMÜŞDERELİOĞLU

Danışman

.....

Prof. Dr. Adil DENİZLİ

Üye

.....

Doç. Dr. Ayşe KARAKEÇİLİ

Üye

.....

Yrd. Doç. Dr. Işıl GERÇEK BEŞKARDEŞ

Üye

.....

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

Prof. Dr. Salih Bülent ALTEN

Fen Bilimleri Enstitüsü Müdürü

## 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: 29.11.2016

EBRU TAMAHKAR

## ÖZET

# POLİ(BÜTİLENADİPAT-KO-TEREFTALAT) (PBAT) MİKRO ve NANOPARTİKÜLLER: SENTEZ, KARAKTERİZASYON ve KURKUMİN SALIM KİNETİĞİNİN İNCELENMESİ

Ebru TAMAHKAR

Yüksek Lisans, Kimya Mühendisliği Anabilim Dalı

Tez Danışmanı: Prof. Dr. Menemşe GÜMÜŞDERELİOĞLU

Kasım 2016, 114 sayfa

Bu tez çalışması “Poli(bütülenadipat-ko-tereftalat) (PBAT) Mikro ve Nanopartiküller: Sentez, Karakterizasyon ve Kurkumin Salım Kinetiğinin İncelenmesi” adlı ve FHD-2016-11953 kodlu Hacettepe Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projesi ve 2210-C TÜBİTAK Öncelikli Alanlara Yönelik Yurt İçi Yüksek Lisans Burs Programı desteği ile gerçekleştirilmiştir. Tez kapsamında, alifatik-aromatik bir kopolimer olan poli(bütülenadipat-ko-tereftalat) (PBAT)’ın ilaç salım sistemlerindeki etkinliğinin araştırılması hedeflenmiştir. Bu amaçla PBAT mikro ve nanopartiküllerin sentez ve karakterizasyonlarının ardından doğal, antikanserojen nitelikli bir ilaç olarak son yıllarda öne çıkan kurkuminin partiküllere yüklenmesi ile *in-vitro* salımı gerçekleştirilmiş ve partiküllerin hücre kültür sistemlerindeki sitotoksik etkisi belirlenmiştir.

İlk basamakta, kurkumin yüklü olmayan PBAT partiküller sentezlenmiştir. Elde edilen sonuçlar doğrultusunda en uygun morfolojik özellikteki mikro ve nano boyutta iki farklı partikül seçilmiştir ve çalışmanın diğer kısımlarında bu partiküller kullanılmıştır. Bu partiküllerden %1 PBAT (w/v), %1 poli(vinil alkol) (PVA) (w/v) ile hazırlanan partiküller mikro boyutu; %1 PBAT (w/v), %1.5

didodesildimetilamonyum bromür (DMAB) (w/v) ile hazırlanan partiküller ise nano boyutu temsil etmektedir. Elde edilen PBAT mikro ve nanopartiküllerin boyutları sırasıyla  $1.05 \pm 0.53 \mu\text{m}$  ve  $0.38 \pm 0.18 \mu\text{m}$ 'dir. Ardından PBAT mikro ve nanopartiküllere kurkumin yüklemesi gerçekleştirilmiştir. PBAT mikro ve nanopartiküllerin en yüksek kurkumin enkapsülasyon verimleri PBAT ve kurkuminin kütlece oranınının 10 kat olduğu durumda sırasıyla  $\% 80 \pm 5$  ve  $\% 90 \pm 3$  olarak belirlenmiştir. Kurkumin yüklü olan ve olmayan PBAT mikro ve nanopartiküllerin karakterizasyon çalışmaları ile kimyasal ve termal özellikleri ayrıntılı olarak belirlenmiş ve kurkuminin yapıdaki varlığı kanıtlanmıştır.

Devam eden basamakta kurkumin yüklü PBAT mikro ve nanopartiküllerin *in-vitro* salım çalışmaları yapılmış ve kurkumin salım kinetikleri incelenmiştir. Salım çalışmalarına göre kurkumin yüklü PBAT mikro ve nanopartiküllerden kurkuminin 22 günde sırasıyla  $\%49$  ve  $\%73$  oranında salındığı belirlenmiştir. Mikropartiküller ile kurkumin salımının nanopartiküllere göre daha yavaş gerçekleştiği görülmüştür. Partiküllerin kurkumin salım kinetikleri incelendiğinde ise her iki tip partikülden kurkumin salımının Higuchi salım kinetik modeline uyduğu belirlenmiştir.

Son basamakta ise hücre kültürü çalışmaları ile MG-63 insan kemik kanseri hücrelerinin ve MC3T3-E1 fare kemik öncül hücrelerinin tek tabaka kültürleri üzerinde kurkumin yüklü olan ve olmayan PBAT mikro ve nanopartiküllerin sitotoksik etkileri incelenmiştir. Hücrelerin canlılığı ve üremesi MTT (3-[4,5-dimetiltiazol-2-il]-2,5-difeniltetrazolyum bromür) analiziyle, hücre morfolojileri ise optik mikroskop ve floresan mikroskop görüntüleri ile takip edilmiştir. Partiküllerin MG-63 hücrelerini inhibe ettiği ve MC3T3-E1 hücreleri üzerinde sitotoksik bir etkiye neden olmadığı belirlenmiştir. Kurkuminin antikanserojen özelliğinin hücre döngüsündeki etkisi ise akış sitometre ile analiz edilmiştir. Elde edilen sonuçlara göre kurkuminin MG-63 hücrelerini G0/G1 hücre döngü fazında inhibe ettiği ve MC3T3-E1 hücreleri üzerinde anlamlı bir etkiye neden olmadığı belirlenmiştir.

**Anahtar kelimeler :** Poli(bütillenadipat-ko-tereftalat), mikropartikül, nanopartikül, kurkumin salımı, emülsiyon hazırlama-çözücü buharlaştırma, biyobozunur polimerler, kemik kanser hücreleri, kemik öncül hücreleri.

## **ABSTRACT**

# **POLY(BUTYLENEADIPATE-CO-TEREPHTHALATE) (PBAT) MICRO and NANOPARTICLES: SYNTHESIS, CHARACTERIZATION and INVESTIGATION of CURCUMIN RELEASE KINETICS**

**Ebru TAMAHKAR**

**Master of Science, Chemical Engineering Division**

**Supervisor: Prof. Dr. Menemşe GÜMÜŞDERELİOĞLU**

**November 2016, 114 pages**

This study was performed with the support of 'Poly(butylene adipate-co-terephthalate) (PBAT) Micro and Nanoparticles: Synthesis, Characterization and Investigation of Curcumin Release Kinetics' entitled and FHD-2016-11953 coded Hacettepe University funding project and TÜBİTAK 2210-C Primary Subject National Scholarship Program for MSc Students. In the scope of the thesis, the efficiency of aliphatic-aromatic copolyester poly(butylene adipate-co-terephthalate) (PBAT) in drug release applications was investigated. For this purpose, after the synthesis and characterization of PBAT micro and nanoparticles the loading and in-vitro release of curcumin that is recently prominent as a natural, anticancerogenic drug was achieved and the cytotoxic effect of the particles was determined in the cell culture systems.

In the first step, the PBAT particles without curcumin was synthesized. Due to the results two type of particles having the optimum morphological properties at micro and nano scale were selected and these particles were used for the further studies. The particles which were prepared with 1% PBAT, 1% poly(vinyl alcohol) (PVA) were represented as microparticles and the particles which were prepared with 1% PBAT, 1.5% didodecyldimethylammonium bromide (DMAB) were represented as nanoparticles. The dimensions of the prepared PBAT micro and nanoparticles were  $1.05 \pm 0.53 \mu\text{m}$  and  $0.38 \pm 0.18 \mu\text{m}$ , respectively. Then the

loading of curcumin to the PBAT micro and nanoparticles was achieved. The highest encapsulation efficiencies of PBAT micro and nanoparticles were obtained when weight ratio of PBAT and curcumin was 10. The encapsulation efficiencies of PBAT micro and nanoparticles were determined as  $80 \pm 5\%$  and  $90 \pm 3\%$ , respectively. The chemical and thermal properties of PBAT micro and nanoparticles with and without curcumin loading were determined in detail and the presence of curcumin in the structure was shown.

The *in-vitro* release studies of curcumin loaded PBAT micro and nanoparticles were performed and the release kinetics of curcumin was investigated in this step. It was determined that curcumin was released from curcumin loaded micro and nanoparticles at the ratio of 49 % and 73 %, respectively for 22 days period. It was seen that the release of curcumin from microparticles was occurred slower than that of nanoparticles. It was determined that the release of curcumin from both particles was fitted to Higuchi release kinetics model due to the curcumin release kinetics.

In the last step, the cytotoxic effects of PBAT micro and nanoparticles with and without curcumin loading were determined using monolayer culture of MG-63 human osteosarcoma cells and MC3T3-E1 rat preosteoblasts. The viability and generation of the cells were monitored via the MTT (3-[4,5-dimethylthiazol-2-yl]-2,5-diphenyltetrazolium bromide) analysis and the cell morphologies were observed with images of optical microscopy and fluorescence microscopy. It was determined that the particles inhibited MG-63 cells and they were not caused a cytotoxic effect on MC3T3-E1 cells. The anticarcinogenic effect of curcumin on cell cycle was analyzed with flow cytometry. It was determined that curcumin inhibited MG-63 cells at the G0/G1 phase and it did not cause a significant effect on MC3T3-E1 cells.

**Key words:** Poly(butylene adipate-co-terephthalate), microparticles, nanoparticles, curcumin release, emulsion preparation-solvent evaporation, biodegradable polymers, osteosarcoma cells, preosteoblast cells.

## TEŞEKKÜR

Değerli bilgi ve tecrübesi ile çalışmalarına ışık tutan, desteğini, emeğini her zaman hissettiğim, araştırma grubuna beni kabul ettiği için büyük mutluluk duyduğum, nezaketi, titizliği, çalışma disiplini ve anlayışı ile kendisini her zaman örnek alacağım çok sevgili hocam Prof. Dr. Menemşe Gümüşderelioğlu'na emeği, zamanı, sevgisi ve sağladığı tüm olanaklar için sonsuz saygı ve teşekkürlerimi sunarım.

Özverisi, çalışma şevki, sevgi dolu kalbi, bakış açılarıyla her zaman beni cesaretlendiren ve hücrelerimiz ve partiküllerimizle tatlı bir ekip olarak çok çok mutlulukla çalıştığım, birlikte tüm zorlukların üstesinden heyecanla, mutlulukla, azimle geldiğimiz, saatlerce gülerken, keşfederek, araştırarak çalıştığımız, sohbetine doyamadığım canım dostum Şeyma Bektaş'a bilgi ve tecrübelerini benimle paylaştığı için ve her zaman yanımda olduğu için çok çok teşekkür ederim.

Her zaman, her konuda birbirimize destek olduğumuz, marshmallowlu, kahveli, çaylı, geceli, gündüzlü anıları paylaştığımız muhteşem dördlünün elemanlarından, bizi her zaman güldürmeyi başaran, yemeklerine doyamadığımız, anaç üyemiz canım Tuğçe'ye, belki yemeklerine olmasa da sohbetine, bakış açılarına hiç doyamadığımız canım Şeyma'ya, ilginç bilgi paylaşımlarıyla sohbetlerimizi renklendiren canım Elvan'a çok teşekkür ederim. Çalışmamın başında beni laboratuvara alıştıran canım Aysu'ya kilometrelerce uzaklardan bile yanımda olduğu için çok teşekkür ederim.

Yardımlarını esirgemeyen, sistemli ve sevgi dolu bir çalışma ortamı sağlayan pek sevgili laboratuvar arkadaşlarım; Dr. Merve Çapkın Yurtsever'e, Dr. Işıl Gerçek Beşkardeş'e, Dr. Anıl Sera ve Dr. Soner Çakmak'a, Dr. Murat Şimşek'e, Gökçe Kaynak Bayrak'a, Özge Ekin Tunçay'a, Arş. Gör. Damla Çetin Altındal'a, Dr. Farzin Sana'ya, Dr. Tuğrul Tolga Demirtaş'a, Dr. Gamze Dereli Can'a, Gülseren Irmak'a, Demet Çakır'a ve Meltem Gamze Öztürk'e teşekkürlerimi sunarım.

Bu süreçte her zaman yanımda olan sevgili arkadaşlarım Aykut'a, Özgün'e, Püren'e, Engin'e, Ozan'a, Gülçin'e ve Eda'ya çok çok teşekkür ederim.

Her zaman yanımda, bana her konuda destek olan, canımın içi ablam Emel Tamahkar Irmak'a ve canım abim Sercan Irmak'a, desteğini, sevgisini hiçbir



zaman esirgemeyen canım annem Fatma Tamahkar'a ve canım babam Ertuğrul Tamahkar'a sonsuz teşekkürlerimi sunarım.



# İÇİNDEKİLER

Sayfa

ÖZET.....	i
ABSTRACT .....	iii
TEŞEKKÜR.....	v
İÇİNDEKİLER.....	vii
ÇİZELGELER DİZİNİ.....	xi
ŞEKİLLER DİZİNİ.....	xii
SİMGELER VE KISALTMALAR .....	xvi
1. GİRİŞ .....	1
2. GENEL BİLGİLER.....	3
2.1. Kontrollü Salım Sistemleri.....	3
2.2. Partiküler Formdaki İlaç Salım Sistemleri .....	6
2.2.1. Mikropartiküller .....	7
2.2.2. Nanopartiküller .....	8
2.2.3. Partikül Üretim Yöntemleri.....	9
2.3. Kontrollü İlaç Salım Sistemlerinde Kullanılan Matematiksel Modeller.....	13
2.4. İlaç Salım Sistemlerinde Kullanılan Biyomalzemeler .....	15
2.4.1. Sentetik Polimerler.....	15
2.4.2. Doğal Polimerler .....	16

2.5.	Poli(bütülenadipat-ko-tereftalat) (PBAT) .....	17
2.5.1.	PBAT'ın Özellikleri ve Kullanım Alanları .....	18
2.5.2.	PBAT'ın Biyoyumluluğu ve Biyobozunurluğu .....	20
2.5.3.	PBAT'ın İlaç Salım Sistemlerinde Kullanımı .....	22
2.6.	Kurkumin .....	23
2.6.1.	Kurkuminin İlaç Salım Sistemlerinde Kullanımı .....	25
2.6.2.	Kurkuminin Antikanserojen Etkisi .....	27
3.	DENEYSEL ÇALIŞMALAR .....	30
3.1.	Kullanılan Malzemeler .....	30
3.2.	PBAT Mikro ve Nanopartiküllerin Üretimi.....	31
3.2.1.	Kurkumin Yüklü Olmayan PBAT Mikro ve Nanopartiküllerin Üretimi .....	31
3.2.2.	Kurkumin Yüklü PBAT Mikro ve Nanopartiküllerin Üretimi.....	32
3.3.	Karakterizasyon Çalışmaları .....	33
3.3.1.	Partikül Boyutunun Belirlenmesi .....	33
3.3.1.1.	Taramalı Elektron Mikroskop (SEM) Analizi .....	33
3.3.1.2.	Dinamik Işık Saçılım (DLS) Analizi.....	33
3.3.2.	Atomik Kuvvet Mikroskobu (AFM) Analizi .....	33
3.3.3.	Fourier Dönüşümlü Kızılötesi Spektroskopisi (FTIR) Analizi.....	34
3.3.4.	Termogravimetrik-Diferensiyal Termal Analiz (TG-DTA) .....	34
3.3.5.	X Işını Kırınımı (XRD) Analizi .....	34
3.4.	Kurkumin Yüklü PBAT Mikro ve Nanopartiküllerin Enkapsülasyon Verimlerinin Belirlenmesi.....	34

3.5. <i>İn-vitro</i> Kurkumin Salım Deneyleri .....	35
3.6. Hücre Kültür Çalışmaları.....	36
3.6.1. İnhibitör Konsantrasyonunun Belirlenmesi.....	37
3.6.1.1. Kurkuminin İnhibitör Konsantrasyonunun Belirlenmesi .....	37
3.6.1.2. Kurkumin Yüklü PBAT Nanopartiküllerin İnhibitör Konsantrasyonunun Belirlenmesi.....	38
3.6.1.3. Optik Mikroskop ile Analiz .....	39
3.6.2. Sitotoksosite Analizleri .....	39
3.6.2.1. MTT Analizi .....	39
3.6.2.2. Canlı-Ölü Hücre Analizi.....	40
3.6.2.3. Hücre Canlılığı ve Morfolojisinin Görüntülenmesi .....	40
3.6.3. Hücre Döngü Analizi.....	41
4. SONUÇLAR VE TARTIŞMA .....	43
4.1. PBAT Partiküllerin Karakterizasyon Çalışmaları .....	44
4.1.1. Partikül Boyutunun Belirlenmesi .....	44
4.1.1.1. Taramalı Elektron Mikroskop (SEM) Analizi.....	47
4.1.1.2. Dinamik Işık Saçılım Analizi .....	52
4.1.2. Fourier Dönüşümlü Kızılötesi Spektroskopisi (FTIR) Analizi.....	54
4.1.3. Termogravimetrik-Diferensiyal Termal Analiz (TG-DTA) .....	55
4.1.4. X Işını Kırınımı (XRD) Analizi .....	57
4.1.5. Kurkumin Yüklü PBAT Mikro ve Nanopartiküllerin Enkapsülasyon Verimlerinin Hesaplanması.....	58

4.2. Kurkumin Yüklü PBAT Mikro ve Nanopartiküllerden Kurkumin Salım Çalışmaları ve Salım Kinetiklerinin İncelenmesi .....	59
4.3. Hücre Kültür Çalışmaları.....	61
4.3.1. İnhibitör Konsantrasyonunun Belirlenmesi.....	62
4.3.1.1. Kurkuminin İnhibitör Konsantrasyonunun Belirlenmesi .....	62
4.3.1.2. Optik Mikroskop Analizi.....	67
4.3.1.3. Kurkumin Yüklü PBAT Nanopartiküllerin İnhibitör Konsantrasyonunun Belirlenmesi.....	69
4.3.2. Sitotoksosite Analizleri .....	72
4.3.2.1. MTT Analizi .....	72
4.3.2.2. Optik Mikroskop Analizi.....	75
4.2.1.1. Hücre Canlılığı ve Morfolojisinin Görüntülenmesi .....	76
4.3.3. Canlı-Ölü Analizi.....	82
4.3.4. Hücre Döngü Analizi.....	88
5. GENEL SONUÇLAR .....	91
KAYNAKLAR.....	94
EKLER .....	111
EK-1 .....	111
EK-2 .....	112
ÖZGEÇMİŞ .....	113

## ÇİZELGELER DİZİNİ

Çizelge 2.1. Partikül üretim yöntemlerinin çeşitli kriterlere göre değerlendirilmesi. .....	13
Çizelge 2.2. Literatürdeki PBAT'la ilgili çalışmalardan bazı örnekler. ....	17
Çizelge 2.3. PBAT'ın ticari isimleri [86].....	18
Çizelge 2.4. Ecoflex®'in fiziksel özellikleri [87, 88].....	19
Çizelge 2.5. Kurkuminin modern tıpta etki ettiği hastalıklar [99]. ....	26
Çizelge 4.1. PBAT mikro ve nanopartiküllerin boy ve boy dağılımları .....	45
Çizelge 4.2. PBAT mikro ve nanopartiküllerin kurkumin enkapsülasyon verimleri.46	
Çizelge 4.3. Kurkumin içeren PBAT mikro ve nanopartiküllerin çapları. ....	47
Çizelge 4.4. Partiküllerin DLS ve SEM analizleri ile elde edilen boy ve boy dağılımlarının karşılaştırılması.....	54
Çizelge 4.5. Kurkumin yüklü PBAT partiküllere ait enkapsülasyon verimleri. ....	59
Çizelge 4.6. Kurkumin yüklü PBAT mikro ve nanopartiküllerin salım kinetikleri. ..	61

## ŞEKİLLER DİZİNİ

Şekil 2.1 Kandaki ilaç konsantrasyonunun zamanla değişimi.....	5
Şekil 2.2 Biyobozunur salım sistemi. ....	5
Şekil 2.3. Mikropartiküllerin farklı türleri, (a) katı ilaç molekülleri içeren mikrokapsül rezervuar sistemi, (b) ilaç çözeltisi içeren mikrokapsül, (c) katı ilaç molekülleri içeren mikrokapsül, (d) katı süspansiyonları içeren mikrokapsül, (e) katı ilaç içeren mikroküre matris sistemi. ....	7
Şekil 2.4. İlaç taşıyıcı sistem olarak biyobozunur nanopartiküllerin şematik gösterimi.....	9
Şekil 2.5 Partikül üretim tekniklerinin sınıflandırılması.....	10
Şekil 2.6 Partikül üretim tekniklerinin şematik gösterimi; (A) Nanoçöktürme, (B) Emülsiyon hazırlama temelli teknikler; tuzla çökeltme, çözücü difüzyonu, çözücü buharlaştırma. ....	11
Şekil 2.7. PBAT'ın bileşenleri (a) ve PBAT'ın (b) kimyasal yapısı. ....	18
Şekil 2.8. Kurkuminin yapısı, izolasyonu ve ekstraksiyonu. Marketlerde yaygın olarak satılan kurkumin kapsülleri, hapları, pastilleri, bantları ve kremi. Asidik, bazik, nötr zerdeçal ve kurkumin .....	23
Şekil 2.9. Kurkuminin ticari içeriğindeki moleküllerin kimyasal yapıları: (a) kurkumin, (b) demetoksikurkumin, (c) bis-demetoksikurkumin. ....	25
Şekil 2.10. Hücre döngüsü. ....	28
Şekil 2.11. Kurkuminin hücre döngüsünde etki ettiği fazların şematik gösterimi ..	29
Şekil 3.1 Emülsiyon hazırlama-çözücü buharlaştırma yöntemi ile PBAT partikül üretiminin şematik gösterimi. ....	32
Şekil 3.2. Hemositometrik hücre sayımı sonucu elde edilen MC3T3-E1 üreme grafiği. ....	36
Şekil 3.3. Hemositometrik hücre sayımı sonucu elde edilen MG-63 üreme grafiği. ....	37
Şekil 4.1. SASA firmasından temin edilen PBAT reçinelerinin <sup>13</sup> C-NMR spektrumu. ....	43

Şekil 4.2. PBAT mikropartiküllerin SEM görüntüleri. (D, ortalama çap değerini ifade etmektedir.) .....	48
Şekil 4.3. PBAT nanopartiküllerin SEM görüntüleri. (D, ortalama çap değerini ifade etmektedir.) .....	50
Şekil 4.4. Kurkumin yüklü PBAT mikropartiküllerin SEM görüntüleri. (D, ortalama çap değerini ifade etmektedir.) .....	52
Şekil 4.5. Kurkumin yüklü olmayan PBAT mikropartiküllerin DLS analizine ait boy ve boy dağılımları. ....	53
Şekil 4.6. Kurkumin yüklü PBAT mikropartiküllerin DLS analizine ait boy ve boy dağılımları.....	53
Şekil 4.7. Kurkumin yüklü olmayan PBAT nanopartiküllerin DLS analizine ait boy ve boy dağılımları. ....	53
Şekil 4.8. Kurkumin yüklü PBAT nanopartiküllerin DLS analizine ait boy ve boy dağılımları.....	54
Şekil 4.9. Kurkumin yüklü ve yüklü olmayan PBAT mikro ve nanopartiküller ile PBAT, kurkumin, PVA ve DMAB'ye ait FTIR spektrumları. (NP: nanopartikül, MP: mikropartikül).....	55
Şekil 4.10. PBAT (a), PBAT mikropartiküller (b), PBAT nanopartiküller (c), kurkumin (d), Kurkumin yüklü PBAT mikropartiküller (e) ve Kurkumin yüklü PBAT nanopartiküllere (f) ait termogravimetrik analiz sonuçları. ....	56
Şekil 4.11. Kurkumin yüklü PBAT a) mikro ve b) nanopartiküller, c) kurkumin d) PBAT'a ait XRD desenleri. ....	58
Şekil 4.12. Kurkumin yüklü PBAT mikro ve nanopartiküllerden kurkuminin % kümülatif salımı. (NP : nanopartikül, MP: mikropartikül) .....	60
Şekil 4.13. Farklı kurkumin konsantrasyonlarına karşılık gelen MG-63 hücrelerine ait % hücre canlılığı. ....	63
Şekil 4.14. Kurkumin inhibitör konsantrasyonunun belirlenmesi.....	63
Şekil 4.15. Farklı kurkumin konsantrasyonlarının MC3T3-E1 hücre canlılığına etkisi. ....	64



Şekil 4.16. MC3T3-E1 hücrelerinde % 50 hücre canlılığının elde edildiği kurkumin konsantrasyonunun belirlenmesi.....	65
Şekil 4.17. Kurkuminin çözücüsü olarak kullanılan DMSO'nun MG-63, (a) ve MC3T3-E1, (b) hücrelerinin canlılığına etkisi.....	66
Şekil 4.18. Farklı kurkumin konsantrasyonlarının MG-63 hücreleri üzerindeki etkilerinin 1. gün optik mikroskop görüntüleri, (10X).....	68
Şekil 4.19. Farklı kurkumin konsantrasyonlarının uygulandığı MC3T3-E1 hücrelerine ait optik mikroskop görüntüleri, (10X). ....	69
Şekil 4.20. 17 µM kurkumin içeren PBAT nanopartiküllerin MG-63 hücre canlılığına etkisi. ....	70
Şekil 4.21. Farklı kurkumin derişimindeki kurkumin yüklü PBAT nanopartiküllerin MG-63 hücrelerinin canlılığına etkisi. ....	70
Şekil 4.22. Kurkumin yüklü PBAT nanopartiküller için farklı kurkumin inhibitör konstrasyonlarının MG-63 hücre canlılığına etkisi.....	71
Şekil 4.23. Farklı kurkumin derişimindeki kurkumin yüklü PBAT nanopartiküllerin MC3T3-E1 hücrelerinin canlılığına etkisi. ....	72
Şekil 4.24. 17 ve 6 µM kurkumin yüklü PBAT mikro ve nanopartiküllerin MG-63 hücreleri üzerindeki etkisinin zamana göre değişimi. ....	73
Şekil 4.25. Kurkumin içeren PBAT mikro ve nanopartiküllerin MC3T3-E1 hücrelerinin canlılığına olan etkisi.....	74
Şekil 4.26. Kurkumin içermeyen PBAT mikro ve nanopartiküllerin (a) MG-63 ve (b) MC3T3-E1 hücrelerinin canlılığına olan etkisi. ....	74
Şekil 4.26. Kurkumin yüklü PBAT mikro ve nanopartiküllerinin MG-63 ve MC3T3-E1 hücreleri üzerindeki etkilerinin 1. gün optik mikroskop görüntüleri: (a) MG-63 kontrol; (b) MC3T3-E1 kontrol; kurkumin yüklü PBAT mikropartiküllerin MG-63, (c) ve MC3T3-E1 (d) hücrelerindeki etkisi; kurkumin yüklü PBAT nanopartiküllerin MG-63, (e) ve MC3T3-E1 (f) hücrelerindeki etkisi, (10X). ....	76
Şekil 4.27. MG-63 hücrelerinin uygulama sonrası F-aktin (yeşil)-DAPI (mavi) boyama görüntüleri; (a) MG-63, (b) 17 µM kurkumin, (c) 6 ve (d) 10 µM kurkumin içeren nanopartiküller, (e) 17 ve (f) 30 µM kurkumin içeren mikropartiküller. ....	78

Şekil 4.28. MG-63 hücrelerine ait F-aktin (yeşil)-DAPI (mavi) boyama görüntüleri; (a) MG-63, (b) 6 ve (c) 10 µM kurkumin içermeyen PBAT nanopartiküller, (d) 17 ve (e) 30 µM kurkumin içermeyen PBAT mikropartiküller. ....	79
Şekil 4.29. MC3T3-E1 hücrelerinin uygulama sonrası F-aktin (yeşil)-DAPI (mavi) boyama görüntüleri; (a) MG-63, (b) 17 µM kurkumin, (c) 6 ve (d) 10 µM kurkumin içeren nanopartiküller, (e) 17 ve (f) 30 µM kurkumin içeren mikropartiküller. ....	80
Şekil 4.30. MC3T3-E1 hücrelerine ait F-aktin (yeşil)-DAPI (mavi) boyama görüntüleri; (a) MG-63, (b) 6 ve (c) 10 µM kurkumin içermeyen PBAT nanopartiküller, (d) 17 ve (e) 30 µM kurkumin içermeyen PBAT mikropartiküller. ....	81
Şekil 4.31. MG-63 hücrelerinin uygulama sonrası canlı (yeşil)-ölü (kırmızı) analizi görüntüleri; (a) MG-63, (b) 17 µM kurkumin, (c) 6 ve (d) 10 µM kurkumin içeren nanopartiküller, (e) 17 ve (f) 30 µM kurkumin içeren mikropartiküller. ....	83
Şekil 4.32. MC3T3-E1 hücrelerinin uygulama sonrası canlı (yeşil)-ölü (kırmızı) analizi görüntüleri; (a) MC3T3-E1, (b) 17 µM kurkumin, (c) 6 ve (d) 10 µM kurkumin içeren nanopartiküller, (e) 17 ve (f) 30 µM kurkumin içeren mikropartiküller. ....	85
Şekil 4.33. MG-63 hücrelerine ait canlı (yeşil)-ölü (kırmızı) analizi görüntüleri; (a) MG-63, (b) 6 ve (c) 10 µM kurkumin içermeyen PBAT nanopartiküller, (d) 17 ve (e) 30 µM kurkumin içermeyen PBAT mikropartiküller. ....	86
Şekil 4.34. MC3T3-E1 hücrelerine ait canlı (yeşil)-ölü (kırmızı) analizi görüntüleri; (a) MC3T3-E1, (b) 6 ve (c) 10 µM kurkumin içermeyen PBAT nanopartiküller, (d) 17 ve (e) 30 µM kurkumin içermeyen PBAT mikropartiküller (10X). ....	87
Şekil 4.35. Akış sitometrisi analizinde G1, S ve G2 fazlarında bulunan birim hücre miktarları. ....	88
Şekil 4.36. Kurkumin yüklü PBAT mikro ve nanopartiküllerin akış sitometri analizi sonucu G0/G1, S ve G2/M fazlarında bulunan MG-63 hücrelerine ait yüzde hücre miktarları. ....	90
Şekil 4.37. Kurkumin yüklü PBAT mikro ve nanopartiküllerin akış sitometri analizi sonucu G0/G1, S ve G2/M fazlarında bulunan MC3T3-E1 hücrelerine ait yüzde hücre miktarları. ....	90

## SİMGELER VE KISALTMALAR

### Simgeler

$\mu$ : Mikro

CO<sub>2</sub>: Karbondioksit

HCl: Hidroklorik asit

nm: Nanometre

K<sub>0</sub>: Sıfırıncı derece kinetik sabiti

K<sub>1</sub>: Birinci derece kinetik sabiti

K<sub>H</sub>: Higuchi kinetik sabiti

K<sub>HC</sub>: Hixson-Crowel kinetik sabiti

### Kısaltmalar

PBAT: Poli(bütülenadipat-ko-tereftalat)

PVA: Poli(vinil alkol)

DMAB: Didodesildimetilamonyum bromür

DMEM: Dulbecco's Modified Eagle Medium

$\alpha$ -MEM: Minimum Essential Medium-Alpha Modification

SEM: Taramalı elektron mikroskobu

DSC: Diferansiyel taramalı kalorimetri

D-PBS+: Dulbecco fosfat tampon çözeltisi

PBS: Fosfat tampon çözeltisi

DLS: Dinamik ışık saçılımı

FTIR: Fourier dönüşümlü kızılötesi spektroskopisi

XRD: X-ışını kırınımı

TGA: Termogravimetrik analiz

FDA: Food and Drug Administration

MTT: 3-[4,5-dimetilazol-2-il]-difenilterazolyum bromür

DCM: Diklorometan

DMSO: Dimetil sülfoksit

MC3T3-E1: Fare kemik öncül hücreleri

MG-63: İnsan kemik kanseri hücreleri

BA: Bütilen adipat

BT: Bütilen tereftalat

MA: Molekül ağırlığı



# 1. GİRİŞ

Kontrollü ilaç sistemleri, ilaç derişiminin belirli bir aralıkta tutularak uzun süreli ve etkili tedavi sağlanması amacıyla geliştirilen ilaç taşıyıcı sistemlerdir [1, 2]. Böylelikle ilacın etkin doz aralığında kalması sağlanarak olası yan etkilerden hastanın korunması hedeflenmektedir. Ayrıca ilacın sürekli alımının ortadan kalkmasıyla hastanın yaşam kalitesi artmaktadır. İlk olarak 1952'de geliştirilmelerinden günümüze kadar kontrollü ilaç salım sistemleri üzerinde pek çok çalışma yapılmış ve ticari ürün piyasaya sürülmüştür [3].

Partiküler sistemler yüksek yükleme kapasiteleri, geniş yüzey alanları, immün sistem tarafından tanınmaması, yüzey modifikasyonuna olanak tanınmaları, spesifik doku hedeflendirmesini mümkün kılmaları, hücreler arasındaki fizyolojik bariyerlerden geçit sağlayabilmeleri gibi avantajları nedeniyle ilaç taşıyıcı olarak sıklıkla tercih edilmektedir [4, 5]. Partiküler sistemlerde ilaç dozunun, boyutun ve ilaç salım mekanizmasının ayarlanabilmesi bu sistemlerin en önemli avantajlarıdır

Biyobozunur mikropartiküller ve nanopartiküller vücut içinde tamamen bozunduklarından dolayı cerrahi bir işlem gerektirmeyerek ilaç taşıyıcı sistemler için önemli bir potansiyel sunmaktadırlar. Ayrıca ilaç salım hızının kontrol edilebilir olması ve kolay hazırlanabilmeleri sayesinde kontrollü salım sistemlerinde sıklıkla tercih edilirler [6].

Alifatik poliestерler, yüksek biyobozunurluk özellikleri nedeniyle ilaç taşıyıcı sistemlerinde yaygın olarak kullanılmaktadır. Ancak bu tip polimerlerin mekanik ve termal dayanımlarının zayıf olması kullanım açısından bazı kısıtlamalar getirmektedir [7]. Aromatik poliestерlerin yüksek mekanik ve termal özelliklerinin yanında biyobozunurluk davranışları zayıftır [8]. Oysa alifatik-aromatik kopoliesterler hem yüksek biyobozunurluk hem de yüksek mekanik ve termal özelliklere sahip olmaları ile ilaç taşıyıcı sistemler için önemli potansiyel sunarlar [9]. Poli(bütülenadipat-ko-tereftalat) (PBAT) 1,4-bütandiol, tereftalik asit ve adipik asidin polikondenzasyonu ile üretilen bir alifatik-aromatik kopoliesterdir. Son

yıllarda PBAT'ın biyouyumlu ve biyobozunur olması nedeniyle biyomedikal alanda kullanımını artış göstermiştir [10].

Kurkumin son zamanlarda antioksidan, antiinflamatuvar, antikanserojen, antidiyabetik ve antimikrobiyal bir ilaç olması nedeniyle modern tıpta da kullanılmaya başlanmıştır. Bu amaçla pek çok farklı formda ilaç taşıyıcı sistemi ile kontrollü salım sistemi olarak kullanımına yönelik çalışmalar mevcuttur [11, 12].

Sunulan tez çalışması kapsamında, antikanserojen ilaç olan kurkuminin kontrollü salımı için PBAT mikropartikül ve nanopartikül sistemlerinin geliştirilmesi amaçlanmıştır. Çalışmanın ilk bölümünde PBAT mikropartiküller ve nanopartiküller emülsiyon hazırlama-çözücü buharlaştırma yöntemi ile hazırlanmıştır. Bu partiküllerin uygun morfolojik özellikte hazırlanmalarının ardından partiküllere antikanserojen nitelikli bir ilaç olan kurkumin yüklenmiş ve partiküllerin kurkumin enkapsülasyon verimleri belirlenmiştir. Kurkumin yüklü olan ve olmayan PBAT mikropartiküller ve nanopartiküller çeşitli karakterizasyon yöntemleri ile kimyasal, termal ve morfolojik olarak incelenmiştir. Çalışmanın ikinci bölümünde hazırlanan partiküllerden ilaç salımı *in-vitro* koşullarda gerçekleştirilmiştir ve kurkumin salım kinetikleri incelenmiştir.

Çalışmanın son bölümünde ise, kurkumin inhibitör konsantrasyonunun belirlenmesinin ardından hazırlanan kurkumin yüklü mikro ve nanopartiküllerin MG-63 insan osteosarkoma ve MC3T3-E1 fare osteoblast hücreleri üzerindeki sitotoksik etkileri incelenmiştir. Sitotoksitelerinin incelenmesinde hücre canlılıkları ve üremeleri MTT (3-[4,5-dimetiltiazol-2-il]-2,5-difeniltetrazolyum bromür) analizi ile belirlenmiş, hücre canlılıkları ve morfolojileri optik mikroskop ve floresan mikroskopu ile takip edilmiştir. Son olarak kurkumin yüklü PBAT mikro ve nanopartiküllerin MC3T3-E1 ve MG-63 hücrelerinde hücre döngüsünün hangi fazlarına etki ettiği akış sitometre analizi ile incelenmiştir.

## 2. GENEL BİLGİLER

Bu bölümde tez kapsamında yapılan çalışmalara temel oluşturan konular hakkında literatür bilgisi verilmiştir. Sunulan tez çalışması partiküler formda kontrollü ilaç salım sistemlerinin geliştirilmesi ve bu sistemlerin ilaç salımındaki ve hücre kültüründeki etkinliklerinin değerlendirilmesi çalışmalarını kapsamaktadır. Bu bölümde öncelikle kontrollü ilaç salım sistemlerinin özellikleri, kontrollü ilaç salım sistemlerinde kullanılan partiküler sistemler ve bu sistemlerin hazırlanma yöntemleri anlatılmıştır. Daha sonra kontrollü ilaç sistemlerinde sıklıkla kullanılan polimerlere değinilmiş ve çalışmada kullanılan PBAT polimerinin özellikleri ayrıntılı olarak anlatılmıştır. Son kısımda ise, bu çalışmada antikanserojen etkileri incelenen kurkuminin özellikleri hakkında bilgi verilmiştir.

### 2.1. Kontrollü Salım Sistemleri

Kontrollü salım sistemleri, farmasötik bileşenlerin kontrollü bir şekilde verilerek insanlar ve hayvanlar üzerinde terapötik etki sağlaması amacıyla geliştirilmişlerdir. Tüm kontrollü salım sistemlerinde ilacın vücuda doğrudan verilmesi yerine, uzun periyotlarda belli doz aralıklarında salımı sağlanarak ilacın etkin doz aralığında kalması ve toksik yan etkiler oluşturmaması amaçlanmaktadır [13, 14]. Böylelikle ilaç salım sistemleri, var olan ilaçlar için yeni sistemlerde kullanım potansiyeli yaratmış ve sürekli ilaç alımını gerektirmemeleri nedeniyle hastaların yaşam kalitesini arttırmıştır [15]. Kontrollü ilaç salım sistemleri bunların yanında ilaç moleküllerinin fizyolojik bariyerlerden geçişini kolaylaştırabilir, yıkıma karşı koruyabilir ve istenen yerde etki etmesini sağlayabilirler [16].

Kontrollü ilaç salım sistemleri makro sistemler olarak 1960'lı yılların başında bir grup araştırmacı tarafından geliştirilmiştir. İlk kontrollü salım metodolojisi 1962 yılında, temel olarak küçük moleküllerin (molekül ağırlığı < 500) silikon kauçuk tüp duvarındaki difüzyonuna dayandırılarak uygulanmıştır. Yapılan çalışmada silikon kauçukla paralel damar hattı oluşturularak tavşan kanına anestezi gazi sirküle edilmiş ve bunun sonucunda tavşanların anestezi etkisinde kaldıkları görülmüştür [17]. Yapılan çalışmada sabit hızda ilaç salımı amaçlanmıştır.

1960'lı yıllarda lipozomlar ile birlikte ilaç-polimer konjugatları gündeme gelmiş ve 1970'lerde nano ilaç salım sistemleri (nDDS) geliştirilmiştir [18]. Bu sistemler mikro sistemler yanında daha küçük boyutlara sahip olmaları nedeniyle spesifik

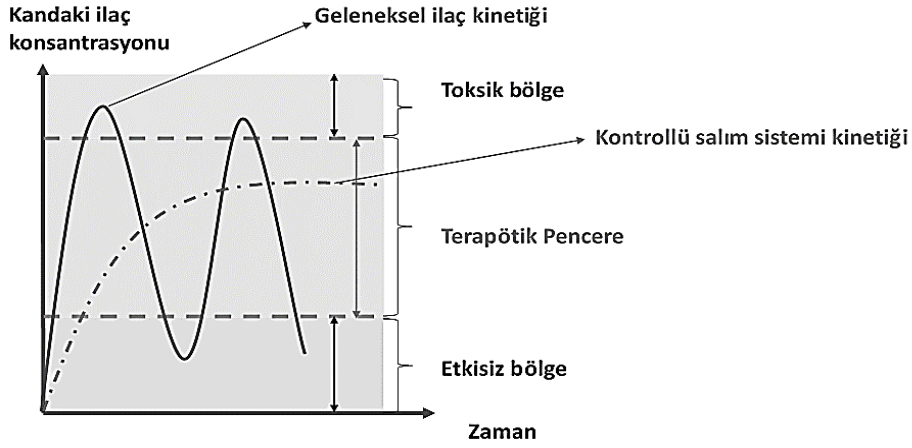
hedeflemeye imkan sunmuşlar ve yan etkileri azaltarak uzun periyotlu salım sağlamışlardır [19].

FDA (Food and Drug Administration) tarafından onaylı AmBisome® ticarileşen ilk nano kontrollü salım sistemi (nDDS) olmuştur [20]. 1990'larda Ambisome'un FDA'dan onay alması ve ticarileşmesinin ardından ilaç şirketleri arasında rekabet başlamış ve ilaç endüstrisi giderek gelişmiştir. Günümüze kadar birçok yeni ilaç salım sistemi geliştirilmiştir [21].

Park'ın 2014 yılında yayınladığı bir derlemede kontrollü ilaç salım sistemlerinin günümüze kadar olan gelişimi detaylı olarak anlatılmıştır [21]. Yaklaşık 60 yıllık bu gelişim süreci üç nesle ayrılmıştır: 1. nesil 1950-1980, 2. nesil 1980-2010 ve 3. nesil 2010'dan günümüze gelen yılları kapsamaktadır. Birinci nesil kontrollü salım sistemleri iki günde bir ve günde bir alınan oral sistemler ile haftada bir değiştirilen transdermal sistemleri içermektedir. İkinci nesil kontrollü salım sistemleri akıllı polimerler ve hidrojeller kullanılarak tasarlanan taşıyıcı sistemler ile nanoteknoloji bazlı sistemler üzerine yoğunlaşmıştır. Üçüncü nesil kontrollü salım sistemleri ise daha önceki sistemlerin geliştirilmesi, kısıtlamalarının ortadan kaldırılması ve ilacın istenen dokuya ya da organa hedeflendirilmesi üzerine odaklanmıştır.

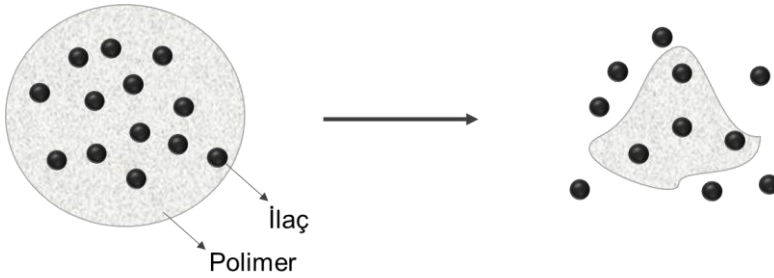
Kontrollü ilaç salım sistemleri ilacın kandaki konsantrasyon seviyelerini uzun süre terapötik sınırlar arasında tutar [22]. Bu sınırlar "terapötik pencere" olarak ifade edilir. Terapötik pencerenin üstündeki konsantrasyonlarda ilacın vücuda toksik, zararlı bir etkisi varken, altındaki konsantrasyonlarda ilaç etkin değerini yitirir (Şekil 2.1). Geleneksel yöntemlerle ilaç alımında kandaki ilaç konsantrasyonu öncelikle toksik değer üzerine çıkıp bir süre sonra etkin değer atına düşer. Bu durum hastanın ilacı sürekli almasını gerektirir. İlaç salım sistemlerinde ilacın her zaman terapötik pencere içerisinde kalması sağlanarak sürekli ilaç alımı sağlanır ve yan etkiler azalır [23].





**Şekil 2.1** Kandaki ilaç konsantrasyonunun zamanla değişimi.

İlaç salım sistemlerinde ilaç, uygun bir biyomalzemenin içine veya yüzeyine tutuklanır ve çeşitli salım mekanizmaları ile malzemeden ilacın salımı gerçekleştirilir. Salım mekanizmaları, ilaçla yüzey arasındaki bağın desorpsiyonu, malzemenin içine tutuklanan ilacın difüze olması veya kullanılan malzemenin erozyona uğrayarak ilacın salınması şeklinde gerçekleştirilebilir [24]. Son yıllarda biyobozunur polimerler kullanılarak hazırlanan sistemler ön plana çıkmaktadır [25]. Biyobozunma polimerin zincir kırılmaları ile molekül ağırlığının azalması şeklinde tanımlanır. Vücut içinde, polimerik taşıyıcı sistemlerin hidrolitik ya da enzimatik olarak bozunması ile taşıyıcı içinde tutuklanan ilaç moleküllerinin salım ortamında kontrollü olarak ve uzun süreli salınması sağlanır. Şekil 2.2'de bu mekanizma gösterilmiştir [26].



**Şekil 2.2** Biyobozunur salım sistemi.

Birçok basit ilaç salım sisteminde patlama etkisi (burst effect) denilen durumla karşılaşılır. Bu etki ilaç salım sisteminin yüzeyine yakın kısımda tutuklanan ilacın salım periyodunun hemen başlangıcında malzemeden hızla difüzyonu veya

desorpsiyonuna dayanır [27, 28]. İlacın patlama etkisi ile olan hızlı salımı yan etkilere neden olabilir ve geciktirilmiş salımın (sustained release) istenildiği uygulamalar için uygun değildir. Patlama etkisine neden olan birçok etken vardır. Bunlar; madde-ilaç arasındaki zayıf etkileşim, ilacın yüzeye iyi tutunmaması veya yüzeyde olması ve uygun olmayan polimer konjugatların kullanılması (örneğin; küçük molekül ağırlıklı polimerlerden oluşan nDDS'ler yüksek patlama etkisine sahiptirler) olarak açıklanabilir [29, 30]. Bu etkiyi azaltmak için mikrokürelerin jelatin filmle kaplanması, polimerik mikropartiküllerin içine nanopartiküllerin enkapsüle edilmesi veya hidrojen bağlarının oluşturulması sağlanarak madde ilaç arasındaki etkileşimin kuvvetlendirilmesi gibi bazı yaklaşımlar geliştirilmiştir [30, 31].

Malzeme bilimi ve teknolojisinin gelişimiyle birlikte kontrollü salım sistemlerinde de ilerlemeler sağlanmıştır. İlaç salımı için yağlar [32], biyobozunur sentetik polimerler [33], metaller [34] ve antikolar [35] gibi bazı taşıyıcı malzemeler geliştirilmiştir. Sentetik polimerler, biyoyumlu ve biyobozunur olmaları nedeniyle kontrollü salım sistemlerinde en çok tercih edilen malzemelerdir. İlaç salım sistemlerinde sentetik polimer yapılı mikro ve nanopartiküller ilaçların farmasötik ve terapötik etkilerinin geliştirilmesi, doku ve hücrelere spesifik hedefleme sağlanması, ilaç dozunun ayarlanması ve toksik yan etkilerin azaltılmasını mümkün kılmaları gibi avantajları nedeniyle ilgi çekmektedir [36]. Ayrıca mikro ve nanopartiküller kanserli dokulara olan geçirgenlikleri ve tutunma mekanizmaları ile pasif halde kanserli hücrelerde yığılma göstermeleri sonucu etkin ilaç salımı sağlayarak kanser tedavisinde dikkat çekici yöntemler haline gelmiştir [37].

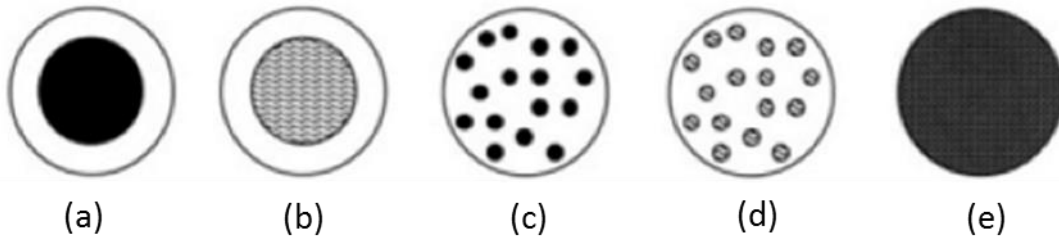
## **2.2. Partiküler Formdaki İlaç Salım Sistemleri**

Partiküler formdaki ilaç salım sistemlerine olan ilgi, yüksek yükleme kapasiteleri, geniş yüzey alanları, immün sistem tarafından tanınmamları, yüzey modifikasyonuna olanak tanımaları, spesifik doku hedeflendirmesini mümkün kılmaları ve hücreler arasındaki fizyolojik bariyerlerden geçit sağlayabilmeleri gibi avantajları nedeniyle giderek artmıştır. Partiküler sistemlerde ilaç dozunun, boyutun ve ilaç salım mekanizmasının ayarlanabilmesi bu sistemlerin en önemli avantajlarıdır [38, 39]. Partiküller, mikron boyutunda (mikropartikül) ya da nano boyutta (nanopartikül) olabilirler.

### 2.2.1. Mikropartiküller

Mikropartiküller, boyutları 1  $\mu\text{m}$  ile 1000  $\mu\text{m}$  arasında değişen mikro taşıyıcılardır [40]. Mikropartiküller ilacın yapısını değiştirmemeleri, salım hızının kontrolünü mümkün kılmaları, kullanılma amacına yönelik olarak istenilen boyutta üretilebilmeleri, herhangi bir cerrahi müdahale gerektirmemeleri, vücutta toksik etki yaratmamaları ve istenen bölgeye hedeflendirilebilmeleri gibi ilaç salım sistemleri için çeşitli avantajlarından dolayı sıklıkla tercih edilmektedirler [41]. Ayrıca ilacın enzimatik bozunmasına karşı etkili bir koruma sağlamaktadırlar. Şekil 2.3'te ilaç taşıyıcı sistem olarak kullanılan mikropartiküllere örnek verilmiştir. Mikropartiküler ilaç salım sistemlerinde küçük moleküllerden, proteinler ve nükleik asitlere kadar çok farklı molekül ağırlıklarında yapıların enkapsülasyonu ve salımı mümkündür [42, 43].

Mikropartiküllerin büyük ölçekte üretimleri ile ticarileşimiş polimerik salım sistemleri geliştirilmiştir. Bunlara örnek olarak Lupron Depot®, Nutropin Depot®, vb. verilebilir [43]. Mikropartiküllerin boyutu ilaç salım hızına etki eden önemli bir faktördür. Partikül boyutu azaldıkça partiküllerin yüzey alanı-hacim oranı artmaktadır, bu da ilaç salım hızının artmasına neden olmaktadır [44]. Boyutun ve malzemenin etkisi ile mikropartiküllerdeki ilaç salım hızı kolaylıkla ayarlanabilmektedir ve bu özellik mikropartiküllerin en büyük avantajıdır.

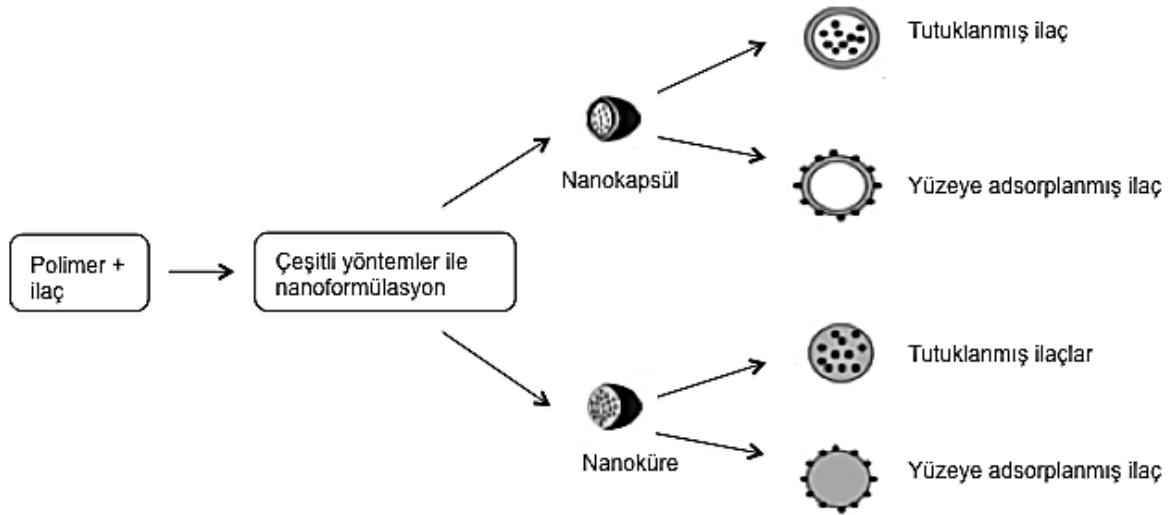


**Şekil 2.3.** Mikropartiküllerin farklı türleri, (a) katı ilaç molekülleri içeren mikrokapsül rezervuar sistemi, (b) ilaç çözeltisi içeren mikrokapsül, (c) katı ilaç molekülleri içeren mikrokapsül, (d) katı süspansiyonları içeren mikrokapsül, (e) katı ilaç içeren mikroküre matriks sistemi [45].

### 2.2.2. Nanopartiküller

Nanoteknolojinin gelişmesi ile birlikte ilaç salım sistemlerinde de nanoyapıların önemi hızla artmıştır [46, 47]. Doğal veya sentetik polimerler, inorganik elementler gibi malzemelerden üretimi mümkün olan nanopartiküller, boyutları 1-1000 nm arasında değişen nanometre ölçeğinde hazırlanan yapılardır. Son yıllarda nanopartiküller yalnızca taşıyıcı olarak değil hedefleme, görüntüleme ve tanı gibi uygulamalar amacıyla sıklıkla kullanılan biyomalzemeler haline gelmiştir [48]. Nanopartiküllerin, fosfolipit, lipit, dekstran, kitosan, çeşitli polimerler ve metallere üretilmeleri mümkündür. Günümüzde nanoteknolojinin hızla gelişmesiyle birlikte nanoteknoloji temelli ilaç formülasyonlarının üretimi hız kazanmıştır. Kanser tedavisi için dünya pazarında bulunan nanopartikül taşıyıcı içeren ilaç formülasyonlarından bazıları Abraxane® (American Bioscience), Doxil® (Johnson&Johnson) ve Myocet® (Sepherion Therapeutics)'tir [49].

Nanopartiküller kullanılarak salımı yapılacak olan ilaç molekülleri nanopartikülün içinde çözülmüş, yüzeyine tutturulmuş ya da kovalent olarak bağlanmış olabilir [50]. Şekil 2.4'te ilaç taşıyıcı sistemi olarak nanopartiküller şematik olarak gösterilmiştir. Nanopartiküllerin geleneksel ilaç salım sistemlerine göre en önemli avantajları üstün fonksiyonallite sağlayan nano boyutları ve boyutlarının ayarlanabilir olmasıdır. Nano boyutlara inildiğinde her maddenin ilk duruma göre farklı fiziksel ve kimyasal karakterler gösterdiği bilinmektedir [51]. İdeal bir ilaç salım sisteminin boyutu kan damarlarından geçemeyecek kadar büyük ve immün sistem tarafından tanınmayacak kadar küçük olmalıdır [52]. Bu anlamda nanopartiküller üstün özellikleri ile ön plana çıkmaktadır. Ayrıca yapılan pek çok çalışmada kanserli ve enflamasyonlu dokularda kan damarlarının 100-600 nm aralığında değişen açıklıklara sahip olduğu rapor edilmiştir [53]. Bu amaca uygun olarak hazırlanan nanopartiküller ilacı istenilen bölgeye etkili bir şekilde taşıyabilmektedir.

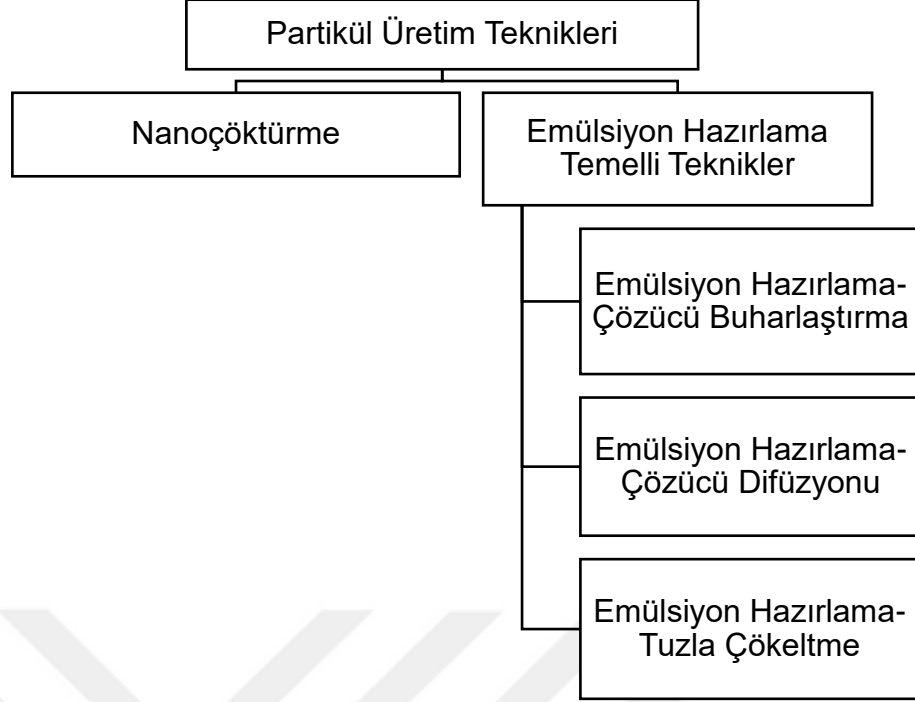


**Şekil 2.4.** İlaç taşıyıcı sistem olarak biyobozunur nanopartiküllerin şematik gösterimi [28].

İlaç salım sistemlerinin kan dolaşımında uzun süre kalabilmesi için immün sistemden korunmaları gereklidir. Bu amaçla kullanılan temel yaklaşım ilaç salım sistemlerinin çeşitli hidrofilik ajanlar ve/veya katyonik/anyonik yüzey kaplama malzemeleri ile yüzey modifikasyonudur [54]. Nanopartiküllerin boyutlarının önemli bir avantaj sunmasının dışında yüzey modifikasyonlarının kolay olması da bir diğer önemli üstünlüğüdür.

### 2.2.3. Partikül Üretim Yöntemleri

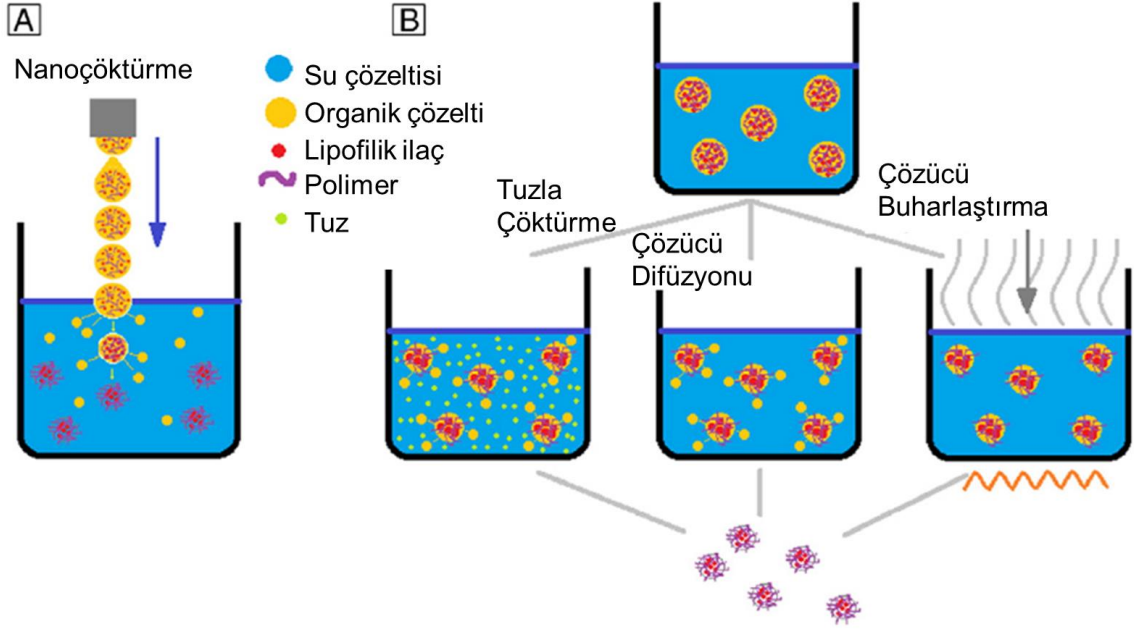
Şekil 2.5'te görüldüğü gibi partikül hazırlama teknikleri temel olarak klasik ve modern teknikler olmak üzere ikiye ayrılmaktadır. Aşağıda bu teknikler anlatılmaktadır. Şekil 2.6'da ise yöntemler şematik olarak açıklanmıştır.



**Şekil 2.5** Partikül üretim tekniklerinin sınıflandırılması [55].

### ***Nanoçöktürme***

Nanoçöktürme aynı zamanda çözücü değiştirme metodu olarak da bilinir. Bu metod genellikle hidrofobik ilaçların enkapsülasyonunda da kullanılır fakat, hidrofilik ilaçlar için de adapte edilebilir. Bu yöntemde polimer ve lipofilik ilaç içeren organik çözücü, suyun içine damla damla ilave edilerek sabit hızda karıştırılır. Böylelikle organik çözücü su içinde difüze olurken ilaç içeren nanopartiküller oluşur [56]. Ardından azalan basınç altında çözücü uzaklaştırılıp partiküller elde edilir. Bu metod peptitler, amfilik siklodekstrinler gibi farklı moleküllere uygulanabilir. Ancak bu işlemin ölçek büyütmesi damla damla ekleme işleminden dolayı zordur. Bu metotta organik çözücünün suyla karışabilirliği, damlanın çapı ve karıştırıcı hızı önemli parametrelerdir. Bu yöntemle diğer yöntemlere göre daha küçük çaplı partiküller elde edilebilir [57].



**Şekil 2.6** Partikül üretim tekniklerinin şematik gösterimi; (A) Nanoçöktürme, (B) Emülsiyon hazırlama temelli teknikler; tuzla çökeltme, çözücü difüzyonu, çözücü buharlaştırma [55].

### ***Emülsiyon hazırlama temelli teknikler***

Emülsiyon hazırlama temelli teknikler genel hatlarıyla iki basamaktan oluşur. İlk basamakta taşıyıcı madde ve ilaç içeren organik çözücü suda dağıtma işlemine tabi tutulur. İkinci basamak ise organik çözücünün buharlaşması, difüzyon veya tuzla çöktürme yöntemleri ile uzaklaştırılmasını içerir. Sonraki aşamada oluşan partiküller yıkanıp kurutulur. Diklorometan, kloroform gibi bazı toksik çözücülerle çalışılması ve homojenizatör, ultrasonikasyon kullanımından dolayı yüksek miktarda enerji gerektirmesi bu yöntemin dezavantajıdır [57]. Bu yöntemde sıcaklık, basınç gibi çözücü buharlaşma koşulları partiküllerin özelliklerini etkilemektedir. Bu yöntemin ilaç salım sistemleri için sıklıkla tercih edilmesinin en önemli nedeni geniş aralıkta partikül boyutu üretimine olanak sağlamasıdır. Partikül üretiminde en büyük problemlerden biri kümelenmedir. Bu yöntemde kullanılan sodyum dodesil sülfat veya poli(vinil alkol) gibi emülsiyon ajanları partiküllerin kümelenmelerini minimize etmektedir.

### ***Emülsiyon hazırlama-çözücü buharlaştırma***

Emülsiyon hazırlama-çözücü buharlaştırma metodu genellikle lipofilik ilaçların enkapsülasyonu için kullanılır. Emülsiyon oluşumunun ardından organik çözücü çeşitli yöntemler ile uzaklaştırılmaktadır. Partikül boyutu, emülsiyon oluşumunun ardından uygulanan homojenizasyon veya sonikasyon işlemlerinin hızı, süresi, organik ve sulu fazların hacimce oranları, polimer ve emülsiyon ajanının çeşidi ve derişimine göre ayarlanabilmektedir. Bu yöntemde partikül damlacıklarının büyüklüğü ilk 40 dk boyunca artma eğilimindedir [58]. Sıcaklık, basınç gibi buharlaşma koşulları partikül kalitesini ve son partikül boyutunu etkilemektedir. Toksik organik çözücünün en etkin şekilde uzaklaştırılması bu yöntem için en kritik noktalardan biridir [59]. Yüksek enkapsülasyon ve düşük patlama etkisi elde edilmesi için yöntem üzerinde yağ/su (o/w), su/yağ (w/o), su/yağ/su (w/o/w), yağ/yağ/su (o/o/w) gibi modifikasyonlar geliştirilmiştir. Bu ifadeler ilk fazın (yağ “(o)” veya su “(w)”) sonraki fazlara eklenme sırasını ifade etmektedir [60]. Bu yöntem, partikül üretim prosesinin kolay olması ve uygulama amacına yönelik olarak istenilen boyutun ayarlanabilir olması gibi üstün avantajları nedeniyle partiküler ilaç salım sistemlerinin hazırlanmasında en çok tercih edilen yöntemlerden biridir [61].

### ***Emülsiyon hazırlama-çözücü difüzyonu***

Emülsiyon hazırlama-çözücü difüzyonu metodu emülsiyon hazırlama-çözücü buharlaştırma metodunun modifiye edilmiş halidir. Bu yöntemde suda kısmen çözünebilen organik çözücüler (benzil alkol, propilen karbonat gibi) kullanılmaktadır. Bu yöntem hidrofobik ilaçlar için kullanılan bir tekniktir. Bu metotta öncelikle yağ/su fazı oluşturularak emülsiyon damlacıkları elde edilmektedir. Ardından elde edilen yağ/su fazı emülsiyon ajanı içeren yüksek miktardaki su fazında seyreltilmektedir. Organik çözücünün damlacıklardan difüzyonu ile malzemedeki kümeleşmeler meydana gelerek partikül oluşumu gerçekleşmektedir. Ardından buharlaşma veya filtrasyon ile organik çözücü uzaklaştırılmaktadır [57].

### ***Emülsiyon hazırlama-tuzla çöktürme***

Emülsiyon hazırlama-tuzla çöktürme metodunda ise organik çözücü olarak suda tamamen çözünebilen bir çözücü kullanılır. Bu yöntemde su fazına yüksek



konsantrasyonda tuz (magnezyum klorür, kalsiyum klorür gibi) veya şeker eklenir. Tuzlu su çözeltisi ile suda tamamen çözünebilen aseton gibi organik bileşiklerin suyla karışması engellenmektedir. Tuzla çökeltme ajanlarının seçimi emülsiyon kararlılığını, enkapsülasyon verimini ve partikül boyutunu etkiler. Bu yöntemin en önemli avantajları daha az toksik organik çözücülerin kullanılabilmesi ve yüksek miktarda emülsiyon ajanı gerektirmemesidir. Dezavantajları ise lipofilik ilaçlar için tercih edilememesi ve yoğun bir yıkama basamağı gerektirmesidir [57, 62].

Çizelge 2.1’de partikül üretim yöntemleri kolay uygulanabilirlik, ölçek büyütme ve toksik madde içeriği kriterlerinin önemine göre düşük, orta ve yüksek ifadeleri ile değerlendirilmiştir.

**Çizelge 2.1.** Partikül üretim yöntemlerinin çeşitli kriterlere göre değerlendirilmesi.

Kriter	Partikül Üretim Yöntemleri			
	Nanoçöktürme	Çözücü Buharlaştırma	Çözücü Difüzyonu	Tuzla Çöktürme
Kolay Uygulanabilirlik	orta	yüksek	orta	yüksek
Ölçek Büyütme	düşük	düşük	düşük	düşük
Toksik Madde İçeriği	düşük	düşük	düşük	yüksek

### 2.3. Kontrollü İlaç Salım Sistemlerinde Kullanılan Matematiksel Modeller

İlaç salımı, enkapsüle edilen materyalin ya da doku iskelesinin bozunması veya ilacın difüzyonu ile gerçekleşebilir. İlacın salımı veya salım süresi salım sisteminin tasarımıyla kontrol edilebilmektedir. İlaç salımının kinetiği ve sürekliliği ise eklenen ilacın veya taşıyıcı materyalin türü, taşıyıcının spesifik olmayan veya spesifik yollarla ilaca bağlanması yoluyla ayarlanabilir [63]. Aşağıda kontrollü ilaç salım sistemleri için sıklıkla kullanılan kinetik modeller anlatılmıştır [64].

#### **Sıfırıncı-derece salım kinetiği**

Sıfırıncı-derece salım kinetiğinde salım süreci boyunca ilacın kandaki seviyesi sabit tutulur. İlaç salım hızı ilaç derişiminden bağımsızdır. Bu matematiksel model Eşitlik 2.1 ile gösterilmektedir:

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

Burada Q salınan ilaç miktarı,  $Q_0$  ilacın çözültideki başlangıç miktarı (çoğunlukla sıfırdır),  $K_0$  sıfırıncı-derece salım sabiti ve t ise salım süresini ifade etmektedir. Bu salım kinetiği antibiyotik salımı, kalp ve damar basıncını ayarlayan ilaçların ve antidepresanlar gibi belirli tipteki ilaçların salımı için önemlidir.

### ***Birinci-derece salım kinetiği***

Birinci derece salım kinetiği Eşitlik 2.2 ile verilmiştir.

$$\frac{dC}{dt} = k(C_s - C_t) \quad (2.2)$$

Burada  $dC/dt$  zamanla ilaç derişimindeki değişimi, k birinci derece hız sabitini,  $C_s$  başlangıç ilaç derişimini ve  $C_t$  ise t anındaki ilaç derişimini ifade etmektedir. Bu denkleğin doğrusallaştırılmış hali Eşitlik 2.3 ile gösterilmiştir.

$$\ln\left(\frac{C_s}{C_s - C_t}\right) = kt \quad (2.3)$$

### ***Higuchi salım kinetiği***

Bu salım kinetiği Higuchi tarafından 1961'de tanımlanmıştır. Bu model taşıyıcı sistemdeki başlangıç ilaç derişiminin ilaç çözünürlüğünden büyük olması, ilaç difüzyonunun tek boyutlu olması ve ilaç moleküllerinin taşıyıcı sistem boyutundan çok küçük olması varsayımlarına dayanmaktadır. (Eşitlik 2.4)

$$Q = K_H \sqrt{t} \quad (2.4)$$

Burada  $K_H$  Higuchi salım kinetiği sabiti, t zaman ve Q ise t anındaki ilaç miktarını ifade etmektedir.

### ***Hixson-Crowell salım kinetiği***

Bu kinetik model taşıyıcı sistemin yüzey alanında ve çapında bir değişim olduğu durumlara sahip sistemleri tanımlamak için kullanılır. Aşağıda Eşitlik 2.5'te görüldüğü gibi ifade edilir:

$$\sqrt[3]{Q_0} - \sqrt[3]{Q_t} = -K_{HC} t \quad (2.5)$$

Burada  $Q_0$  başlangıç ilaç miktarını,  $Q_t$  zamanla salınan ilaç miktarını ve  $K_{HC}$  Hixson-Crowell sabitini ve t ise zamanı göstermektedir.

## 2.4. İlaç Salım Sistemlerinde Kullanılan Biyomalzemeler

Kontrollü ilaç salım sistemlerinde yağlar, doğal veya sentetik polimerler, metaller, antikorlar, seramikler, manyetik bileşenler ve karbon gibi bazı taşıyıcı malzemeler kullanılmaktadır. Bu malzemelerden en çok kullanılanları polimerlerdir. İlaç salım sistemlerinde kullanılan polimerlerde biyouyumluluk ve çoğunlukla biyobozunurluk özellikleri aranmaktadır. Biyobozunur polimerler fizyolojik ortamda enzimatik, mikrobiyolojik ya da hidrolitik olarak bozunabilen polimerlerdir. Biyobozunur polimerlerin parçalanma ürünlerinin toksik olmaması gerekmektedir. İlaç salım sistemlerinin hazırlanmasında doğal ve sentetik olmak üzere farklı iki tür polimer kullanılmaktadır.

### 2.4.1. Sentetik Polimerler

Sentetik polimerler dayanıklı ve kararlı olmaları, yüksek miktarda ve saflıkta üretilibilmeleri, yapısal spesifikasyonlara olanak sağlamaları gibi avantajları nedeniyle ilaç salım sistemlerinde sıklıkla tercih edilirler. Poli(laktik asit), poli(glikolik asit), poli(hidroksi bütirat), poli(e-kaprolakton), poli(adipik asit) ve poli(tereftalik asit) ilaç salım sistemlerinde kullanılan sentetik polimerlere örnektir [65]. Sentetik polimerlerin ana zincirine ester, karbonat, üre ve amit gibi fonksiyonel gruplar eklenerek biyobozunurluk özellikleri ayarlanabilmektedir [66, 67].

İlaç salım sistemlerinde en çok kullanılan biyobozunur polimerler, poli(laktik asit) (PLA) ve poli(glikolik asit) (PGA)'tir. 1960'larda ilk kez cerrahi iplik olarak PLA ve PGA kopolimer halinde poli(laktik-ko-glikolik asit) (PLGA) şeklinde kullanılmıştır [68, 69]. PLGA kopolimeri FDA tarafından onaylı bir polimerdir. PLGA, paklitaksel ve doksorubisin gibi birçok anti-kanser ilacın enkapsüle edilmesinde sıklıkla kullanılır. PLGA'nın yapısındaki yüksek kristaliniteye sahip PLA sert, düşük kristaliniteye sahip PGA ise yumuşak bir yapıdadır. Bu iki polimerin oranlarının ve kopolimerin molekül ağırlığının değiştirilmesi ile PLGA'nın biyobozunurluk özellikleri birkaç günden birkaç yıla kadar ayarlanabilmektedir. Kristal yapıdaki polimerlerin parçalanma süreleri daha uzundur. Bu nedenle PLGA yapısındaki PLA oranının artması yapının parçalanmasını yavaşlatır. PLGA kopolimerinin su varlığında ester bağlarının hidrolizi ile oluşan bozunma ürünleri (laktik asit ve

glikolik asit) vücut ortamının pH'ını etkileyecek asidik özelliğindedir. Bu dezavantajı nedeniyle tampon formülasyonu ile birlikte kullanılmaktadır.

Poli( $\epsilon$ -kaprolakton) (PCL), toksik olmayan biyobozunma ürünleri, yavaş bozunma özelliği ve birçok steroidin geçişine imkan tanıması nedeniyle ilaç salım sistemlerinde sıklıkla kullanılan sentetik polimerler arasındadır [70]. Hidrolitik olarak alifatik ester bağlarının hidrolizi ile toksik etkisi olmayan  $\epsilon$ -hidroksikaproik asit'e bozunmaktadır [71]. PCL, yarı kristalin yapıya sahiptir ve hidrofobik özellik taşır [72].

Poli(etilen oksit) (PEO) olarak da bilinen poli(etilen glikol) (PEG) biyobozunur olmayan, hidrofilik bir polimerdir. Polimer-ilaç konjügasyonlarında sıklıkla kullanılmaktadır. Hidrofilik yapısı nedeni ile biyoyumlu özellik göstermektedir [73].

#### **2.4.2. Doğal Polimerler**

Doğal polimerler ilaç salım sistemlerinde biyobozunur olmaları, hidrofilik ilaçlar için yüksek enkapsülasyon sağlamaları ve enzimatik olarak parçalanabilmeleri gibi nedenlerle tercih edilmektedirler [74]. Doğal polimerler bitkisel ya da hayvansal kaynaklı olup protein ya da polisakkarit yapısındadır, dolayısıyla biyobozunur ve biyoyumludurlar. Albumin, kolajen, kitosan ve aljinat ilaç salım sistemlerinde sıklıkla kullanılan doğal polimerlere örnektir [75]. Bu doğal polimerlerden albumin insan kan plazmasının ana proteinlerinden biri olup biyobozunur ve suda çözünür özelliğindedir. Bu özellikleri ile albuminin FDA tarafından onay almış Abraxane® isimli polimerik nanoküre formülasyonu ticari olarak mevcuttur [76].

Kitosan, kitinin deasetilasyonu sonucu oluşan eklemcabaklı kabuklarından elde edilen doğal bir polimerdir. Suda çözünürlüğü düşüktür ve zayıf asitlerde çözünmektedir. Kitosan antibakteriyel, bakteriyostatik ve osteokondüktif gibi üstün özellikleri nedeniyle ilaç salım sistemlerinde ve doku mühendisliği çalışmalarında sıklıkla tercih edilmektedir. Kitosanın deasetilasyon derecesi ve molekül ağırlığı fizikokimyasal ve biyolojik özelliklerini belirleyen başlıca kriterlerdir [77].

Albumin, insan kan plazmasının ana proteinlerinden biridir. Suda çözünen, biyobozunur ve biyoyumlu bir yapı olması nedeniyle ilaç salım sistemlerinde tercih edilmektedir. Genellikle bazı polimerlerle enkapsüle edilmiş şekilde kullanılır. Örneğin PGA-albumin konjügasyonları gibi [78].

Aljinat, yosun veya bakteri kaynaklı bir polisakkarittir. Herhangi bir toksik özelliği bulunmayan doğal kaynaklı aljinat malzemeler enzim, hücre ve ilaç gibi yapıların enkapsülasyonunda sıklıkla kullanılmaktadır [79].

## 2.5. Poli(bütülenadipat-ko-tereftalat) (PBAT)

İlaç salım sistemlerinde en çok kullanılan sentetik biyobozunur polimerler arasında PLA, PGA ve PCL gibi alifatik poliesterler yer almaktadır. Alifatik poliesterler biyobozunur olmalarına rağmen mekanik dayanımları oldukça düşüktür [80]. Homo-poliesterlerin kısıtlı özelliklerine karşı alifatik-aromatik kopolimerler sağladıkları avantajlar ile son yıllarda dikkat çekici hale gelmiştir. Alifatik-aromatik kopolimerler, hem alifatik poliesterlerin iyi biyobozunurluk özelliklerini hem de aromatik poliesterlerin iyi mekanik ve termal dayanımlarını bir arada sağlamaktadırlar. Alifatik-aromatik bir kopolimer olan poli(bütülenadipat-ko-tereftalat) (PBAT), her iki poliester çeşidinin avantajlarını bir arada sağlayan yeni ve alternatif bir biyomalzeme olarak son yıllarda dikkat çekmektedir [81]. Literatürde, PBAT'ın biyobozunurluk, biyoyuymululuk ve mekanik dayanımı ile ilgili çalışmalar yer almaktadır (Çizelge 2.2).

**Çizelge 2.2.** Literatürdeki PBAT'la ilgili çalışmalardan bazı örnekler.

Konu	Başlık	Yazarlar	Yıl
PBAT/ Biyobozunurluk	Poly(butylene adipate-co-terephthalate) scaffolds: processing, structural characteristics and cellular responses	Arslan ve arkadaşları [10]	2016
	Biodegradation of aliphatic-aromatic copolyesters by <i>Thermomonaspora fusca</i> and other thermophilic compost isolates	Kleeberg ve arkadaşları [82]	1998
PBAT/ Biyoyuymululuk	Characterization, degradation and biocompatibility of PBAT based nanocomposites	Fukushima ve arkadaşları [83]	2013
PBAT/mikropartikül	Performance of biodegradable microcapsules of poly(butylene succinate), poly(butylene succinate-co-adipate) and poly(butylene terephthalate-co-adipate) as drug encapsulation systems	Brunner ve arkadaşları [84]	2011
	Preparation of submicroparticles based on biodegradable co-polyester	Stloukal ve arkadaşları [85]	2010

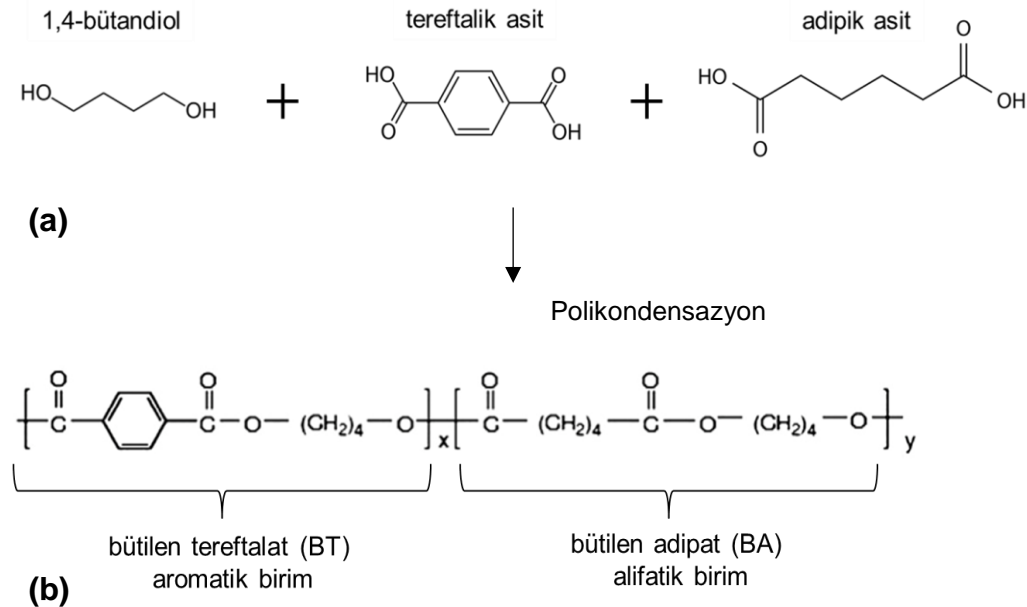
### 2.5.1. PBAT'ın Özellikleri ve Kullanım Alanları

İlk kez 1995 yılında BASF firması tarafından 1,4-bütandiol, tereftalik asit ve adipik asidin polikondenzasyonu ile üretilen ve 1998'de Ecoflex® adıyla pazara verilen PBAT, Çizelge 2.3'te de görüldüğü gibi Ecoworld®, Eastar Bio® gibi ticari isimleri ile birçok firmadan temin edilebilmektedir [8].

**Çizelge 2.3. PBAT'ın ticari isimleri [86].**

Ticari isim	Firma adı
Ecoflex®	BASF
EnPol®	IRE Chemical Ltd
Origo-Bi®	Novamont
FEPOL®	Far Eastern New Century Co

Poliesterler, etilen glikol, 1,4-bütandiol ve adipik asit gibi diol ve dikarboksilik asit gibi bileşenlerin kondenzasyon tepkimeleri ile kolaylıkla üretilmektedirler. Alifatik ve aromatik bileşenlerden oluşan kopoliesterler ise çoğunlukla 1,2-etandiol, 1,3-propandiol, 1,4-bütandiol, sebasik asit, adipik asit ve tereftalik asit gibi bileşenlerin polikondenzasyonu ile elde edilirler. Alifatik-aromatik bir kopoliester olan PBAT Şekil 2.7'de kimyasal yapıları görülen 1,4-bütandiol, tereftalik asit ve adipik asitin polikondenzasyonu ile üretilmektedir [8]. PBAT, aromatik kısmı temsil eden bütillen tereftalat (BT) ve alifatik kısmı temsil eden bütillen adipatın (BA) tekrarlayan zincirlerinden oluşmaktadır.



**Şekil 2.7. PBAT'ın bileşenleri (a) ve PBAT'ın (b) kimyasal yapısı.**

PBAT'ın biyobozunurluğu bütülen adipat grubundan ve mekaniksel kararlılığı ise teraftalat grubundan kaynaklanmaktadır. PBAT'ın fiziksel özellikleri Çizelge 2.4'te görölmektedir.

**Çizelge 2.4.** Ecoflex®'in fiziksel özellikleri [87, 88]

Özellik	
Molekül ağırlığı (g/mol)	40,000
Erime sıcaklığı (°C)	110-120
Camsı geçiş sıcaklığı (°C)	-29
Yoğunluk (g/cm <sup>3</sup> )	1.25-1.27
Kristalinite	~ %20

PBAT, gıda ambalajları ve zirai uygulamalar gibi yüksek biyobozunurluk özelliklerinin ön planda olduğu kullanım alanları ile diğer biyobozunur polimerlere eklenen katkı maddesi olarak esnekliğinin ön planda olduğu kullanım alanlarına sahiptir [89].

Esnek ve dayanıklı yapıdaki PBAT, alifatik poliesterlerle karıştırılarak mekanik dayanıklılığı artırma amaçlı kullanılmaktadır. Literatürde PBAT'ın mekanik dirençlerinin (basma-çekme gibi) seramik veya nanokiller ile güçlendirildiği birçok çalışma mevcuttur. Nanokillerin PBAT yapısına eklenmesi ile ilgili yapılan bir çalışmada nano montmorillonit killer eklenmesi sonrasında gerçekleştirilen mekanik testler sonucunda PBAT malzemenin sıkışma direncinin arttığı rapor edilmiştir. Nanokil içerikli PBAT malzemelerin biyoyumluluğunun araştırıldığı çalışmada protein absorpsiyonu, sitotoksisite testleri ve tam kan sayımı sonucunda kil içerikli PBAT nanokompozitlerin biyolojik olarak toksik olmadığı belirtilmiştir [83].

Alifatik aromatik ko-poliester PBAT'ın aromatik birimlerinin miktarına bağlı olarak mekanik dayanımı ve biyobozunurluğu değişkenlik göstermektedir. Aromatik birimlerin artması ile yapıya mekanik dayanım kazandırılırken biyobozunurluk özellikleri azalmaktadır. Yapılan çalışmalarda PBAT yapısındaki aromatik birimlerin miktarı %30-%55 aralığında tutulduğunda mekanik dayanım ve biyobozunurluk özelliklerinin birlikte sağlanabildiği rapor edilmiştir [90].

### 2.5.2. PBAT'ın Biyouyumluluğu ve Biyobozunurluğu

Alifatik-aromatik kopoliester olan PBAT tamamen bozunması, toksik etki yaratmaması ve esnek oluşu nedeniyle endüstriyel ürünlerin paketlenmesinde ve bazı tarımsal amaçlarla sıkça kullanılmaktadır [89]. Son yıllarda yapılan çalışmalarda biyouyumluluk ve biyobozunurluk testlerinde başarılı sonuçlar alınmış ve biyolojik sistemler için de uygun olduğu bildirilmiştir [91].

#### ***Biyouyumluluk***

Biyouyumluluk, vücut içinde toksisitenin oluşmaması açısından ilaç salım çalışmalarında kullanılan matris yapı için önemli bir parametredir [55]. Literatürde PBAT'ın biyouyumluluğunun incelendiği ve başarılı sonuçların elde edildiği birçok çalışma mevcuttur. PBAT ve nanokompozitlerinin hidrolitik bozunmaları ve biyouyumluluğunun incelendiği bir çalışmada L929 fibroblast ve hFOB 1.19 osteoblastlar ile in-vitro hücre kültür çalışması gerçekleştirilmiştir. Sekiz hafta süren hidrolitik bozunma testlerinde PBAT nanokompozitlerde morfolojik olarak bazı boşlukların oluştuğu tespit edilmiştir. Ayrıca fibroblast ve osteoblastlar ile yapılan 7 günlük inkübasyon sonucunda PBAT nanokompozitlerin hücrelerin canlılığını koruduğu ve hücrelerde herhangi bir sitotoksik etkiye neden olmadığı rapor edilmiştir [83]. PBAT ve modifiye edilmiş PBAT membranlar ile yapılan çalışmada L929 fare fibroblast hücre hattı ile 6 gün boyunca gerçekleştirilen hücre kültür çalışmalarının sonucunda tüm membranların hücre çoğalmasını desteklediği belirlenmiştir [92]. Karbon nanotüpler ile güçlendirilerek elektroğrılmış PBAT fiberlerin MG-63 osteosarkoma hücreleri ile kültüre edildiği bir çalışmada PBAT fiberlerin hücrelere toksik etki göstermediği tespit edilmiştir [93]. PBAT'ın biyouyumluluğuna yönelik olarak yapılan bir *in-vivo* çalışmada ise nano-hidroksiapatit katkılı ve insan adipoz kök hücreleri ekili PBAT nanofiberler ve filmler kemik implantı olarak tasarlanmıştır. Sıçanın sırt bölgesine implante edilen PBAT nanofiberlerin ve filmlerin 2 gün sonra çok düşük miktarda bir inflamasyona yol açtığı görülmüştür [94]. Porojen içerikli PBAT-kitosan karışımı doku iskelelerinin hazırlandığı bir çalışmada ise ISO/EN 10993 standartlarına uygun olarak yapılan sitotoksikite testlerinde L929 hücrelerinde herhangi bir toksisite gözlenmediği ve hücre canlılığının yüksek olduğu belirtilmiştir [95]. PBAT'ın kemik doku mühendisliğinde kullanılmak üzere çeşitli yöntemler ile doku iskelesi olarak üretiminin yer aldığı bir çalışmada PBAT'ın MC3T3-E1 kemik öncül hücreleri ile



yapılan biyoyuymulluk çalışmalarında PBAT'ın hücreler üzerinde toksik bir etkiye neden olmadığı ve hücre proliferasyonunun gerçekleştiği rapor edilmiştir [10].

### **Biyobozunurluk**

İlaç salım sistemlerinde kullanılan polimerik malzemelerin biyobozunur olması ve bozunma ürünlerinin toksik etki yaratmaması önem taşıtmaktadır. Bazı polimerik malzemelerin bozunma ürünleri ortamın yapısını değiştirebilmekte ve ilaç salım sisteminin etkinliğini düşürebilmektedir [55]. Yapılan alışmalarla PBAT'ın biyobozunurluk özelliği toprak, su, kompost gibi ortamlarda araştırılmış ve biyobozunurluğunun yüksek olduğu ve bozunma ürünlerinin toksik olmadığı desteklenmiştir. PBAT'ın biyobozunurluk özellikleri yapısındaki alifatik ve aromatik grupların miktarlarına bağlıdır. Aromatik blokların polimer zincirindeki miktarı arttığında polimer zincirlerinin hareketliliği azalmakta ve bozunma hızı düşmektedir [9]. Yapılan bir çalışmada aromatik grupların sekans uzunlukluklarının 3 ve daha fazla olmasının bozunurluk hızını önemli ölçüde azalttığı rapor edilmiştir [90]. Vücutta birikmemesi ve vücuda herhangi bir toksik etki bırakmaması için biyobozunurluk ve biyoyuymulluk özelliklerinin yanında uzun süreli salımlarda kan akışına karşı direnç için iyi mekanik dayanım ilaç salım sistemlerinde kullanılacak malzemelerin sahip olması gereken bir diğer özelliktir [96]. PBAT'ın mekanik özellikleri aromatik birimlerin miktarıyla doğru orantılıdır. Bu nedenlerle, PBAT'ın içerdiği alifatik ve aromatik birimlerin oranları, optimum değerde olmalıdır. Yapılan bir çalışmada hem mekanik dayanım hem de bozunurluk açısından tereftalik asit miktarının %35 ve %55 arasında olması gerektiği belirtilmiştir [90]. Yüksek sıcaklığa sahip kompostlarda yaşayan, termofilik aktinomiset türü olan *thermomonaspora fusca* ile yapılan biyobozunurluk çalışmalarında simüle kompost ortamında %44 oranında BT (aromatik) ve %56 oranında BA (alifatik) içeren PBAT'ın 22 günde %99.9'unun bozunduğu rapor edilmiştir. Yapılan gaz kromatografisi (GC), jel geçirgenlik kromatografisi (GPC) analizleri ve respirometrik testler ile aromatik bozunma ürünlerinin oluşmadığı belirlenmiştir [97]. Aktinomiset ortamında bazı poliesterlerin biyobozunurluğunun incelendiği bir çalışmada ise PBAT'ın (%40 bütilen tereftalat ve %60 bütilen adipat içerikli) vrede yüksek oranda bozunan bir poliester olan poli(hidroksi butirat) (PHB)'ye göre daha hızlı bozunduğu kaydedilmiştir [81]. PBAT'ın bozunması, ester bağlarının enzim-katalizli hidroliziyle gerçekleşmekte ve yüzeyden başlamaktadır.

PBAT'ın enzimatik bozunurluğunun incelendiği bir çalışmada ise *pseudo-mona cepacia* isimli mikroorganizmanın salgıladığı lipaz enzimi varlığında bozunduğu rapor edilmiştir [98]. PBAT'ın kemik doku mühendisliğinde kullanılmak üzere çeşitli yöntemler ile doku iskelesi olarak üretiminin yer aldığı bir çalışmada PBAT'ın lipaz enzimi ile hidrolitik bozunması incelenmiştir. 5 haftada çözücü döküm-parçacık uzaklaştırma ile elde edilen doku iskelelerinde % 10 oranında, elektroçirme yöntemi ile hazırlanan ince filmlerde ise % 5 oranında bozunma görülmüştür [10].

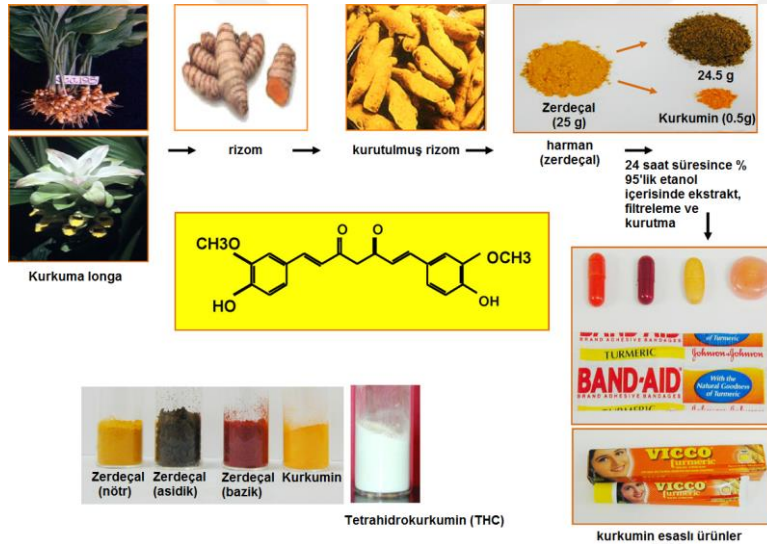
### **2.5.3. PBAT'ın İlaç Salım Sistemlerinde Kullanımı**

PBAT rapor edilen biyobozunurluk ve biyouyumluluk özelliğiyle kontrollü salım sistemlerinde gelecek vadede alternatif bir polimerdir. PBAT ile ilaç salımına yönelik yapılmış bir çalışmada PBAT, poli(bütülen süksinat) (PBSu), poli(bütülen süksinat-ko-adipat) (PBSA) poliesteri kullanılarak partiküller çift emülsiyon hazırlama-çözücü buharlaştırma yöntemi ile hazırlanmıştır. Hidrofobik bir ajan olan retinoik asitin (atRA) partiküllere sırasıyla PBAT, PBSu ve PBSA için % 95.8, % 95.4 ve % 94.0 verimle enkapsüle edildiği rapor edilmiştir. En yüksek enkapsülasyon verimine PBAT poliesteri ile ulaşılmıştır. PBAT mikrokapsüllerin atRA salım profili incelendiğinde ilk saat içinde %10 patlama etkisi ile salındığı, 1 hafta boyunca lineer bir profil izleyerek %25 atRA salımını takiben profilin parabolikleştiği belirlenmiştir. PBAT'ın patlama etkisinin literatürde polimerik partiküller için kabul edilen değerlerde olduğu görülmektedir [84].

PBAT partiküllerin emülsiyon hazırlama-çözücü buharlaştırma metodu ile hazırlandığı bir diğer çalışmada karıştırma hızı, sonikasyon ve polimer derişiminin partikül boyutu ve boyut dağılımına etkisi incelenmiştir. Elde edilen partiküllere herhangi bir ilaç yüklemesi gerçekleştirilmemiştir. Bu çalışmada 25 - 150 mg/mL PBAT derişimlerinde, % 0.5 PVA derişiminde ve sulu fazın organik faza hacimce oranı 4 olarak hazırlanan partiküllerin ortalama çaplarının 9.44 µm ile 0.40 µm arasında değiştiği rapor edilmiştir. PBAT derişimin artmasıyla partikül çaplarının arttığı görülmüştür. Ayrıca karıştırma hızının artmasıyla (6,000-24,000 rpm) partikül çaplarının azaldığı gösterilmiştir [85].

## 2.6. Kurkumin

Günlük hayatta baharat, gıda renk maddesi olarak bilinen kurkumin aynı zamanda birçok hastalığın tedavisi ve önlenmesi için kullanılan potansiyel bir bileşik haline gelmiştir. Kurkumin ilk kez 1815 yılında izole edilmiş ve kristal formunda 1870 yılında elde edilmiştir[99]. Kurkumin, 1,6-heptadien-3,5-dion-1,7-bis(4-hidroksi-3-metoksifenil)-(1E,6E) veya diferüloimetan olarak tanımlanmıştır. 1910 yılında kurkuminin ferüloimetan yapısı Lampe ve Milobedeska tarafından doğrulanmış ve kurkumin sentezi gerçekleştirilmiştir. Şekil 2.8'de kurkuminin yapısı, izolasyonu ve ekstraksiyonu; marketlerde yaygın olarak satılan kurkumin kapsülleri, hapları, pastilleri, bantları ve kremi ve asidik, bazik, nötr zerdeçal ve kurkumin şematik olarak gösterilmektedir.



**Şekil 2.8.** Kurkuminin yapısı, izolasyonu ve ekstraksiyonu. Marketlerde yaygın olarak satılan kurkumin kapsülleri, hapları, pastilleri, bantları ve kremi. Asidik, bazik, nötr zerdeçal ve kurkumin [100].

Yaygın olarak zerdeçal ismi ile bilinen kurkumin, zencefilgiller ailesine (Zingiberaceae) ait olan zerdeçal (Curcuma longa, turmeric, zerdeçöp, safran kökü, sarıboya, zerdeçav, hint safranı) bitkisinin köklerinden elde edilir. Kurkumin, hidrofobik yapılı polifenolik bir bileşik olup sarı-turuncu pigmentli bir maddedir. Kurkuminin erime noktası 183°C ve molekül ağırlığı 368.37 g/mol'dür [99]. Kullanılan çözücü ile değişiklik göstermekle birlikte UV-görünür bölgede spektrofotometrik olarak incelendiğinde maksimum absorpsiyonu 400-430 nm dalga boyu arasındadır. Kurkuminin metanol içerisindeki maksimum absorpsiyonu ( $\lambda_{max}$ )

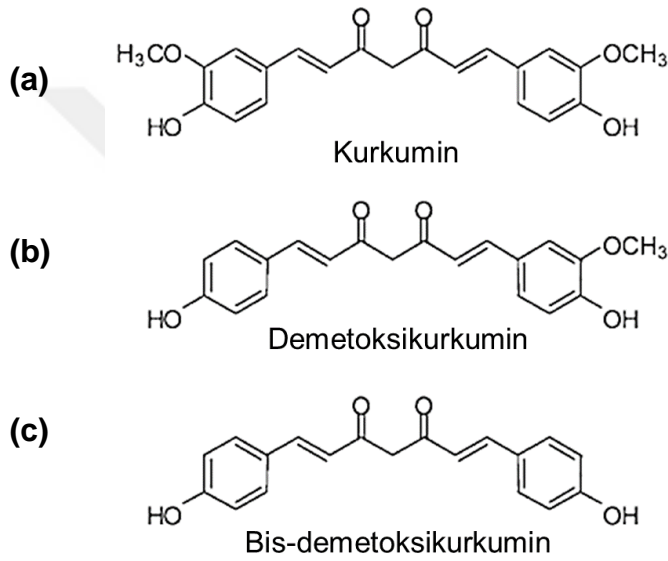
430 nm'de, aseton içerisinde ise 415-420 nm'de gerçekleşir [101]. Kurkumin, 2.5-7 pH aralığında parlak sarı tonda ve pH>7'de ise kırmızı renkte görünür. Kurkumin enolik ve  $\beta$ -diketonik formda bulunur. Kurkumin çözelti içerisinde birincil olarak enolik formunda bulunmaktadır [102]. Kurkumin asidik pH'da kararludur, nötr ve bazik ortamda kararsızdır ve bu koşullarda ferülik asit ve ferüloimetana bozunmaktadır.

Kurkumin suda çözünmez, hidrofilik bir ajandır. Metanol, kloroform, aseton, etanol, asetik asit, tetrahidrofuran ve kloroform gibi çözücülerde çözünürlüğü yüksektir. Kurkumin 0.1 M sodyum hidroksit içerisinde ise yalnızca 1-2 saat süresince çözülmüş halde kalabilir [103].

Kurkuminin ışıklı ortamda fotodegradasyona uğradığı bilinmektedir. Kurkuminin büyük bir kısmı (>%90) pH 7.2'deki fosfat tamponuna konulduğunda 30 dk içerisinde bozunur. Kurkuminin bozunması 1-6 pH aralığında oldukça yavaştır ve midede de bu durum geçerlidir [104]. Buna karşın kurkuminin başlıca metabolitleri (tetrahidrokurkumin veya THC) nötr ve bazik ortamda oldukça kararludur ve antioksidan aktivitelerine de sahiptirler [105-107]. Kurkumin, hücre besi ortamında % 10 fetal sığır serumu kullanıldığında kararlı yapıdayken, % 50 oranında fetal sığır serumu kullanıldığında 8 saat içinde bozunmaktadır [104]. Trans-6-(4'-hidroksi-3'-metoksifenil)-2,4-diokso-5-hekzenal'ın kurkuminin başlıca bozunma ürünü olduğu tahmin edilmektedir ve vanilin, ferülik asit, ferülo metan ise daha az oluşan bozunma ürünlerindedir. Ferüloimetanın hidrolizi ile oluşan ürünler vanilin ve asetondur ve inkübasyon süresi ile bu miktarlar artmaktadır. Ek olarak kurkumin siklodekstrin ile kompleksler oluşturarak kararlı hale geçmektedir [108].

Kurkuminin toksisitesinin incelendiği insanlar üzerindeki farmakokinetik çalışmalar genellikle benzer sonuçlar vermektedir. Klinik olarak kurkumin doz denemesinin yapıldığı bir çalışmada (faz-I insan klinik çalışması) 3 ay boyunca 3 hastaya 500 mg/gün başlangıç dozu ile kurkumin uygulanmıştır ve 2. derece veya daha yüksek toksisiteler görülmediği durumda 1,000, 2,000, 4,000, 8,000 ve son olarak 12,000 mg/gün'e kadar kurkumin dozu arttırılmıştır. Çalışma sonucunda kurkuminin 8,000 mg/gün ve daha düşük dozlarda toksik olmadığı rapor edilmiştir [109]. Kurkuminin günlük 3,600, 1,800 veya 7 gün için 450 mg doz miktarlarında kalın bağırsak kanseri hastalarında uygulandığı bir çalışmada hastalarda herhangi bir toksik etkiye neden olmadığı belirlenmiştir [110].

Zerdeçalın (*Curcuma longa*) yapısında kurkumin dışında demetoksikurkumin, bis-demetoksikurkumin olmak üzere farklı kurkuminoid yapıları bulunmaktadır (Şekil 2.9). Bu yapılar arasında en kararlı olanı antikanserojen özelliğe sahip olan kurkumindir. Ham özüt kurkumin bileşeninin yaklaşık %2-8'i saf kurkumin içermektedir. Kimyasal ismi 1,6-heptadien-3,5-dion-1,7-bis(4-hidroksi-3-metoksifenol)-(1E,6E) ya da diferuloilmetandır. Ticari kurkumin içeriğinde kurkumin (Mw 338 g/mol), %10-20 oranında demetoksikurkumin (Mw 338 g/mol), %5 oranından az ise bis-demetoksikurkumin (Mw 308 g/mol) kurkuminoidleri bulunmaktadır [99].



**Şekil 2.9.** Kurkuminin ticari içeriğindeki moleküllerin kimyasal yapıları: (a) kurkumin, (b) demetoksikurkumin, (c) bis-demetoksikurkumin.

### 2.6.1. Kurkuminin İlaç Salım Sistemlerinde Kullanımı

Türmerik toz olarak bilinen *curcuma longa*'nın iyileştirici madde olarak geleneksel tıpta kullanımı olduğu bilinmektedir. Biyolojik ve farmasötik aktivite açısından geniş bir spektruma sahip olan kurkumin son zamanlarda antioksidan, antiinflamatuvar, antikanserojen, antidiyabetik ve antimikrobiyal özellikleri nedeniyle modern tıpta Çizelge 2.5'te de görülen bazı hastalıklar için kullanılmaya başlanmıştır.

**Çizelge 2.5.** Kurkuminin modern tıpta etki ettiği hastalıklar [99].

<b>Kurkuminin etki ettiği hastalıklar</b>
Kronik hastalıklar (Kalp, akciğer, karaciğer hastalıkları, mide ülseri, sedef hastalığı, epilepsi, parkinson, AIDS vb.)
Kanser (Kemik, göğüs, akciğer, kolon, yumurtalık, mide kanseri vb.)
Enfeksiyon (Sıtma vb.)
Diğer (Yara, depresyon, katarakt, safra taşı vb.)

Yapılan son çalışmalarda kurkuminin ilaç salım sistemleri için oldukça etkili ve güvenli bir bileşen olduğu ortaya konmuştur. Fakat klinik potansiyeli, hidrofobik bir ilaç olması nedeniyle kısıtlı kalmaktadır. Bu nedenle ağızdan alımı etkili bir tedavi yöntemi oluşturamamaktadır. Kurkuminin suda çözünürlüğünü ve biyoyoumluluğunu arttırmak amacı ile lipozomlara, polimerik nanopartiküllere, biyobozunur mikrokürelere ve yağ bazlı nanopartiküllere enkapsülasyonu çalışılmıştır. [111-113]. Çeşitli nanoteknolojik temelli ilaç salım sistemleri ile yapılan kurkumin salımı (örneğin; nanopartiküller, lipozomlar, nanoemülsiyonlar gibi) oral yolla verilen kurkumin yerine, oluşabilecek toksik yan etkileri azaltmak ve ilacın etkinliğini arttırmak amacıyla oldukça fazla kullanılan bir yöntem haline gelmiştir [114]. Literatürde yer alan bir çalışmada kitosan kaplı poli(bütül siyanoakrilat) (PBCA) polimerik nanopartiküllerden kurkumin salımı gerçekleştirilmiştir. Çalışmada doğrudan ve nanopartiküle enkapsüle olmuş halde, kurkuminin salımı sağlanarak hücre canlılığındaki değişim incelenmiştir. Çalışmada HepG2, Huh7 ve Bel7402 hücre hatları kullanılmıştır. Kitosan kaplı poli(bütül siyanoakrilat) (PBCA) nanopartiküllerden kurkumin salımının doğrudan uygulamaya göre kanserli hücrelerde daha etkili olduğu görülmüştür. Ayrıca kurkuminin sağlıklı hücrelere sitotoksik etki yaratmadan kanser hücrelerinin inhibisyonuna neden olduğu rapor edilmiştir [115]. Başka bir çalışmada kurkuminin polilaktik-ko-glikolik asit (PLGA) nanopartiküllerden ve serbest halde salımının kanserli hücrelerdeki etkisi değerlendirilmiştir. Kurkumin yüklü PLGA nanopartiküllerin hücre proliferasyonundaki antikanserojen potansiyelinin serbest kurkuminin etkisine göre yumurtalık kanser hücrelerinde 2 kat ve metastatik göğüs kanseri hücrelerinde 6 kat daha yüksek olduğu belirtilmiştir [116]. Arjinince zenginleştirilmiş amfifilik peptit

nanopartiküllere kurkumin yüklemesinin yapıldığı bir çalışmada partiküllerin MG-63 kemik kanseri hücrelerine etkisi incelenmiştir. Çalışma sonucunda kurkumin yüklü partiküllerin MG-63 hücrelerinin proliferasyonunu inhibe ettiği rapor edilmiştir [117].

Kurkuminin polimerik partiküllere enkapsülasyonunun gerçekleştirildiği çalışmalarda partikül üretimi için pek çok farklı yöntem kullanılmıştır. Partikül üretim yöntemlerinde en sıklıkla kullanılanlardan biri de emülsiyon hazırlama-çözücü buharlaştırma yöntemidir. Bu yöntemin avantajı tek basamakta ve kolay hazırlanabilir olması, homojenizasyon hızı ve emülsiyon ajanı konsantrasyonu gibi parametrelerin değişimi ile geniş aralıkta boy dağılımının elde edilmesi ve kurkumin gibi hidrofobik ilaçların yüksek oranda enkapsülasyonunun sağlanmasıdır. N,O-karboksimetil kitosan nanopartiküllerden kurkumin salımının yapıldığı bir çalışmada boy dağılımı 30-150 nm arasında değişen partiküllerin enkapsülasyon veriminin %80 civarında olduğu belirlenmiştir [118]. PLGA mikropartiküllerden kurkumin salımının yapıldığı bir başka çalışmada ise %75 oranında enkapsülasyon verimine ulaşılmıştır. Elde edilen partiküllerin ortalama çapı  $22\pm 9$  µm olarak bulunmuştur [119].

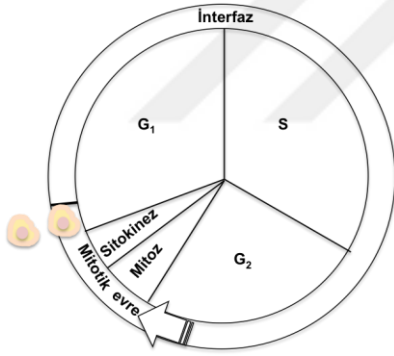
Kurkumin salım sistemlerinde genellikle PLA, PEG, PLGA ve PCL gibi biyobozunur alifatik poliesterler kullanılmaktadır [120-122]. Bu polimerlerin kurkumin enkapsülasyon verimlerinin düşük olduğu ve ilaç salımının uzun süreli olarak gerçekleştirilemediği görülmektedir. Kurkuminin kontrollü salım sistemlerinde etkin olarak kullanılabilmesi için taşıyıcı polimerin enkapsülasyon verimi ve uzun süreli salım sağlayabilmesi önem kazanmaktadır. Bundan dolayı enkapsülasyon verimliliği yüksek ve uzun süreli salım profili gösteren kurkumin salım sistemlerinin geliştirilmesi gerekmektedir.

### **2.6.2. Kurkuminin Antikanserojen Etkisi**

Kurkumin birçok hastalığın tedavisi ve önlenmesinde kullanılan potansiyel bir bileşiktir. Literatürde kurkuminin kanser tedavisinde kullanılabilirliğinin araştırıldığı birçok çalışma bulunmaktadır. Kurkuminin cilt, kolon, beyin, prostat, karaciğer, kemik, göğüs, yumurtalık, akciğer, mide ve kemik kanseri gibi pek çok kanser türüne etki ettiği bilinmektedir [123]. Çok amaçlı kullanıma sahip antikanserojen nitelikteki kurkuminin kanser hücrelerinin proliferasyonuna katkı sağlayan bazı biyolojik yolları inhibe ederek anahtar bir rol oynadığı rapor edilmiştir. Kurkumin

çok sayıda transkripsiyon faktörünü, sitokinleri, büyüme faktörlerini, enzimleri, protein kinazları, ilaç dirençli proteinleri ve bazı adezyon moleküllerini modüle ederek kanserli hücreler üzerinde etkinlik göstermektedir. Kurkuminin kanser hücreleri üzerindeki apoptozu tetikleyici mekanizması, hücre tipine ve kurkuminin dozuna bağlıdır [124].

Hücre döngüsü bir hücrede mitotik evre ve interfazdan oluşur. Şekil 2.10'da hücre döngüsü şematik olarak görülmektedir. Mitotik evre hem mitozu hem de sitokinezi içermektedir. Mitotik hücre bölünmesini daha uzun olan interfaz izlemektedir. Bu evre tüm hücre döngüsünün yaklaşık % 90'ını kapsamaktadır. İnterfaz sırasında hücre sitoplazmik organellerini ve proteinlerini çoğaltarak büyümektedir ve mitoz için kromozomlarını kopyalamaktadır. Bu evrede G<sub>1</sub> fazı, S fazı ve G<sub>2</sub> fazı adlı alt fazlar bulunmaktadır. S fazında kromozomların kendilerini eşleme işlemi gerçekleşmektedir. Bir hücre döngüsünde G<sub>1</sub> fazı boyunca hücre büyür, S fazında kromozomlarını kopyalar ve büyümeye devam ederken bölünme için hazır hale gelir ve mitotik evrede bölünür [125].

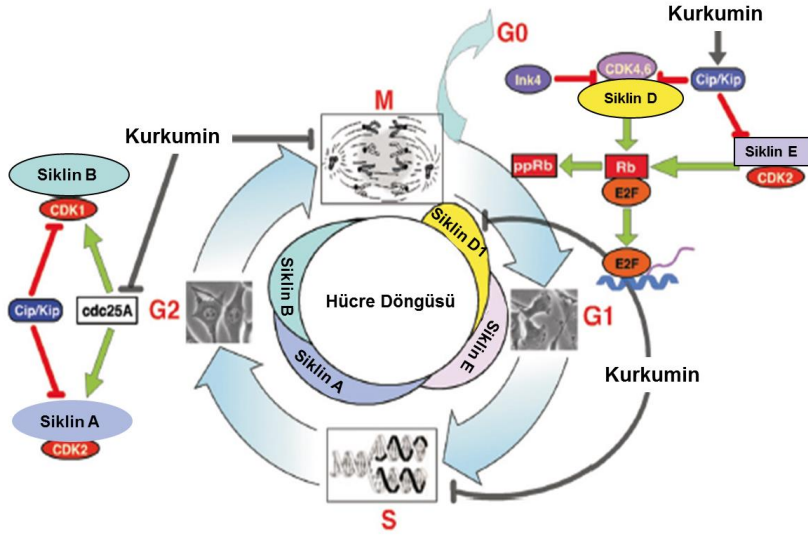


**Şekil 2.10.** Hücre döngüsü.

Hücre döngüsünü düzenleyen kinaz ve siklin gibi bazı moleküllerin aktiviteleri ve miktarları hücre döngüsünü kontrol etmektedir. Hücre döngüsünü devam ettiren kinazlar sabit miktarda bulunmakta ve aktif hale gelmeleri için siklinlere bağlanarak kompleks moleküller oluşturmaktadırlar. Kurkumin gibi birçok molekül siklin bağımlı kinazların oluşturduğu komplekslerin işlevlerini çeşitli yollarla stimüle ederek hücre döngüsüne etki etmektedir. Yapılan birçok kanser çalışmasında kurkuminin hücre döngüsünün durmasını sağladığı rapor edilmiştir. Başlıca hücre döngü proteinlerinden olan siklin bağımlı kinazlar (CDK 1, 2 ve 4) kurkuminin



hedef moleküllerindedir [126]. Şekil 2.11'de kurkuminin hücre döngüsüne etki ettiği fazların şematik gösterimi yer almaktadır.



**Şekil 2.11.** Kurkuminin hücre döngüsünde etki ettiği fazların şematik gösterimi [127].

Kurkumin G1/S fazında hücre döngüsünü durduran p53 tümör baskılayıcı gene etki eder. Tümör baskılayıcı p53 geni p21 geninin transkripsiyonunu stimüle eder ve p21 proteininin CDK kompleksine (hücrelerin S evresine yürümesini aktifleştiren) bağlanmasıyla kompleksin işlevi bloklanır. Böylelikle hücre döngüsü durur. Ayrıca kurkuminin p-glikoproteinleri azaltarak düzenlemesi (down-regulation) nedeni ile kanser ilaçlarına karşı gelişen çoklu ilaç direncine etki ettiği bilinmektedir [128]. DNA sentezi ve hücre çoğalması için gerekli olan deoksiribonükleotidlerin sentezinde rol alan tiyoredoksin redüktaz (TrxR) tümör hücrelerinde aşırı miktarda üretilmektedir. Kurkumin TrxR'ye bağlanır ve enzimin nikotinamid adenin dinükleotid fosfata (NADPH) dönüşmesiyle hücrelerin üzerindeki oksidatif stresin artmasını sağlayarak tümör hücrelerini öldürmektedir [129].

### 3. DENEYSEL ÇALIŞMALAR

Yapılan tez çalışması genel hatlarıyla dört aşamadan oluşmaktadır. İlk basamakta kurkumin yüklü olmayan PBAT partiküller sentezlenmiştir. Elde edilen sonuçlar doğrultusunda en uygun morfolojik özellikteki mikro ve nano boyutta iki farklı partikül seçilmiş ve çalışmanın diğer kısımlarında bu partiküller kullanılmıştır. Elde edilen PBAT mikro ve nanopartiküllerin kimyasal özellikleri ayrıntılı olarak belirlenmiştir. Ardından ikinci basamakta, PBAT mikro ve nanopartiküllere kurkumin yüklemesi gerçekleştirilmiştir. Kurkumin enkapsülasyon verimi belirlenmiş ve kurkumin yüklü PBAT mikro ve nanopartiküllerin karakterizasyon çalışmaları yapılmıştır. Devam eden basamakta kurkumin yüklü PBAT mikro ve nanopartiküllerin in-vitro salım çalışmaları yapılmış ve kurkumin salım kinetikleri incelenmiştir. Son olarak ise hücre kültürü çalışmaları ile MG-63 insan kemik kanseri hücrelerinin ve MC3T3-E1 fare kemik öncül hücrelerinin tek tabaka kültürleri üzerine belli konsantrasyonlarda kurkumin yüklü PBAT mikro ve nanopartiküllerden salınan kurkuminin hücre canlılığına olan etkisi incelenmiştir. Yapılan sitotoksite analizleri, canlı-ölü analizi ve hücre canlılığı ve morfolojisinin görüntülenmesi amacıyla F-Aktin/DAPI boyama çalışmaları ile desteklenmiştir. Kurkuminin antikanserojen özelliğinin hücre döngüsüne etkisi ise akış sitometre ile belirlenmiştir.

#### 3.1. Kullanılan Malzemeler

PBAT reçineleri SASA firmasından (Adana, Türkiye) temin edilmiştir. Organik faz içeriği hazırlanırken kullanılan diklorometan (DCM) Sigma-Aldrich (Almanya) firmasından satın alınmıştır. Sulu faz oluşumunda stabilizatör ajan olarak kullanılan polivinilalkol (PVA; +%99, hidrolize edilmiş, MA: 89,000-98,000 g/gmol) ve didodesildimetilamonyum bromür (DMAB, MA: 462.63 g/mol) Sigma-Aldrich (Almanya) firmasından temin edilmiştir. Antikanserojen ilaç olarak kullanılan kurkumin (saflık derecesi: %65) Sigma-Aldrich (Almanya) firmasından satın alınmıştır. Salım çalışmalarında kullanılan fosfat tampon çözeltisi ( $Ca^{++}$ ,  $Mg^{++}$  içeren) ve sodyum azid Sigma, Almanya firmasından temin edilmiştir.

Hücre kültür çalışmalarında kullanılan MC3T3-E1 preosteoblast hücre hattı Riken hücre bankasından (Tsukuba, Japonya) ve MG-63 insan osteosarkom kemik kanser hücreleri Balıkesir Üniversitesi, Moleküler Biyoloji ve Genetik Bölümü'nden

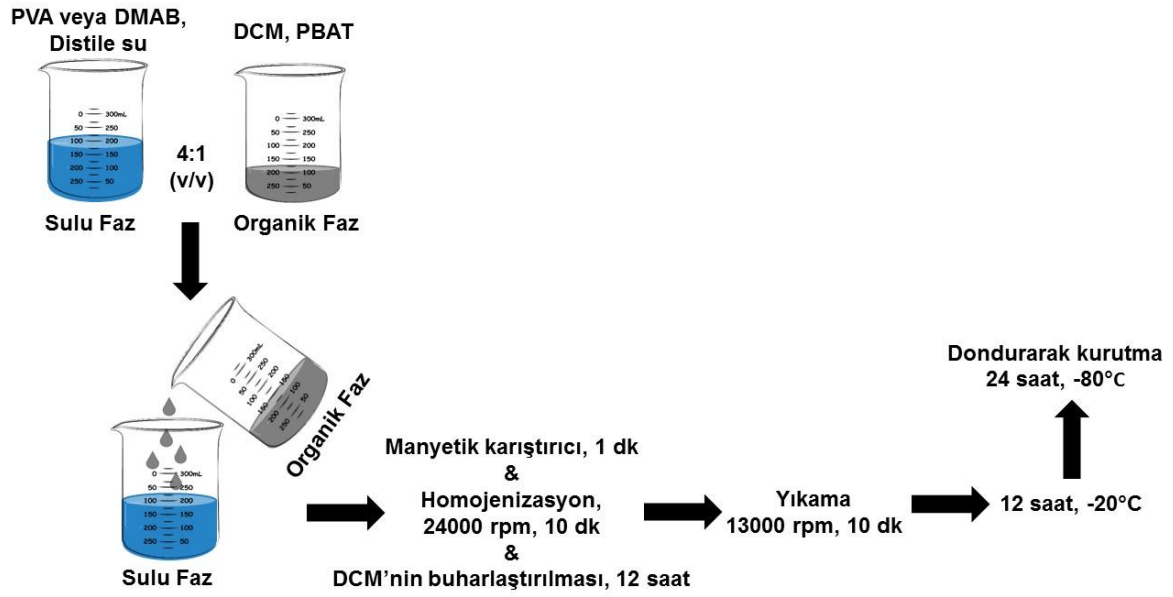
temin edilmiştir. Kültür ortamı için kullanılan Minimum Essential Medium-Alfa Modifikasyonu ( $\alpha$ -MEM) ve Dulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM), L-glutamin, penisilin-streptomisin ve fetal sığır serumu (FBS) Biowest (Fransa) firmasından satın alınmıştır. Tripsin-EDTA çözeltisi Sigma (Almanya) firmasından alınmış ve hücrelerin yüzeyden kaldırılmasında kullanılmıştır. Hücre fiksasyonunda kullanılan glutaraldehit ve hücre canlılık analizinde kullanılan izopropanol, 3-[4,5-dimetiltiazol-2-il]-difenilterazolyum bromür (MTT) Sigma (Almanya) firmasından satın alınmıştır. Dulbecco fosfat tampon çözeltisi (DPBS, pH: 7.4) Biowest (Fransa) firmasından temin edilmiştir. Kurkuminin çözünmesinde kullanılan dimetil sülfoksit (DMSO) Hyclone (ABD) firmasından satın alınmıştır. Hücre döngü analizinde kullanılan Triton X-100 Sigma (Almanya) ve DNase-free RNase Qiagen (Almanya) firmasından temin edilmiştir. Hücre alım analizinde kullanılan F-aktin Invitrogen (ABD) ve diamidino-2-fenilindol (DAPI) ThermoScientific (ABD) firmasından satın alınmıştır.

### **3.2. PBAT Mikro ve Nanopartiküllerin Üretimi**

PBAT mikro ve nanopartiküllerin üretiminde, emülsiyon hazırlama-çözücü buharlaştırma yöntemi kullanılmıştır. Kurkumin yüklü olan ve olmayan PBAT mikro ve nanopartiküllerin üretimi Bölüm 3.2.1 ve 3.2.2'de ayrıntılı olarak anlatılmıştır.

#### **3.2.1. Kurkumin Yüklü Olmayan PBAT Mikro ve Nanopartiküllerin Üretimi**

Kurkumin yüklü olmayan PBAT mikro ve nanopartiküller, emülsiyon hazırlama-çözücü buharlaştırma yöntemi ile üretilmiştir. Optimizasyon çalışmaları için polimer konsantrasyonu, emülsiyon ajanı konsantrasyonu ve emülsiyon ajanı türünün etkisi incelenmiştir. Kurkumin yüklü olmayan partiküllerin emülsiyon hazırlama-çözücü buharlaştırma yöntemi ile üretimi şematik olarak Şekil 3.1'de gösterilmiştir.



**Şekil 3.1** Emülsiyon hazırlama-çözücü buharlaştırma yöntemi ile PBAT partikül üretiminin şematik gösterimi.

Sulu faz organik fazın hacimce dört katı olarak kullanılmıştır. Organik faz içeriği hazırlanırken %0.5, %1, %2.5 (w/v) oranlarında olacak şekilde PBAT, 2.5 mL DCM içinde çözülmüştür. Sulu faz oluşumu için ise iki farklı stabilizatör ajan kullanılmıştır. Su fazı hazırlanırken %1, %2.5 (w/v) PVA veya %1, %1.5, %2.5 (w/v) oranlarında DMAB, 10 mL distile su içerisinde çözülmüştür. Ardından organik faz sulu faza ilave edilmiştir. Oluşan emülsiyon 1 dk manyetik karıştırıcıda karıştırıldıktan sonra 10 dk boyunca 24,000 rpm hızda homojenize edilmiştir. Organik çözücü DCM bir gece boyunca uçurularak uzaklaştırılmıştır. Ardından partiküller 10 dk 13,000 rpm hızda santrifüj edilmiş ve iki kez yıkanmıştır. Partiküller 20°C'de bir gece dondurulup, 24 saat süresince -80°C'de dondurarak-kurutma cihazı (Christ, Almanya) ile kurutulmuştur. Partiküller +4°C'de muhafaza edilmiştir.

### 3.2.2. Kurkumin Yüklü PBAT Mikro ve Nanopartiküllerin Üretimi

Kurkumin yüklü PBAT mikro ve nanopartiküller, boş PBAT mikro ve nanopartiküllerin üretimi için kullanılan yöntem ile hazırlanmıştır. Farklı olarak boş partiküllerin üretiminde organik faz hazırlanması aşamasında organik çözücü olarak kullanılan DCM içerisinde yalnızca PBAT çözülmürken, kurkumin yüklü partiküllerin üretiminde PBAT ile birlikte kurkumin de ilave edilmiştir. Kurkumin

yüklü partiküller, PBAT ve kurkumin arasındaki kütlece oran sırasıyla 5, 10 ve 20 kat olmak üzere üretilmiştir.

### **3.3. Karakterizasyon Çalışmaları**

#### **3.3.1. Partikül Boyutunun Belirlenmesi**

PBAT mikro ve nanopartiküllerin boy ve boy dağılımlarının belirlenebilmesi için partiküller sulu ortamda seyreltilmiştir. Boyut analizleri taramalı elektron mikroskop (SEM), dinamik ışık saçılımı (DLS) ve atomik kuvvet mikroskobu (AFM) analizi ile yapılmıştır.

##### **3.3.1.1. Taramalı Elektron Mikroskop (SEM) Analizi**

Kurkumin yüklü olmayan PBAT mikro ve nanopartiküllerin morfolojik özellikleri SEM analizi ile belirlenmiştir. Partiküllerin üretiminden sonra sulu haldeki PBAT mikro ve nanopartiküller 1/100 oranında seyreltilmiş ve 6,000 rpm hızda 1 dk homojenize edilmiştir. Sulu örnekler analiz yapılacak yüzeye damlatılarak oda koşullarında kurutulmuş ve altın-paladyum ile vakum altında yaklaşık 1 nm kalınlığında kaplanmıştır. Analizler taramalı elektron mikroskobu (SEM, Quanta 400F Field Emission SEM) ile yapılmıştır. Ayrıca partiküllerin ortalama gözenek boyutu ve boyut dağılımı SEM fotoğrafları üzerinden ImageJ (NIH, Bethesda) yazılım programı ile belirlenmiştir.

##### **3.3.1.2. Dinamik Işık Saçılım (DLS) Analizi**

Partiküllerin boy ve boy dağılımlarının belirlenmesi amacı ile dinamik ışık saçılımı analizi gerçekleştirilmiştir. Partiküllerin üretiminden sonra sulu haldeki PBAT mikro ve nanopartiküller 1/100 oranında seyreltilmiş ve 6,000 rpm hızda 1 dk homojenize edilmiştir. Sulu örnekler dinamik ışık saçılım cihazında (Zetasizer Nano S, Malvern, UK) bulunan örnek küvetine 1 mL olacak şekilde eklenerek analiz edilmiştir.

##### **3.3.2. Atomik Kuvvet Mikroskobu (AFM) Analizi**

Partikül boyutu ve morfolojisinin belirlenmesi amacıyla atomik kuvvet mikroskobu analizi yapılmıştır. Partiküllerin üretiminden sonra sulu haldeki PBAT mikro ve nanopartiküller 1/100 oranında seyreltilmiş ve 6,000 rpm hızda 1 dk homojenize edilmiştir. Sulu örnekler metal yüzeye damlatılarak oda koşullarında kurutulmuştur. Örnekler atomik kuvvet mikroskobunda (Nanomagnetics Instruments, Oxford, UK)

341.30 kHz salınım frekansında, 256 × 256 piksel çözünürlükte ve 2 µm/s tarama hızında analiz edilmiştir.

### **3.3.3. Fourier Dönüşümlü Kızılötesi Spektroskopisi (FTIR) Analizi**

Kurkumin yüklü olan ve olmayan PBAT mikro ve nanopartiküllerin kimyasal yapıları Fourier dönüşümlü kızılötesi spektrofotometresi (Thermo Scientific Nicolet iS10 FTIR spektrofotometresi, ABD) ile incelenmiştir. Ölçümler 4000-500 cm<sup>-1</sup> dalga sayısı aralığında gerçekleştirilmiştir.

### **3.3.4. Termogravimetrik-Diferensiyal Termal Analiz (TG-DTA)**

Termal gravimetrik analiz (TG-DTA) Perkin Elmer SII Exstar 6000 TG-DTA 6300 cihazında, PBAT polimeri, kurkumin, kurkumin yüklü ve yüklü olmayan PBAT mikro ve nanopartiküllerin termal özelliklerinin belirlenmesi amacı ile sıcaklık aralığı 0-600°C ve ısıtma hızı 10°C/dk esas alınarak atmosferik ortamda gerçekleştirilmiştir.

### **3.3.5. X Işını Kırınımı (XRD) Analizi**

X ışını kırınımı (XRD, Rigaku Ultima-IV, USA) analizi kurkumin, PBAT polimeri, kurkumin yüklü ve yüklü olmayan PBAT mikro ve nanopartiküllerinin kristalin yapılarının belirlenmesi amacı ile gerçekleştirilmiştir. Bu amaçla toz halindeki örneklerin her biri tarama derecesi 5°≤2θ°≤50° ve tarama hızı 1°/dk esas alınarak gerçekleştirilmiştir.

## **3.4. Kurkumin Yüklü PBAT Mikro ve Nanopartiküllerin Enkapsülasyon Verimlerinin Belirlenmesi**

Kurkumin yüklü PBAT mikro ve nanopartiküllerin enkapsülasyon verimini hesaplamak için elde edilen partikül içinde hapsolan kurkuminin tayinine dayanan yöntem kullanılmıştır. Bu amaçla bilinen miktarda kuru haldeki kurkumin yüklü PBAT partiküller 1 mL DCM içinde çözünmüştür. Böylelikle partikül içindeki kurkuminin serbest kalması sağlanmıştır. Ardından bu çözeltinin içine 5 mL etanol (Sigma Aldrich, ≥%99.8, Almanya) ilave edilip kurkuminin çözünmesi sağlanmıştır. Yüksek uçuculuktaki diklorometanın uçmasını sağlamak amacıyla DCM-etanol-kurkumin çözeltisi inert bir gaz olan azot gazına tabi tutulmuştur. Son durumda etanol içindeki kurkumin konsantrasyonunun belirlenmesi için spektrofotometrik tayin yöntemi kullanılmıştır. Kurkumin-etanol çözeltisi UV spektrofotometre

cihazında (NanoDrop, Thermo Scientific-2000c) analiz edilerek 430 nm dalga boyundaki kurkumin absorbans değerleri belirlenmiş ve Ek-1'de verilen kalibrasyon eğrisi oluşturulmuştur. Bilinen kurkumin konsantrasyonuna karşılık gelen absorbans değerlerini içeren kalibrasyon grafiğinden faydalanılarak bilinmeyen kurkumin konsantrasyonları belirlenmiştir. Enkapsülasyon analizi için kullanılan partiküllerin ağırlıkça içerdikleri kurkumin miktarları ile teorik enkapsülasyon değerleri hesaplanmıştır. Buna göre deneysel olarak elde edilen kurkumin konsantrasyonları ile teorik değer arasındaki ilişki % enkapsülasyon verimi olarak hesaplanmıştır.

Enkapsülasyon verimi (%) = yüklenen kurkumin miktarı (mg) / başlangıçtaki kurkumin miktarı (mg) X 100

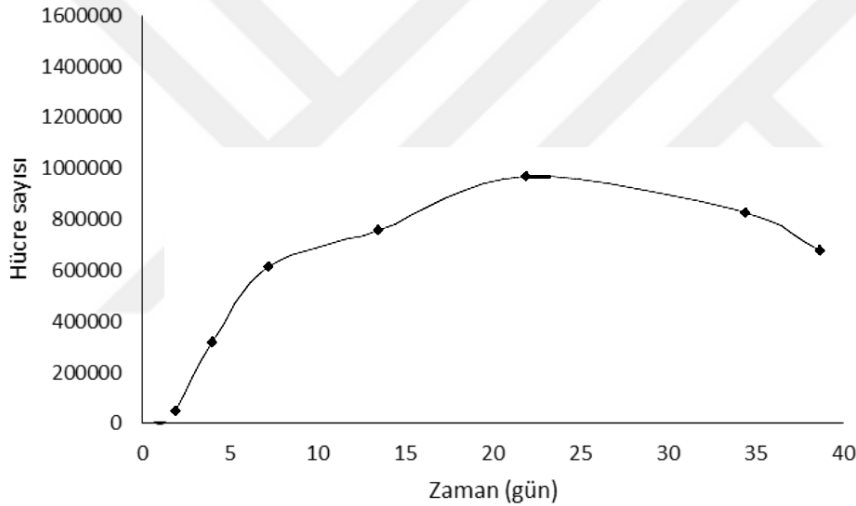
### 3.5. *İn-vitro* Kurkumin Salım Deneyleri

Kurkumin yüklü PBAT mikro ve nanopartiküller liyofilize edildikten sonra toz halindeki partikül 2 mL %0.1 (w/v) sodyum azid içeren fosfat tampon çözeltisine (pH: 7.4) ilave edilmiştir. *İn-vitro* kurkumin salım çalışmaları 37°C'de ve 70 rpm'de gerçekleştirilmiştir. Partiküllerden kurkumin salım çalışmasında belirli zaman aralıklarında salım ortamından örnek alınmadan önce salım ortamları 13,000 rpm'de 10 dk boyunca santrifüjlenerek partiküller çöktürülmüştür. Ardından salım ortamından 3., 5., 7., 12. ve 24. saatlerde ve salım süresi sonuna kadar her gün 50 µL örnek alınmış ve yerine 50 µL taze fosfat tamponu eklenmiştir. Alınan örnekler üzerine 50 µL etanol ilave edilerek kurkumin-PBS:etanol, 1:1 (v/v) çözeltileri elde edilmiştir. Alınan örneklerin spektrofotometrik tayininde enkapsülasyon verimi için hazırlanan kalibrasyon grafiğinden farklı bir grafik kullanılmıştır. Bu amaçla farklı miktarlarda kurkumin içeren kurkumin-PBS:etanol, 1:1 (v/v) çözeltileri UV spektrofotometre cihazında (NanoDrop) analiz edilip 430 nm'deki absorbans değerlerine karşılık gelen konsantrasyonlar grafiğe geçirilerek Ek-2'de yer alan kalibrasyon eğrisi elde edilmiştir. Elde edilen kalibrasyon grafiğinden faydalanılarak salım sonuçları belirlenmiştir. Alınan veriler kümülatif salım verileri halinde sunulmuş ve salım profilleri oluşturulmuştur. Kurkumin salım çalışmaları üç paralel örnek ile yürütülmüştür. Salım sonuçları sıfırıncı derece, birinci derece, Higuchi ve Hixson Crowell olmak üzere dört farklı salım kinetik modeline uygulanmıştır. Regresyon katsayıları göz önüne alınarak salım davranışlarının uygun olduğu kinetik model belirlenmiştir.

### 3.6. Hücre Kültür Çalışmaları

#### ***Kemik Öncül Hücresi Kültürü (MC3T3-E1 hücre hattı)***

Kurkumin yüklü olan ve olmayan PBAT mikro ve nanopartiküllerin sitotoksitesini belirlemek için kemik öncül hücreleri kullanılmıştır. Bu çalışma için model hücre hattı olan MC3T3-E1 tercih edilmiştir. Hücreler %10 (v/v) FBS, %1 penisilin/streptomisin, %1 L-glutamin içeren  $\alpha$ -MEM besi ortamında 37°C'deki %5 CO<sub>2</sub> içeren etüvde (Heraus Instruments, Almanya) kültüre edilmiştir. Her 3 günde bir besi ortamı değiştirilmiş 5-6 günde bir pasajlama işlemleri uygulanarak kültüre devam edilmiştir. Şekil 3.2'de yer alan hemositometrik hücre sayımı sonucu elde edilen MC3T3-E1 hücrelerine ait üreme grafiğinde 4. günde logaritmik faza ve 23. günden sonra ise durgun faza girdiği görülmektedir.



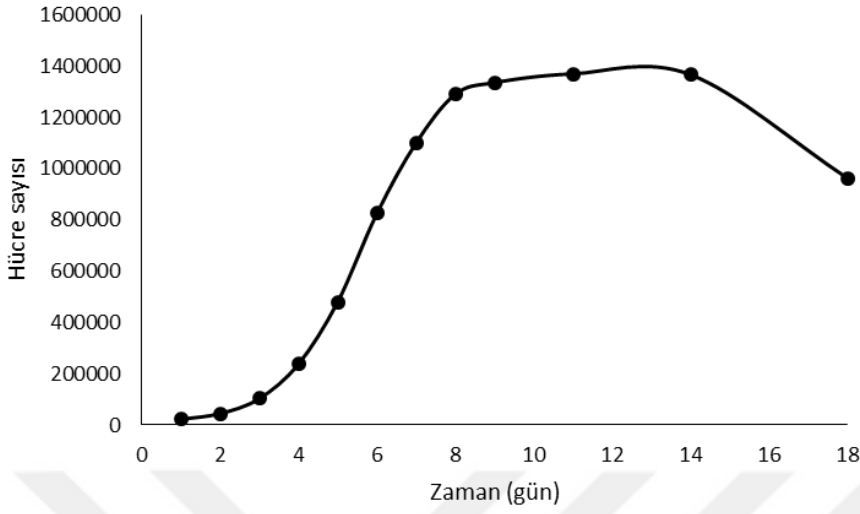
**Şekil 3.2.** Hemositometrik hücre sayımı sonucu elde edilen MC3T3-E1 üreme grafiği.

#### ***Kemik Kanser Hücresi Kültürü (MG-63 hücre hattı)***

Kurkumin içeren PBAT mikro ve nanopartiküllerin sağlıklı ve kanser hücrelerine etkisini tartışabilmek için kanser hücresi olan MG-63 hücre hattı kullanılmıştır. Hücreler, %10 (v/v) FBS, %2 L-glutamin ve %1 antibiyotik içeren DMEM (high glucose) besi ortamı kullanılarak, hücre kültür kaplarında çoğaltılmış ve 37°C'deki %5 CO<sub>2</sub> içeren etüvde kültüre edilmiştir. Tüm örnekler için, ortam, her 2 günde bir taze besi ortamıyla değiştirilmiş ve 4-5 günde bir pasajlama işlemi yapılmıştır. Şekil 3.3'te yer alan hemositometrik hücre sayımı sonucu elde edilen MG-63



hücrelerine ait üreme grafiğinde 3. günde logaritmik faza ve 14. günden sonra ise durgun faza girdiği görülmektedir.



**Şekil 3.3.** Hemositometrik hücre sayımı sonucu elde edilen MG-63 üreme grafiği.

### 3.6.1. İnhibitör Konsantrasyonunun Belirlenmesi

İnhibitör konsantrasyonu ( $IC_{50}$ ), antikanserojen maddenin %50 oranında hücre canlılığı, %50 oranında ise inhibisyon sağladığı konsantrasyon olup, ilaç doz çalışmaları için kullanılan bir analiz ile belirlenmektedir.

#### 3.6.1.1. Kurkuminin İnhibitör Konsantrasyonunun Belirlenmesi

Kurkumin inhibitör konsantrasyonunun belirlenmesi için MC3T3-E1 ve MG-63 hücreleri kullanılmıştır. Belli konsantrasyonlardaki kurkumin DMSO içinde çözülmüş ardından üç gün süresince hücrelerle etkileştirilmiştir. Hücre canlılığı her gün MTT analizi ile belirlenmiştir. DMSO içinde çözünen kurkuminin hücreler üzerindeki etkisi 10, 20, 30, 40 ve 50  $\mu$ M olacak şekilde beş ayrı konsantrasyon grubunda incelenmiştir. Hücreler  $2.5 \times 10^4$  hücre/ $cm^2$  yoğunlukta olan 24 gözlü hücre kültür kaplarına ekilmiştir. Hücreler yüzeye tutunması için 24 saat boyunca büyüme ortamı içinde %5  $CO_2$  ve  $37^\circ C$ 'de inkübe edilmiştir. Yeterli hücre doluluk oranının sağlanmasının ardından besin ortamları uzaklaştırılmış ve DMSO içinde çözünen kurkuminin 10, 20, 30, 40 ve 50  $\mu$ M konsantrasyonları hücre büyüme ortamlarına eklenmiştir. Analiz günlerinde göz başına 600  $\mu$ L serum içermeyen taze besi ortamı ve 60  $\mu$ L MTT boyası eklenerek 3 saat boyunca %5  $CO_2$  ve  $37^\circ C$ 'de inkübe edilmiştir. İnkübasyonun ardından MTT çözeltisi içeren ortam

uzaklaştırılmış ve her göze 400 µL 0.04 M HCl içeren izopropanol çözeltisi eklenerek formazan kristallerinin çözünmesi sağlanmıştır. Ardından her gözden 200 µL süpernatant alınarak 96-gözlü kültür kabına konulmuş ve 690 nm referans alınarak 570 nm'de mikropate okuyucu (Oasys UVM 340, Avusturya) ile spektrofotometrik olarak ölçüm yapılmıştır. Elde edilen optik yoğunluklar, kontrol grubunun optik yoğunluk değerine bölünüp yüz ile çarpılarak % hücre canlılıklarına ulaşılmıştır. Her gün için % hücre canlılıkları farklı kurkumin konsantrasyonları için hesaplanmıştır. Farklı kurkumin konsantrasyonlarına karşı hücrelerin % canlılığı grafiğe geçirilerek doz-yanıt eğrisi elde edilmiştir. Elde edilen verilerden % 50 hücre canlılığına ulaşılan kurkumin konsantrasyonu belirlenmiştir. Kurkuminin kanserli hücreler üzerinde etkin olduğu inhibitör konsantrasyonu ile kemik öncül hücrelerindeki inhibitör konsantrasyon değerleri birbiri ile karşılaştırmalı olarak incelenmiştir.

### **3.6.1.2. Kurkumin Yüklü PBAT Nanopartiküllerin İnhibitör Konsantrasyonunun Belirlenmesi**

Kurkumin yüklü PBAT nanopartiküllerin inhibitör konsantrasyonu belirlenirken Bölüm 3.6.1.1'de anlatılan kurkumin inhibitör konsantrasyonunun belirlenmesi ile benzer çalışmalar gerçekleştirilmiştir. Ancak farklı olarak 1, 3, 5, 10 ve 15 µM kurkumin içeren PBAT nanopartiküllerin MG-63 hücreleri üzerindeki etkisi incelenmiştir. Bu amaçla enkapsüle edilmiş kurkumin miktarı ve enkapsülasyon veriminden yola çıkılarak hesaplanan kurkumin yüklü PBAT nanopartikül miktarları DMEM besin ortamına ilave edilmiş ve MG-63 hücrelerine 3 gün süresince uygulanmıştır. MTT analizi ile elde edilen optik yoğunluklar, kontrol grubunun optik yoğunluk değerine bölünüp yüz ile çarpılarak % hücre canlılıklarına ulaşılmıştır. Farklı kurkumin içeriklerine karşı hücrelerin % canlılığı grafiğe geçirilerek doz-yanıt eğrisi elde edilmiştir. Elde edilen verilerden % 50 hücre canlılığına ulaşılan kurkumin yüklü PBAT nanopartikül miktarı belirlenmiştir. Kurkumin yüklü PBAT mikro ve nanopartiküllerin kanserli hücreler üzerinde etkin olduğu inhibitör konsantrasyon ile kemik öncül hücrelerindeki inhibitör konsantrasyon değerleri birbiri ile karşılaştırmalı olarak incelenmiştir.

### 3.6.1.3. Optik Mikroskop ile Analiz

Partiküllerin MG-63 ve MC3T3-E1 hücreleri üzerine etkisini morfolojik olarak gözlemek için kültürün 1. 2. ve 3. günlerinde optik mikroskop (Olympus, ABD) fotoğrafları çekilmiş ve uygulamanın hücreler üzerindeki etkisi mikroskopik gözlem ile takip edilmiştir.

### 3.6.2. Sitotoksite Analizleri

Kurkumin yüklü ve yüklü olmayan PBAT mikro ve nanopartiküllerin sitotoksik etkileri MG-63 ve MC3T3-E1 hücreleri üzerinde *in-vitro* olarak incelenmiştir. Mikro ve nanopartiküller için belirlenen kurkumin inhibitör konsantrasyonları hücrelere 7 gün süre ile uygulanmıştır. MG-63 ve MC3T3-E1 hücreleri  $2.5 \times 10^4$  hücre/cm<sup>2</sup> hücre yoğunluğunda 24 gözlü kültür kaplarına ekilmiştir. Yeterli hücre doluluk oranının sağlanmasının ardından besin ortamları uzaklaştırılmış ve inhibitör konsantrasyon miktarları göz önüne alınarak kurkumin yüklü PBAT mikro ve nanopartiküller içeren MG-63 hücreleri için DMEM; MC3T3-E1 hücreleri için ise  $\alpha$ -MEM besin ortamı ilave edilmiştir. Partiküllerin hücreler üzerindeki etkileri 1., 2., 3., 5. ve 7. gün MTT analizleri ile belirlenmiştir. Hücrelerin karakterizasyon çalışmaları canlı-ölü analizi, hücre alım analizi ve kristal viyole boyama ile gerçekleştirilmiştir.

#### 3.6.2.1. MTT Analizi

Partikül uygulanan hücrelerin metabolik aktivitelerinin belirlenmesi amacıyla MTT analizi gerçekleştirilmiştir. Belirlenen günlerde kurkumin yüklü PBAT mikro ve nanopartikül uygulanan hücrelerin üzerindeki kültür ortamları alınarak (1., 2., 3., 5. ve 7. gün) göz başına MG-63 hücreleri için 600  $\mu$ L DMEM, MC3T3-E1 hücreleri için 600  $\mu$ L  $\alpha$ -MEM taze besin ortamı ve 60  $\mu$ L MTT boyası eklenerek 3 saat boyunca %5 CO<sub>2</sub> ve 37°C'de hücreler inkübe edilmiştir. İnkübasyonun ardından MTT çözeltisi içeren ortam uzaklaştırılmış ve her göze 400  $\mu$ L 0.04 M HCl içeren izopropanol çözeltisi eklenerek formazan kristallerinin çözünmesi sağlanmıştır. Her gözden 200  $\mu$ L süpernatant alınarak 96-gözlü kültür kabına konulmuş ve 690 nm referans alınarak 570 nm'de mikropate okuyucu ile spektrofotometrik olarak ölçüm yapılmıştır. Elde edilen optik yoğunluklar, kontrol grubunun optik yoğunluk değerine bölünüp yüz ile çarpılarak % hücre canlılıklarına ulaşılmıştır. Her analiz günü için % hücre canlılıkları kurkumin yüklü ve yüklü olmayan PBAT mikro ve nanopartiküller için hesaplanmıştır.

### 3.6.2.2. Canlı-Ölü Hücre Analizi

Canlı ve ölü hücrelerin belirlenmesi amacı ile gerçekleştirilen bu analizde boya olarak etidyum homodimer-1 (Eth-1, E1903, Sigma) ve kalsein-AM (c-AM, 17783, Sigma) kullanılmıştır. Canlı hücrelerin belirlenmesini sağlayan kalcein AM hücre membranından geçebilme özelliğine sahiptir. Floresan özellik taşımayan kalsein-AM hücre sitoplazmasında intraselüler aktivite (esteraz aktivitesi) ile enzimatik hidrolize uğrayarak floresan özellikteki kalseine dönüşür ve böylece floresan mikroskop altında bakıldığında canlı hücre yeşil renkte gözükür. Polianyonik bir molekül olan kalsein canlı hücreler tarafından kolayca tutulabilmektedir. Ölü hücrelerin belirlenmesini sağlayan etidyum homodimer-1'dir. Normal şartlarda etidyum homodimer canlı hücrenin membranından geçemez. Hücre membran bütünlüğü bozulduğunda yani hücre öldüğünde etidyum hücre içine girer ve nükleik asitlere bağlanır. Canlılığını yitirmiş hücreler etidyum homodimer ile boyandığında floresan mikroskop altında kırmızı renk verirler.

Analiz için partikül uygulaması gerçekleştirilmeden önce MG-63 ve MC3T3-E1 hücreleri  $1 \times 10^4$  hücre/göz hücre yoğunluğunda 48 gözlü kültür kabına ekilmiştir. Hücrelerin 24 saat süresince yüzeye yapışmaları ve ortama uyumları sağlanmıştır. Kültür ortamı tüm gözlerden uzaklaştırılmış ve kurkumin yüklü ve yüklü olmayan PBAT mikro ve nanopartiküllerin inhibitör konsantrasyonları göz önüne alınarak hazırlanan kültür ortamları her göze ilave edilmiştir. Partikül uygulamasından 24 saat sonra hücreler boyanmıştır. Bu amaçla kültür ortamı tüm gözlerden uzaklaştırılmış ve  $Ca^{2+}$  ve  $Mg^{2+}$  içeren D-PBS (D-PBS+) ile yıkanan örnekler  $1 \mu M$  kalcein-AM ve  $1 \mu M$  EthD-1 içeren D-PBS+ ile 30 dk oda koşullarında karanlıkta inkübasyona tabi tutulmuştur. İnkübasyon sonrası D-PBS+ ile 2 kez yıkanan örnekler, mikroskop ile analiz edilmiştir.

### 3.6.2.3. Hücre Canlılığı ve Morfolojisinin Görüntülenmesi

Hücre canlılığı ve morfolojilerinin görüntülenmesi amacıyla birçok boyama tekniği mevcuttur. Bu bölümde hücre canlılığı ve morfolojisinin incelenmesi için F-aktin/DAPI boyaması uygulanmıştır. Analiz için MG-63 ve MC3T3-E1 hücreleri  $1 \times 10^4$  hücre/göz hücre yoğunluğunda 48 gözlü kültür kabına ekilmiştir. 24 saat sonunda kültür ortamı tüm gözlerden uzaklaştırılmış ve kurkumin yüklü ve yüklü olmayan PBAT mikro ve nanopartiküllerin inhibitör konsantrasyonları göz önüne

alınarak hazırlanan partikül içeren kültür ortamları her göze ilave edilmiştir. Partikül uygulamasından 24 saat sonra hücreler fiksasyon işlemine tabi tutulmuştur. Bu amaçla kültür ortamı tüm gözlerden uzaklaştırılmış ve üç kez PBS ile yıkamanın ardından %2.5 (v/v)'luk glutaraldehit çözeltisi içinde 30 dk oda koşullarında bekletilmiştir. Fiksasyon işleminin ardından örnekler 2 kez PBS ile yıkanmıştır. Hücre membran geçirgenliğini arttırmak için hücrelere PBS içinde hazırlanan %0.1 Triton X-100 çözeltisi oda koşullarında 10 dk süresince uygulanmıştır. Ardından %0.1 Triton X-100 çözeltisi uzaklaştırılarak PBS içerisinde hazırlanan % 1 'lik BSA çözeltisi ile 3 defa yıkama işlemi uygulanmıştır. Her göze yaklaşık 100 µL'lik F-aktin/DAPI çözeltisi (% 1 w/v BSA/PBS çözeltisine %1 Alexa Flour 488 Phalloidin ve % 0.1 DAPI çözeltisi eklenerek hazırlanmıştır) eklenerek hücreler 30 dk karanlık ortamdaki oda koşullarında inkübe edilmiştir. F-aktin/DAPI boyası uzaklaşana kadar BSA/PBS ile 3 defa beşer dakika yıkanmıştır. Ardından hücreler ve partiküller floresan mikroskobu ile görüntülenmiştir.

### **3.6.3. Hücre Döngü Analizi**

Hücre döngü analizi için akış sitometri cihazı (BD Accuri™ C6, ABD) kullanılmıştır. Bu amaçla MG-63 ve MC3T3-E1 hücreleri  $5 \times 10^6$  hücre/flask hücre yoğunluğunda 25 cm<sup>2</sup> T-flasklarına ekilmiştir. MG-63 ve MC3T3-E1 hücreleri 24 saat boyunca büyüme ortamında, %5 CO<sub>2</sub> ve 37°C'de inkübe edilmiştir. Hücre tutunması gerçekleşikten sonra büyüme ortamları uzaklaştırılmış ve kurkumin yüklü ve yüklü olmayan PBAT mikro ve nanopartiküllerin inhibitör konsantrasyonları göz önüne alınarak hazırlanan kültür ortamları hücre kültür flaskına ilave edilmiştir. Partikül uygulamasından 24 saat sonra kültür ortamları uzaklaştırılmış ve bir kez 5 mL steril PBS (Ca<sup>++</sup>, Mg<sup>++</sup> içermeyen) ile yıkama yapılmıştır. Ardından PBS atılarak 25 cm<sup>2</sup>'ye 1 mL olacak şekilde tripsin+EDTA karışımı ilave edilmiş ve hücrelerin 5 dk süresince %5 CO<sub>2</sub> ve 37°C'de yüzeyden kalkması sağlanmıştır. İnkübasyonu takiben yüzeyden kalkmış hücrelerin bulunduğu hücre kültür flasklarına 5'er mL kültür ortamı ilave edilmiş ve 1,000 rpm'de 5 dk santrifüj işlemi uygulanmıştır. Süpernatant atılarak 5 mL steril PBS çözeltisi ile 1,000 rpm'de yıkama gerçekleştirilmiştir. Yıkama işlemi sonrasında süpernatant atılarak 2 mL steril PBS eklenmiş ve hücreler 3 dk süresince 5,000 rpm hızda santrifüj edilmiştir. PBS uzaklaştırılmış ve % 70'lik soğuk etanol damla damla hücrelere ilave edilmiş ve hücreler ile etanolün etkileşimi sağlanmıştır. Analiz gününe kadar %70'lik etanol ile

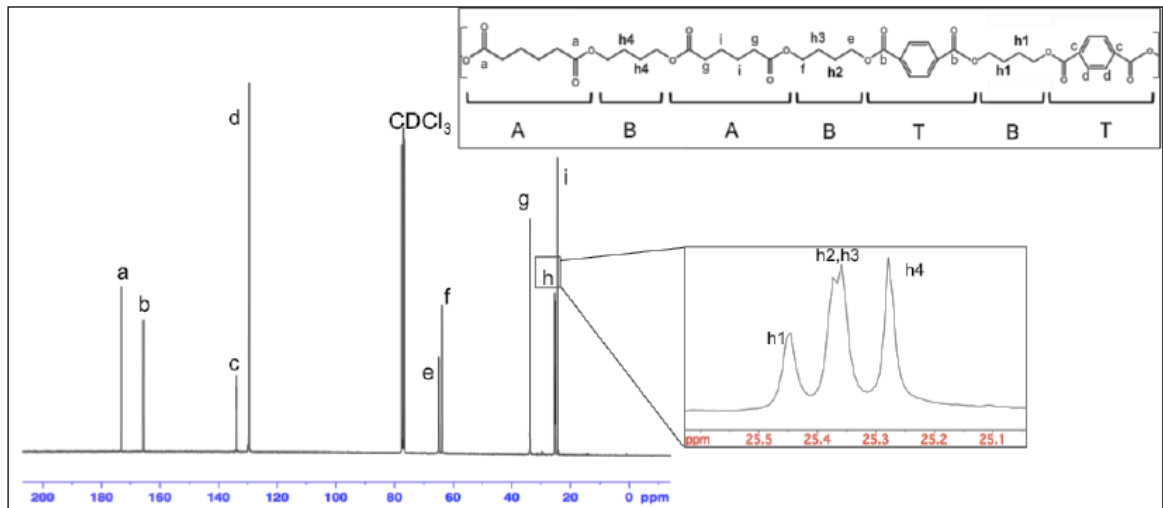
fiksasyonu sağlanan hücresler -20°C'de muhafaza edilmiştir. Analiz öncesinde etanolün tamamen uzaklaştırılması amacı ile hücresler 2 defa PBS ile yıkanarak 1,500 rpm hızda santrifüj edilmiştir. Süpernatant uzaklaştırılarak hücreslere 1 mL PI çözeltisi (10 µg/mL propidyum iyodür, % 0.1 triton X-100 ve 100 µg/mL DNase-free RNase) ilave edilmiş ve karanlık oda koşulunda 30 dk inkübe edilmiştir. PI stok çözeltilerin hazırlanması sırasında propidyum iyodür ultra saf suda ve Triton X-100 steril PBS'te çözülmüştür. Tüm bu işlemler sonrasında hücresler akış sitometre sisteminde 488 nm dalga boyunda FL-2, FL-3 kanallarından eş zamanlı veri alınarak analiz edilmiştir. Analiz sırasında cihazın tıkanmaması için hücre yoğunluğunun  $1 \times 10^6$  hücre/mL'yi geçmemesine dikkat edilmiştir.



## 4. SONUÇLAR VE TARTIŞMA

Tez çalışmasının bu kısmında deneysel çalışmaların sonuçları ve bu sonuçların değerlendirilmesi yer almaktadır. Sırasıyla, kurkumin yüklü olan ve olmayan PBAT mikro ve nanopartiküllerin üretimi ve karakterizasyonu, kurkumin yüklü PBAT mikro ve nanopartiküllerin *in-vitro* salım çalışmaları ve son olarak hücre kültür çalışmalarında ise partiküllerin MG-63 ve MC3T3-E1 hücreleri ile gerçekleştirilen sitotoksosite analizleri ve anti-kanser etkilerinin incelenmesine yer verilmiştir.

Daha önce Bölüm 2.5.2'de de bahsedildiği gibi PBAT'ın biyobozunurluk özellikleri yapısındaki alifatik ve aromatik grupların miktarlarına bağlıdır. Aromatik blokların polimer zincirindeki miktarı arttığında bozunma hızı düşmektedir [9]. Ayrıca biyobozunurluk açısından PBAT bileşiminde bulunan tereftalik asit miktarının %35 ve %55 arasında olması gerektiği belirtilmiştir [90]. Tez çalışmasında kullanılan SASA (Adana) firmasından temin edilen PBAT reçinelerinin grubumuz tarafından yapılan bir çalışmada bütülen tereftalat ve bütülen adipat gruplarının molce yüzdeleri  $^{13}\text{C}$ -NMR analizi ile sırasıyla %42 ve %58 olarak belirlenmiştir [10]. PBAT'a ait  $^{13}\text{C}$ -NMR spektrumu Şekil 4.1'de görülmektedir. Belirlenen bu değerlerin, BASF firması tarafından üretilen Ecoflex® isimli ticari PBAT polimerinin bileşimine (BT: %44, BA: %56) yakın olduğu görülmüştür.



**Şekil 4.1.** SASA firmasından temin edilen PBAT reçinelerinin  $^{13}\text{C}$ -NMR spektrumu [10].

#### 4.1. PBAT Partiküllerin Karakterizasyon Çalışmaları

Bu çalışma kapsamında kurkumin salımı için partiküler formda ilaç sistemleri geliştirilmiştir. Bu amaçla PBAT, mikropartikül ve nanopartikül olmak üzere iki farklı formda üretilmiştir. Mikropartiküller büyük boyutlu olmalarıyla daha yavaş ilaç salım profiline olanak sağlarlar. Bunun yanında nanopartiküller ise geniş yüzey alanları ile yüksek ilaç yükleme kapasitesine sahiptirler [33, 130]. Yapılan tez çalışmasında mikro ve nanopartiküller olmak üzere iki farklı boyuttaki partiküler sistemin ilaç salım sistemleri olarak kullanım potansiyelleri belirlenmiştir.

Hazırlanan PBAT mikro ve nanopartiküller polimer derişimi, emülsiyon ajanı türü ve emülsiyon ajanı derişimleri değiştirilerek öncelikle ilaçsız olarak hazırlanmıştır. Partiküllerin boyut özellikleri SEM analizleri ve ImageJ programı kullanılarak belirlenmiştir. Elde edilen sonuçlar doğrultusunda düzgün küresel morfolojiye sahip partiküller seçilmiştir. İlaç yükleme ve salım çalışmalarında bu seçilen partiküller kullanılmıştır. Hazırlanan mikro ve nanopartiküllerin karakterizasyon çalışmalarında morfolojik yapının belirlenmesi için SEM ve DLS, kimyasal yapının belirlenmesi için FTIR, TG-DTA, DSC ve XRD analizleri gerçekleştirilmiştir.

##### 4.1.1. Partikül Boyutunun Belirlenmesi

###### *İlaç İçermeyen Partiküller*

PBAT mikro ve nanopartiküller polimer derişimi, emülsiyon ajanı türü ve emülsiyon ajanı derişimleri değiştirilerek hazırlanmıştır. Farklı deney gruplarına ait PBAT mikro ve nanopartiküllerin ortalama çaplarına ait sonuçlar Çizelge 4.1'de görülmektedir. Partiküllerin ortalama çapları SEM analizleri sonucunda elde edilen görüntüler ile ImageJ programı kullanılarak 100 adet partikül için belirlenmiş ve ortalama olarak hesaplanmıştır. ImageJ programında görüntü üzerinde belirtilen skala büyüklüğü seçilerek bu büyüklük programa tanıtılmıştır. Program daha sonra bu büyüklüğü temel alarak seçilen partiküllerin boyutunu hesaplamıştır. Elde edilen sonuçlar doğrultusunda Çizelge 4.1'de görüldüğü gibi farklı deney gruplarına ait partikül çaplarının çeşitli parametrelerin derişimi ile paralel olarak derişkenlik gösterdiği belirlenmiştir. Çizelge 4.1'de kullanılan her iki emülsiyon ajanı için PBAT derişimi arttıkça partikülün çapının arttığı görülmektedir. Ayrıca iki farklı tip emülsiyon ajanından PVA ile hazırlanan partiküllerin boyutunun, DMAB ile hazırlanan partiküllerin boyutuna göre daha büyük olduğu tespit edilmiştir. Diğer



bir parametre olan emülsiyon ajanı derişiminin arttırılması ile (PBAT derişimi sabit iken) partikül çapının azaldığı görülmüştür.

Mikropartiküller Çizelge 4.1'de görüldüğü gibi, %1 PBAT, %1 PVA (çap:  $1.05 \pm 0.53 \mu\text{m}$ ); % 2.5 PBAT, %1 PVA (çap:  $1.51 \pm 0.94 \mu\text{m}$ ) ve % 2.5 PBAT, % 2.5 PVA (çap:  $2.23 \pm 1.24 \mu\text{m}$ )' nın kullanıldığı durumlarda elde edilmiştir. Nanopartiküller ise % 0.5 PBAT, % 1 DMAB (çap:  $355 \pm 270 \text{ nm}$ ), % 0.5 PBAT, % 1.5 DMAB (çap:  $330 \pm 150 \text{ nm}$ ); % 1 PBAT, % 1 DMAB (çap:  $420 \pm 220 \text{ nm}$ ); % 1 PBAT, % 1.5 DMAB (çap:  $380 \pm 180 \text{ nm}$ ) ve % 2.5 PBAT, % 1 DMAB (çap:  $770 \pm 400 \text{ nm}$ )' in kullanıldığı durumlarda elde edilmiştir.

**Çizelge 4.1.** PBAT mikro ve nanopartiküllerin boy ve boy dağılımları

Deney No.	% PBAT, (w/v)	% PVA, (w/v)	% DMAB, (w/v)	Partikül Boyutu, $\mu\text{m}$
1	0.5	-	1	$0.36 \pm 0.28$
2	0.5	-	1.5	$0.33 \pm 0.16$
3	1	-	1.5	$0.38 \pm 0.18$
4	1	1	-	$1.05 \pm 0.53$
5	1	-	1	$0.42 \pm 0.22$
6	2.5	1	-	$1.51 \pm 0.94$
7	2.5	-	1	$0.77 \pm 0.40$
8	2.5	2.5	-	$2.23 \pm 1.24$

### ***İlaç Yüklü Partiküller***

PBAT mikro ve nanopartiküllerin morfolojik özelliklerinin belirlenmesinin ardından kurkumin enkapsülasyonu için mikro ve nano boyutta olmak üzere iki farklı partikül tipi seçilmiştir. Bu amaçla PBAT mikro ve nanopartiküllere kurkumin yükleme çalışmalarında, morfolojik özellikleri bakımından düzgün küresel formda ve boyut dağılımları dar aralıkta olacak şekilde seçilen partiküllere PBAT/Kurkumin, (w/w) oranının 5, 10 ve 20 olduğu üç farklı miktarda kurkumin yüklemesi gerçekleştirilmiştir. Diğer mikropartiküllere göre boyut dağılımlarının daha dar bir aralıkta olmasından dolayı % 1 PBAT, % 1 PVA kullanılarak hazırlanan

mikropartiküller (Çizelge 4.1, Deney No: 4) ilaç yükleme ve salım çalışmalarında kullanılmak üzere seçilmiştir. İlaç yüklemesi yapılacak nanopartiküllerin belirlenmesinde ise ilk basamakta en küçük boyutlu partikül olan % 0.5 PBAT, % 1.5 DMAB kullanılarak hazırlanan nanopartiküller (Çizelge 4.1, Deney No: 2) seçilmiştir. Ardından seçilen nanopartiküllere kurkumin yüklemesi gerçekleştirildiğinde enkapsülasyon veriminin % 20 olduğu belirlenmiştir. Enkapsülasyon veriminin artırılması amacıyla polimer derişimi artırılarak % 1 PBAT, % 1.5 DMAB (Çizelge 4.1, Deney No: 3) kullanılarak hazırlanan nanopartiküllerin enkapsülasyon verimi hesaplanmış ve % 90 olarak bulunmuştur. Bu nedenle devam eden ilaç salım çalışmaları bu grup nanopartiküller ile gerçekleştirilmiştir. Çizelge 4.2'de görüldüğü gibi hem mikropartiküller hem nanopartiküller için PBAT/Kurkumin (w/w) oranının 10 olduğu durumda en yüksek kurkumin enkapsülasyon verimine ulaşılmıştır. Nanopartiküller ve mikropartiküller için aynı miktardaki kurkumin yüklemelerinin tümünde, küçük boyuttaki nanopartiküllerin geniş yüzey alanına sahip olması nedeniyle kurkumin enkapsülasyon verimlerinin daha yüksek olduğu görülmüştür.

**Çizelge 4.2.** PBAT mikro ve nanopartiküllerin kurkumin enkapsülasyon verimleri.

Deney No.	% PBAT, (w/v)	% PVA, (w/v)	% DMAB, (w/v)	m <sub>PBAT</sub> /m <sub>KUR</sub> (w/w)	% kurkumin enkapsülasyonu,
1	1	-	1.5	5	80±5
2	1	-	1.5	10	90±3
3	1	-	1.5	20	70±5
4	1	1	-	5	72±3
5	1	1	-	10	80±5
6	1	1	-	20	50±7

Seçilen mikro ve nanopartiküllere yüklenecek kurkumin miktarlarının belirlenmesini ardından en yüksek kurkumin enkapsülasyonunun elde edildiği kurkumin miktarı (PBAT/Kurkumin (w/w) oranının 10 olduğu) partiküllere yüklenmiştir. Partiküllerin ortalama çapları SEM analizleri sonucunda elde edilen görüntüler ile ImageJ programı kullanılarak hesaplanmıştır. Çizelge 4.3'te görüldüğü gibi kurkumin yüklü

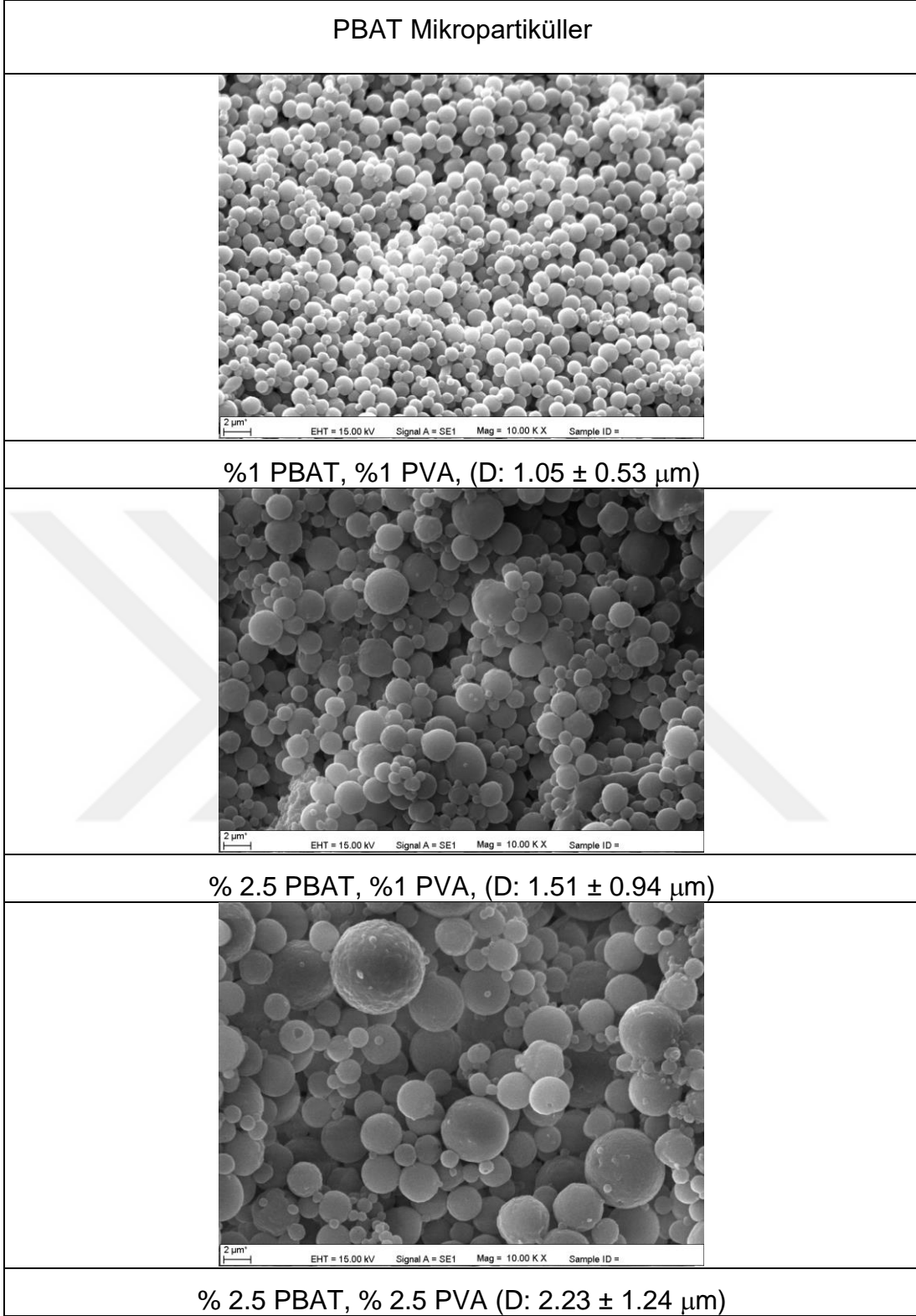
PBAT mikro ve nanopartiküller için sırasıyla  $1.22\pm 4.44$   $\mu\text{m}$  ve  $0.39\pm 0.17$   $\mu\text{m}$  boyutlarında partiküller elde edilmiştir.

**Çizelge 4.3.** Kurkumin içeren PBAT mikro ve nanopartiküllerin çapları.

Deney No.	%PBAT, (w/v)	%PVA, (w/v)	%DMAB, (w/v)	$m_{\text{PBAT}}/m_{\text{KUR}}$ (w/w)	Partikül Boyutu, $\mu\text{m}$
1	1	-	1.5	10	$0.39\pm 0.17$
2	1	1		10	$1.22\pm 0.44$

#### 4.1.1.1. Taramalı Elektron Mikroskop (SEM) Analizi

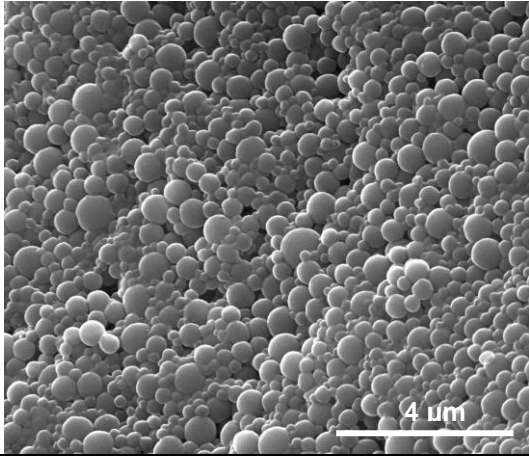
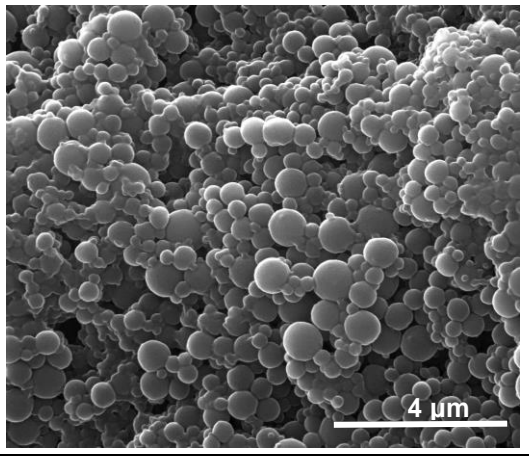
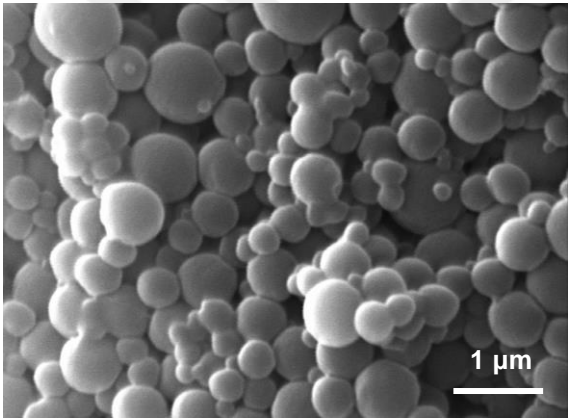
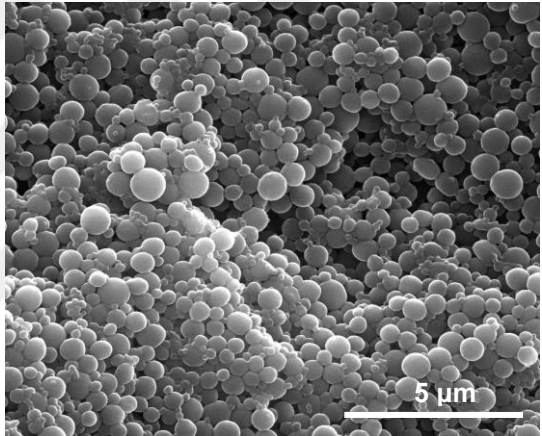
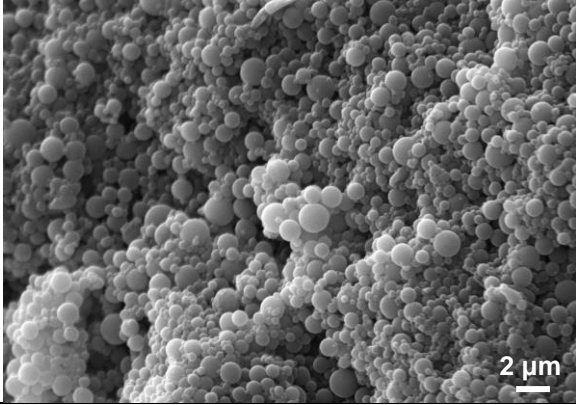
Aşağıda PBAT mikropartiküller, PBAT nanopartiküller ve kurkumin yüklü PBAT mikropartiküller ve nanopartiküllere ait SEM görüntüleri verilerek gerekli yorumlar yapılmıştır. PBAT mikropartiküllere ait görüntülerden (Şekil 4.2) hazırlanan tüm mikropartiküllerin düzgün küresel formda olduğu görülmektedir. Ayrıca % 1 PBAT ve % 1 PVA kullanılarak hazırlanan mikropartiküllerin diğerlerine göre partikül boy dağılımının daha dar aralıkta elde edildiği gözlenmektedir. Bölüm 4.1.1'de anlatıldığı üzere % 1 PBAT, % 1 PVA kullanılarak hazırlanan mikropartiküllerin kurkumin yükleme ve salım çalışmaları için daha uygun olduğu sonucuna varılmıştır. Elde edilen sonuçlar Bölüm 2.4.3'te ayrıntılı olarak anlatılan Stloukal ve arkadaşları ile Brunner ve arkadaşlarının yaptıkları çalışmalarda rapor edilen sonuçlarla uyumluluk göstermektedir [85, 131].



**Şekil 4.2.** PBAT mikropartiküllerin SEM görüntüleri. (D, ortalama  $\text{\AA}$ ap değerini ifade etmektedir.)

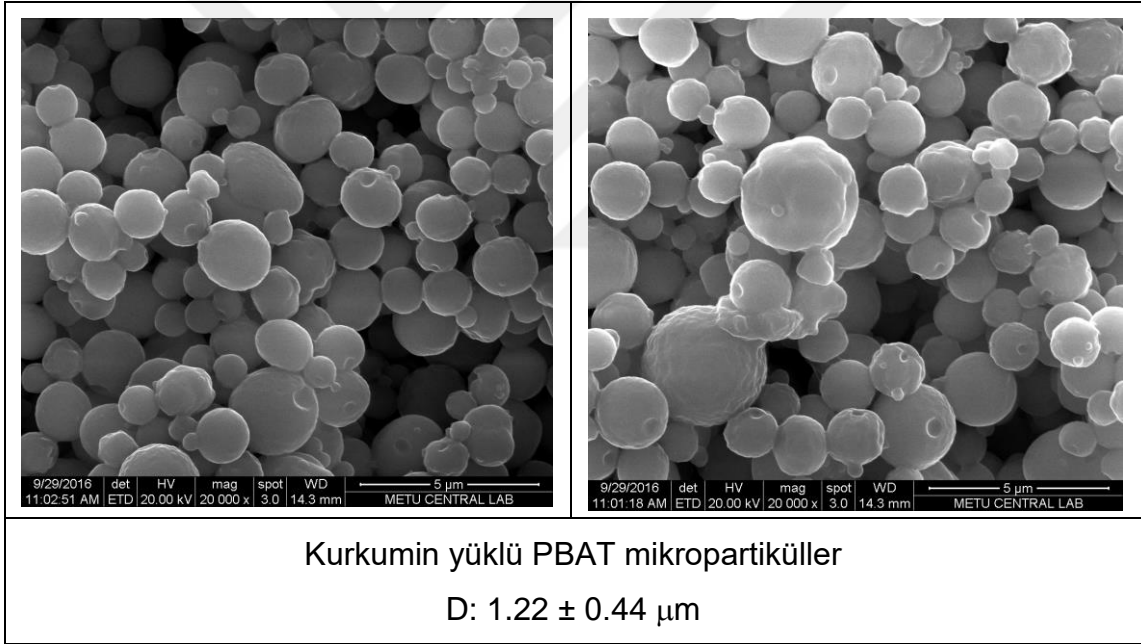
PBAT polimeri daha önce Brunner ve arkadaşlarının yaptığı bir çalışmada ilaç salım sistemleri için kullanılmıştır ancak nanopartiküler formda hazırlanmamıştır. Bu çalışma ile literatürde ilk kez PBAT nanopartiküller ilaç salım sistemlerinde kullanılmak üzere üretilmiştir. Şekil 4.3'teki SEM görüntülerinden hazırlanan PBAT nanopartiküllerin düzgün küresel formda olduğu açıkça görülmektedir. Bu çalışma kapsamında elde edilen sonuçlar literatürdeki emülsiyon hazırlama-çözücü buharlaştırma yöntemi ve DMAB ile hazırlanan nanopartiküllerin morfolojik özellikleri ile benzerlik göstermektedir [132, 133].

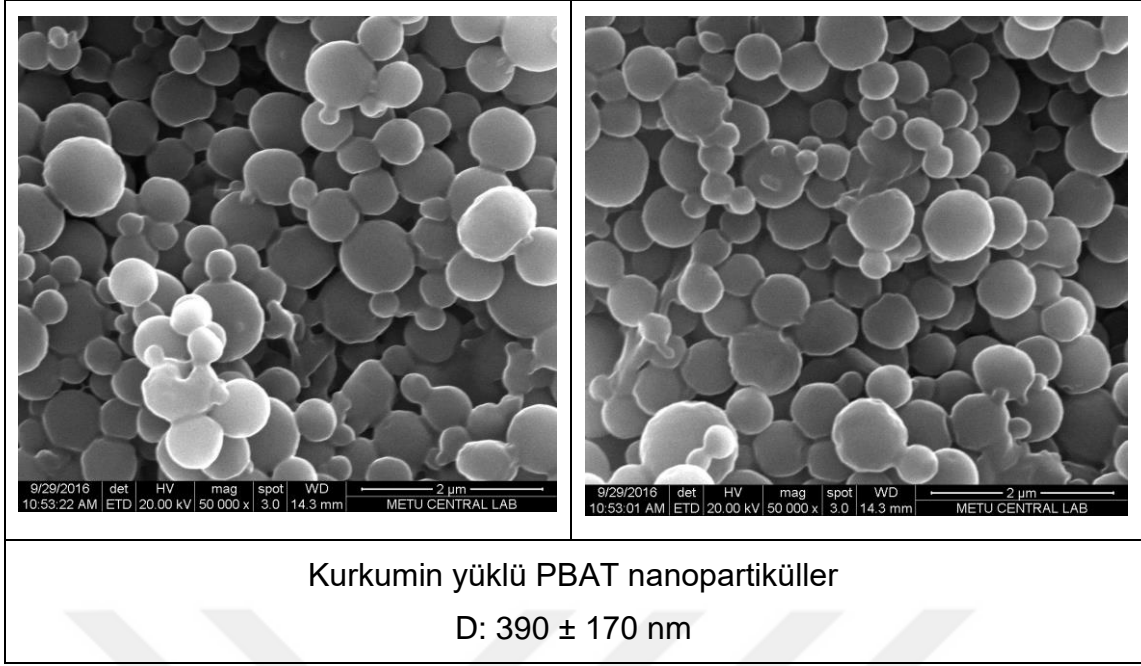
Kurkumin yükleme ve salım çalışmaları için hazırlanan PBAT nanopartiküllerden % 0.5 PBAT, % 1.5 DMAB kullanılarak hazırlanan nanopartikül çapının diğerlerine göre daha küçük olduğu belirlenmiştir. Ancak kurkumin yükleme çalışmalarında enkapsülasyon veriminin oldukça düşük miktarda (% 20) olmasından dolayı % 1 PBAT, % 1.5 DMAB kullanılarak hazırlanan nanopartiküller ilaç yükleme etkinliği açısından incelenmiş ve bu nanopartiküllerin kurkumin enkapsülasyon verimi % 90 olarak bulunmuştur. % 1 PBAT, % 1.5 DMAB kullanılarak hazırlanan nanopartiküllerin de standart sapma değerinin küçük olmasıyla daha homojen boyutta hazırlandığı görülmektedir. Bundan dolayı % 1 PBAT, % 1.5 DMAB kullanılarak hazırlanan nanopartiküller kurkumin yükleme ve salım çalışmaları için seçilmiştir.

PBAT Nanopartiküller	
	
% 0.5 PBAT, % 1 DMAB (D: 355 ± 270 nm)	% 0.5 PBAT, % 1.5 DMAB (D: 330 ± 150 nm)
	
% 1 PBAT, % 1 DMAB (D: 420 ± 220 nm)	% 1 PBAT, % 1.5 DMAB (D: 380 ± 180 nm)
	
% 2.5 PBAT, % 1 DMAB (D: 770 ± 400 nm)	

Şekil 4.3. PBAT nanopartiküllerin SEM görüntüleri. (D, ortalama çap değerini ifade etmektedir.)

Şekil 4.4'te kurkumin yüklü PBAT mikropartikül ve nanopartiküllere ait SEM fotoğrafları bulunmaktadır. Bu görüntülerden ilaç yüklemesi sonucunda elde edilen mikropartiküllerin homojen dağılmış ve küresel formda olduğu, ancak partikül yüzeyinde delikli yapıların olduğu görülmektedir. Brunner ve arkadaşlarının yaptığı bir çalışmada retinoik asit yüklü % 1 PBAT ile hazırlanmış mikropartiküllerin açık gözenekli ve pürüzlü bir morfolojik yapıya sahip olduğu rapor edilmiştir. Yapılan tez çalışmasında üretilen kurkumin yüklü PBAT mikropartiküllerin düzgün küresel morfolojide olduğu görülmektedir. Şekil 4.4'te ilaç yüklemesi sonucunda elde edilen nanopartiküllerin de homojen dağılmış ve küresel formda olduğu SEM görüntülerinden açıkça görülmektedir. Ayrıca hem mikropartikül hem nanopartiküller için ilaç yüklemesi işleminin partikül boyutunda artışa yol açtığı bulunmuştur. Elde edilen bu sonuçlar literatürde hazırlanan ilaç yüklenmiş mikro ve nanopartiküller ile uyumludur [134].



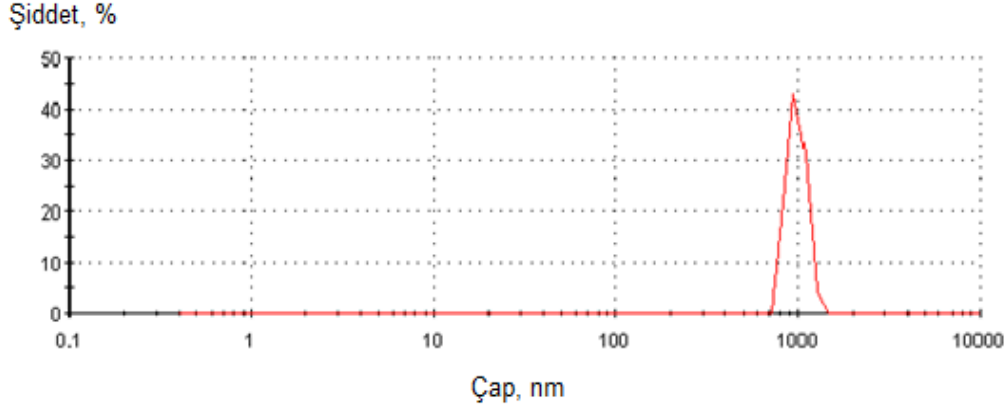


**Şekil 4.4.** Kurkumin yüklü PBAT mikropartiküllerin SEM görüntüleri. (D, ortalama çap değerini ifade etmektedir.)

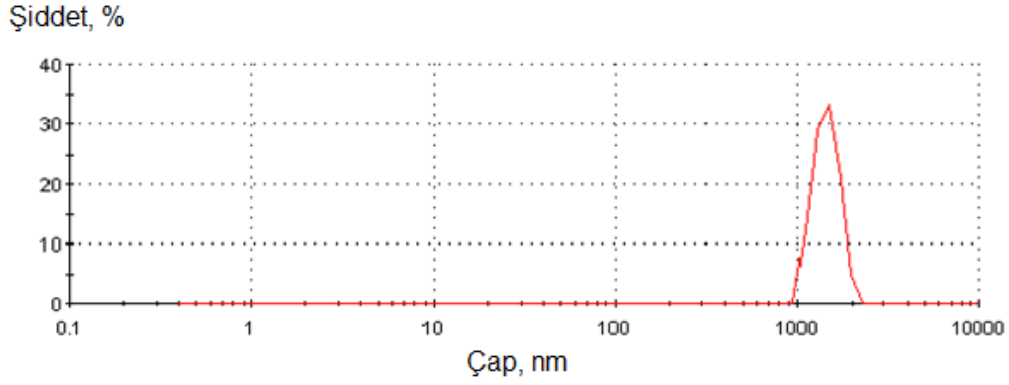
#### 4.1.1.2. Dinamik Işık Saçılım Analizi

Elde edilen SEM fotoğrafları kullanılarak ImageJ programında partikül boyutlarının belirlenmesinin ardından seçilen partiküllerin dinamik ışık saçılım analizi ile boy ve boy dağılımları incelenmiştir. Şekil 4.5, Şekil 4.6, Şekil 4.7 ve Şekil 4.8'de görüldüğü gibi seçilen partiküllerin çapları sırasıyla PBAT mikropartiküller için 0.99 µm, kurkumin yüklü PBAT mikropartiküller için 1.45 µm, PBAT nanopartiküller için 384 nm ve kurkumin yüklü PBAT nanopartiküller için ise 531 nm olarak bulunmuştur. Tüm partiküller için Çizelge 4.4'te verilen pik genişliği (width) değerleri hazırlanan partiküllerin homojen boyut dağılımında üretildiğini göstermektedir. Elde edilen sonuçlar SEM analizi sonuçları ile de uyumluluk göstermektedir.

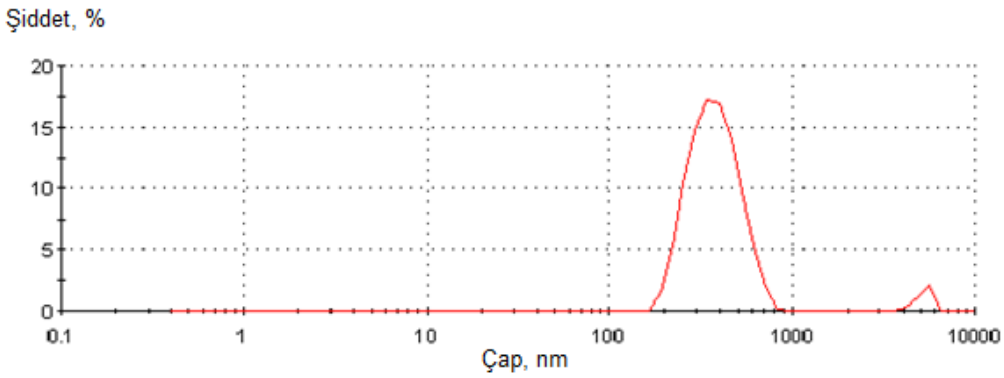




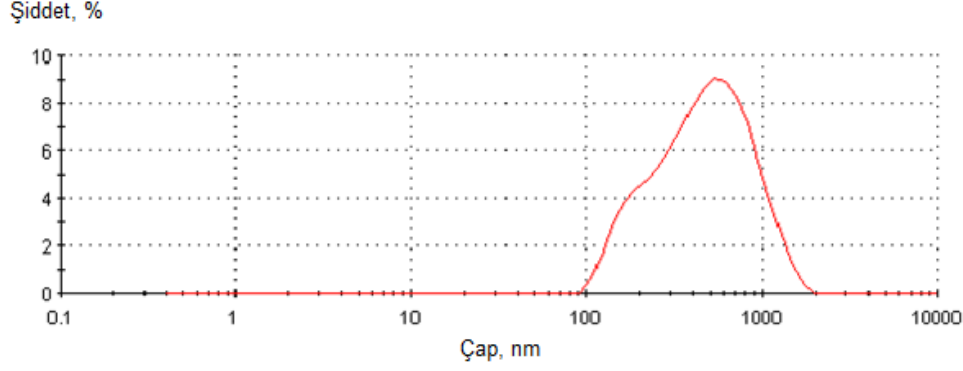
**Şekil 4.5.** Kurkumin yüklü olmayan PBAT mikropartiküllerin DLS analizine ait boy ve boy dağılımları.



**Şekil 4.6.** Kurkumin yüklü PBAT mikropartiküllerin DLS analizine ait boy ve boy dağılımları.



**Şekil 4.7.** Kurkumin yüklü olmayan PBAT nanopartiküllerin DLS analizine ait boy ve boy dağılımları.



**Şekil 4.8.** Kurkumin yüklü PBAT nanopartiküllerin DLS analizine ait boy ve boy dağılımları.

**Çizelge 4.4.** Partiküllerin DLS ve SEM analizleri ile elde edilen boy ve boy dağılımlarının karşılaştırılması.

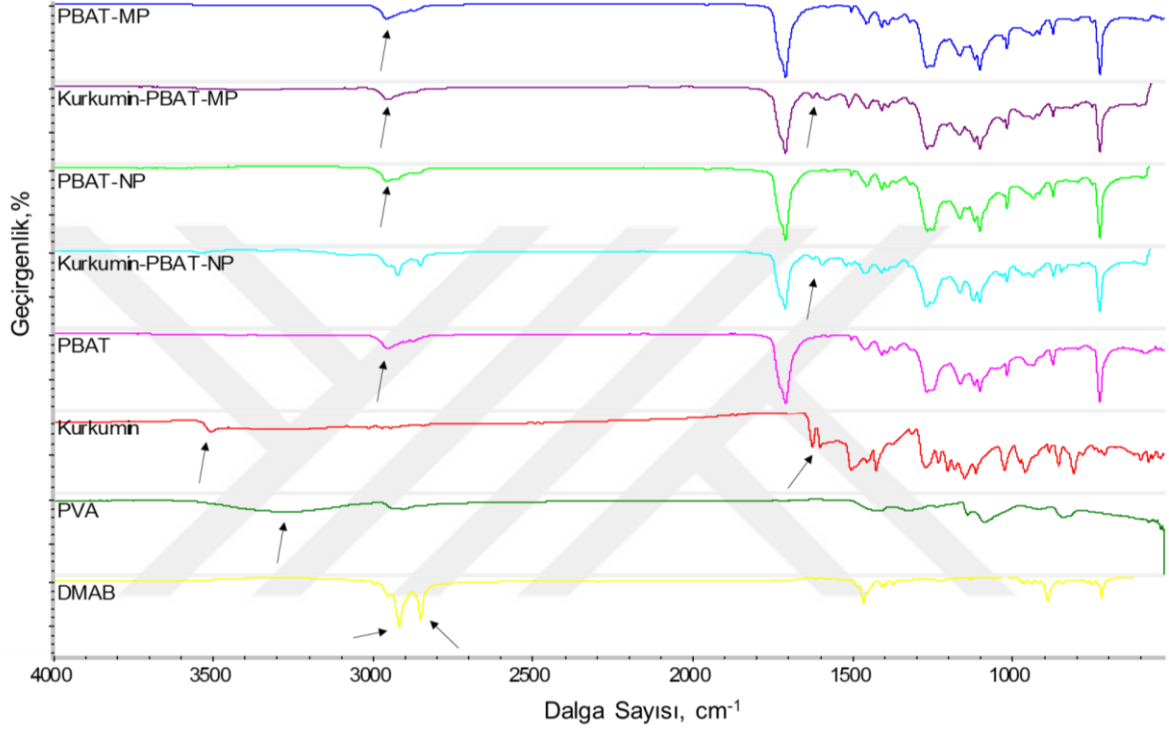
Deney Grupları	Ortalama çap, $\mu\text{m}$	Pik genişliği	SEM, $\mu\text{m}$
Kurkumin yüklü olmayan PBAT mikropartiküller	0.99	1	$1.05 \pm 0.53$
Kurkumin yüklü PBAT mikropartiküller	1.45	0.7	$1.22 \pm 0.44$
Kurkumin yüklü olmayan PBAT nanopartiküller	0.38	3	$0.38 \pm 0.18$
Kurkumin yüklü PBAT nanopartiküller	0.53	1.6	$0.39 \pm 0.17$

#### 4.1.2. Fourier Dönüşümlü Kızılötesi Spektroskopisi (FTIR) Analizi

PBAT, kurkumin, kurkumin yüklü olan ve olmayan PBAT mikro ve nanopartiküllerin kimyasal yapılarının incelenmesi amacı ile gerçekleştirilen FTIR analizinden elde edilen sonuçlar Şekil 4.9'da gösterilmiştir. Spektrumda PBAT polimerinin karakteristik ester grubuna ve aromatik-alifatik ester gruplarının O=C-O-C gerilimlerine ait pikler sırasıyla  $1709 \text{ cm}^{-1}$  ve  $1267 \text{ cm}^{-1} - 1165 \text{ cm}^{-1}$  dalga sayılarında görülmektedir [135]. Alifatik ve aromatik grupların PBAT polimerinin yapısında yer aldığı bu pikler ile desteklenmektedir. Fenol gruplarının O-H gerilimlerine ait  $3254 \text{ cm}^{-1}$  dalga sayısındaki pikler ve aromatik C=C gerilimlerine ait  $1400-1600 \text{ cm}^{-1}$  dalga sayısındaki pikler kurkumine ait piklerdir [136]. PBAT mikropartikül ve nanopartiküllerinin spektrumlarında PBAT'ın ester ve aromatik-

alifatik ester gruplarına ait karakteristik pikler görülmektedir. Kurkumin yüklü PBAT nanopartiküllere ait FTIR spektrumunda 2940  $\text{cm}^{-1}$  -2835  $\text{cm}^{-1}$  aralığında alifatik C-H gerlimlerine ait DMAB'a ait pikler görülmektedir.

Kurkumin yüklü PBAT mikropartikül ve nanopartiküllerine ait FTIR spektrumlarında kurkumine ait piklerin mevcudiyeti kurkumin yükleme işleminin PBAT mikropartikül ve nanopartiküller kullanılarak başarı ile gerçekleştirildiğini göstermektedir.

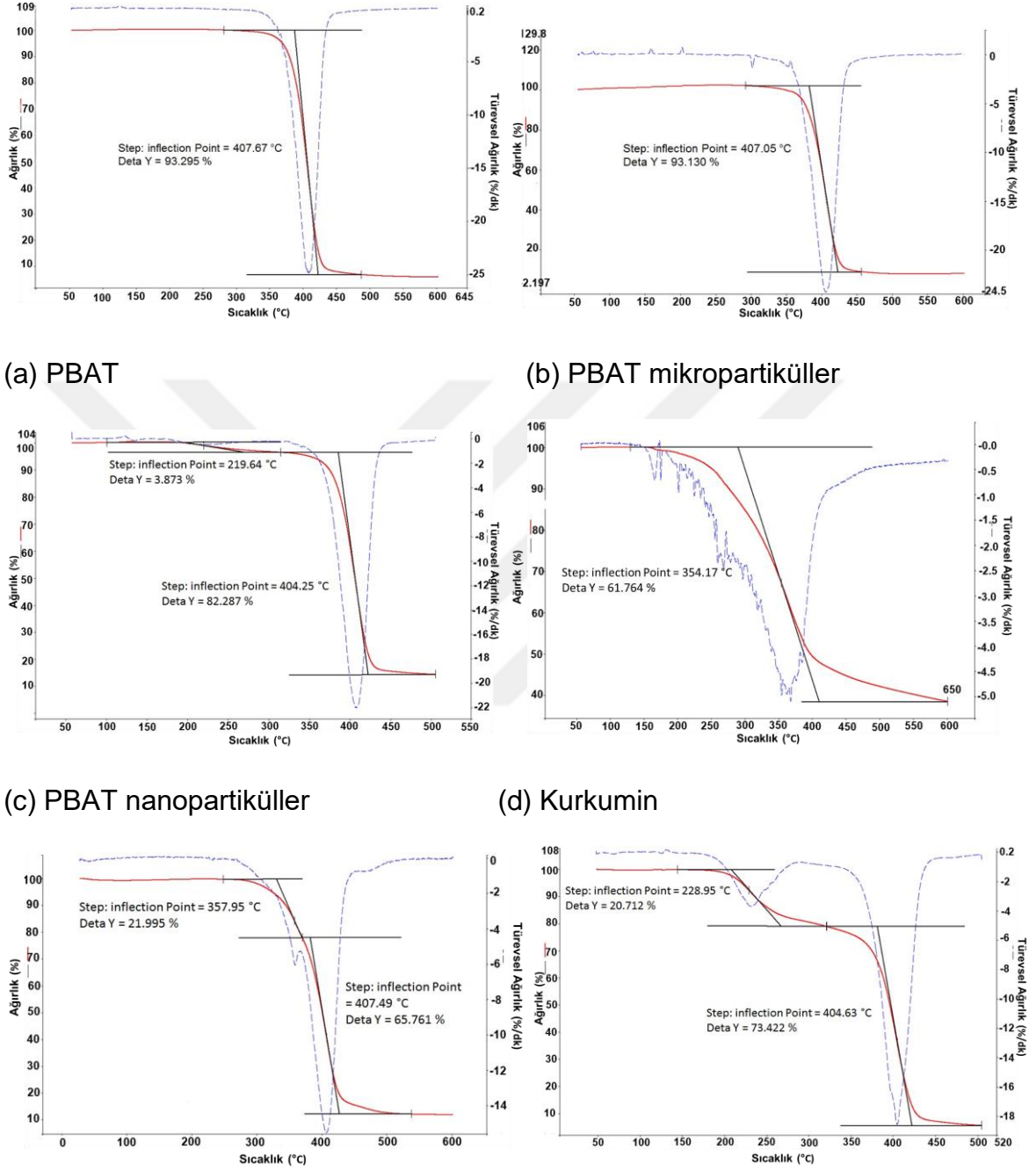


**Şekil 4.9.** Kurkumin yüklü ve yüklü olmayan PBAT mikro ve nanopartiküller ile PBAT, kurkumin, PVA ve DMAB'ye ait FTIR spektrumları. (NP: nanopartikül, MP: mikropartikül)

#### 4.1.3. Termogravimetrik-Diferensiyal Termal Analiz (TG-DTA)

Şekil 4.10'de PBAT, PBAT mikro ve nanopartiküller, kurkumin ve kurkumin yüklü PBAT mikro ve nanopartiküllere ait TGA termogramları bulunmaktadır. PBAT ve PBAT mikropartiküllerin %93'ü 407 °C'ta ve kurkumin ise 354°C'ta bozunmaya uğramıştı. PBAT nanopartiküllerin TGA termogramı iki basamklıdır. İlk olarak yaklaşık %3'ü 219°C'de ve % 82'si 404°C'ta bozunmuştur. PBAT nanopartiküllerin termal kararlılıklarının PBAT mikropartiküllere oldukça yakın değerlerde olduğu görülmektedir. Kurkumin yüklü PBAT mikropartiküller ile nanopartiküllerin termal bozunma sıcaklıkları sırasıyla 357°C (%21) ile 407°C (%65) ve 228°C (%20) ile

404°C (%73) olarak bulunmuştur. Termal bozunma davranışlarında gözlenen değişiklikler polimerik taşıyıcı olan PBAT ile kurkumin arasındaki etkileşimlerin varlığına işaret ederek enkapsülasyon işleminin gerçekleştiğini göstermektedir.

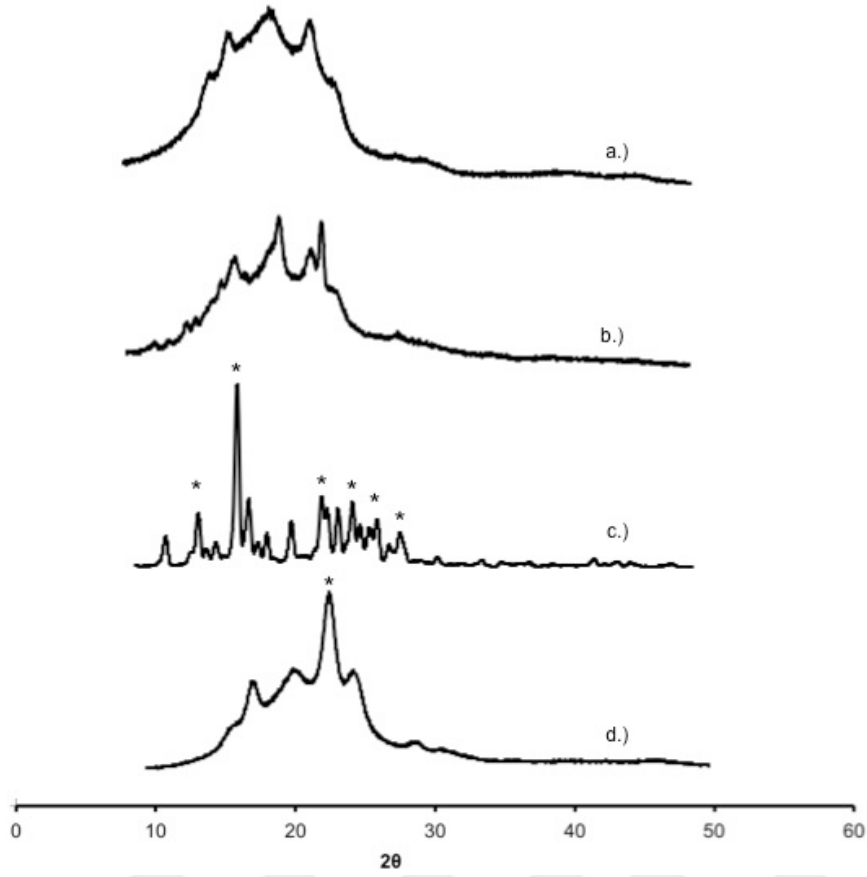


(e) Kurkumin yüklü PBAT mikropartiküller (f) Kurkumin yüklü PBAT nanopartiküller  
**Şekil 4.10.** PBAT (a), PBAT mikropartiküller (b), PBAT nanopartiküller (c), kurkumin (d), Kurkumin yüklü PBAT mikropartiküller (e) ve Kurkumin yüklü PBAT nanopartiküllere (f) ait termogravimetrik analiz sonuçları.

#### 4.1.4. X Işını Kırınımı (XRD) Analizi

Polimerik matriks içinde enkapsüle olmuş kurkuminin düzensiz formda olması ilaç moleküllerinin taşıyıcı yapıdan difüzyonu için oldukça önemlidir. İlaç taşıyıcı sistem içinde ilaç moleküllerinin kristalin formda bulunması ilacın polimerik matriksten salım ortamına aktarımını engellemekte ve salım profili düzensiz olmaktadır [137]. Buna karşın ilaç moleküllerinin amorf ya da düzensiz-kristalin yapıda bulunması polimerik matriks boyunca ilaç moleküllerinin difüzyonunu kolaylaştırmakta ve enkapsüle olan ilacın uzun süreli salımına olanak tanımaktadır [138].

Salımı yapılacak olan ilacın, taşıyıcı sistem içinde kristalin formda olup olmadığının aydınlatılması için XRD analizleri kullanılmaktadır. Şekil 4.11'de PBAT, kurkumin, kurkumin yüklü PBAT mikro ve nanopartiküllere ait XRD desenleri görülmektedir. Kurkumin ve PBAT'a ait pikler sırasıyla 14.5, 17.3, 23.8, 25.6, 27.4 ve 29.0° ve 21.25° da görülmektedir. Bu pikler her iki kimyasal maddenin kristalin yapıda olduğunu göstermektedir [139, 140]. Kurkumin yüklü mikro ve nanopartiküllere ait XRD desenlerinde daha geniş ve şiddeti daha az olan pikler bulunmaktadır ve kurkumine ait keskin pikler görülmemektedir. Dolayısıyla kurkumin yüklü mikro ve nanopartiküllerin yapısında kristalin formda kurkuminin bulunmadığı ve partikül yapısında kapsüle olmuş kurkumin moleküllerinin amorf, düzensiz kristalin fazı ya da katı çözelti durumunda olduğu sonucuna varılmaktadır [141]. Elde edilen sonuçlar PBAT polimer zincirleri ile kurkumin arasında enkapsülasyon sonunda moleküler arası etkileşimlerin olduğunu göstermektedir [116].



**Şekil 4.11.** Kurkumin yüklü PBAT a) mikro ve b) nanopartiküller, c) kurkumin d) PBAT'a ait XRD desenleri.

#### 4.1.5. Kurkumin Yüklü PBAT Mikro ve Nanopartiküllerin Enkapsülasyon Verimlerinin Hesaplanması

İlaç salım çalışmalarında uzun süreli salımı yapılacak olan ilacın taşıyıcı sistem içinde enkapsülasyon miktarı sistemin uygulanabilirliği açısından önem arz etmektedir. Tez çalışmasında hazırlanan PBAT mikro ve nanopartiküllere ilaç olarak seçilen kurkuminin enkapsülasyon verimi Bölüm 3.4'te ayrıntılı olarak anlatıldığı gibi hesaplanmıştır. Bu yöntemde PBAT mikro ve nanopartiküller ilaç yükleme işlemi sonrasında uygun çözücü ile çözülmüştür ve çözelti ortamındaki ilaç derişimi spektrofotometrik olarak belirlenmiştir. Çizelge 4.5'te elde edilen sonuçlar verilmiştir. Bu sonuçlar PBAT nanopartiküllerin kurkumin enkapsülasyon veriminin mikropartiküllere göre daha yüksek olduğunu göstermektedir. Bu sonuçlar literatürdeki birçok çalışma ile uyumludur [142, 143].

**Çizelge 4.5.** Kurkumin yüklü PBAT partiküllere ait enkapsülasyon verimleri.

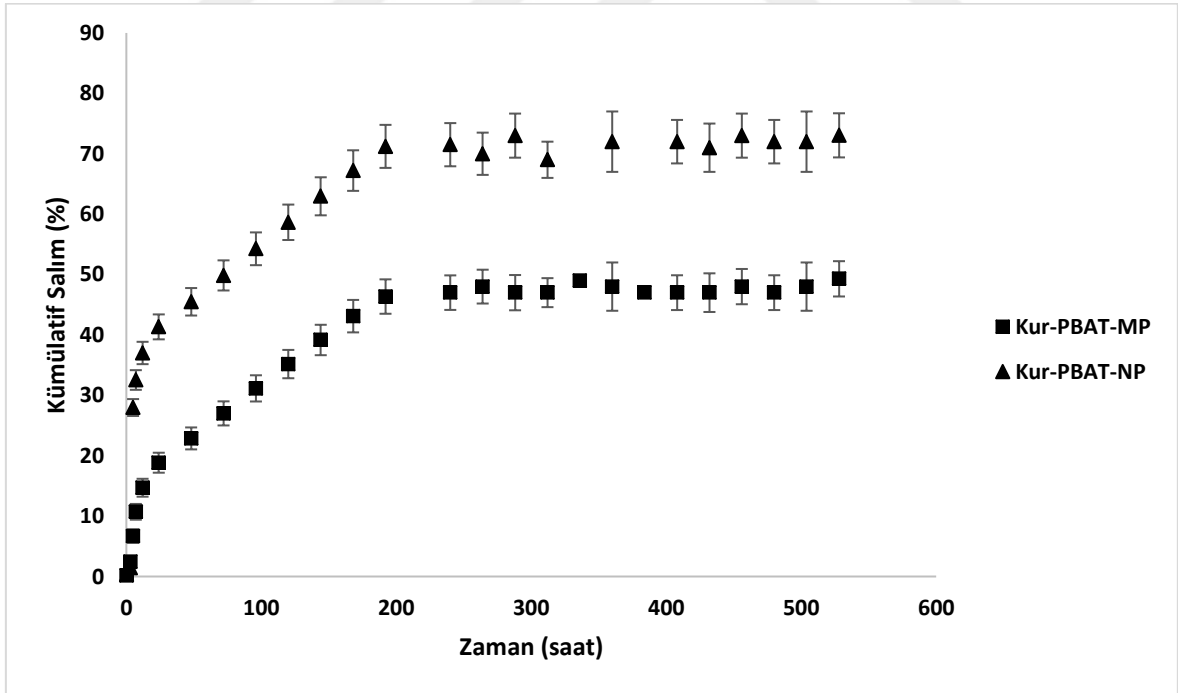
Deney Grupları	Enkapsülasyon verimi, %
Kurkumin yüklü PBAT mikropartiküller	80 ± 5
Kurkumin yüklü PBAT nanopartiküller	90 ± 3

#### **4.2. Kurkumin Yüklü PBAT Mikro ve Nanopartiküllerden Kurkumin Salım Çalışmaları ve Salım Kinetiklerinin İncelenmesi**

Kurkumin salım çalışmaları üç paralel örnek ile yürütülmüştür. Salım sonuçları sıfıncı derece, birinci derece, Higuchi ve Hixson-Crowell olmak üzere dört farklı salım kinetik modeline uygulanmıştır. Regresyon katsayıları göz önüne alınarak kurkumin yüklü PBAT mikro ve nanopartiküllerin salım davranışlarının uygun olduğu kinetik model belirlenmiştir.

Kurkumin yüklü PBAT mikro ve nanopartiküllerin kurkumin salım grafiği Şekil 4.12'te gösterildiği gibidir. PBAT nanopartiküllerde ilk 5 saatte % 27 kurkumin salımı gözlenirken mikropartiküllerde ilk 7 saatte %10 kurkumin salımı görülmektedir. PBAT mikrokapsüllerden hidrofobik bir molekül olan retinoik asit salımının gerçekleştirildiği bir çalışmada ilk gün % 10 retinoik asit salımının gerçekleştiği rapor edilmiştir. Ayrıca ilk hafta boyunca % 25 retinoik asit salımı gerçekleşerek yavaş bir salım gözlenmiş ve yaklaşık 14. güne kadar lineer bir salım gerçekleşmiştir [84]. Tez çalışması kapsamında elde edilen PBAT mikropartiküllerden kurkumin salımına ait sonuçlar, ilgili literatürde çalışılan PBAT mikropartiküllerin salım davranışları ile benzerlik göstermektedir. PLGA nanopartiküllerden kurkumin salımının gerçekleştirildiği bir çalışmaya göre ilk 24 saatte % 40 oranında kurkumin salınmıştır [144]. PLGA mikropartiküllerden kurkumin salımının gerçekleştirildiği başka bir çalışmada ise ilk 24 saatte % 30 oranında kurkumin salındığı rapor edilmiştir [145]. İlk gün içinde PBAT mikro ve nanopartiküllerden gerçekleşen kurkumin salım miktarının, literatürde çalışılan kurkumin salımının yapıldığı partiküler ilaç salım sistemleri ile uyumluluk gösterdiği görülmektedir.

Kurkumin yüklü PBAT mikro ve nanopartiküllerden kurkuminin 22 günde sırasıyla %49 ve %73 oranında salındığı görülmektedir. Küçük boyuttaki nanopartiküllerin geniş yüzey alanına sahip olması ve partikül yüzeyine yakın bölgelere yüklenen kurkumin miktarının fazla olması nedeniyle PBAT nanopartiküllerden gerçekleşen kurkumin salımı PBAT mikropartiküllere göre daha hızlı olmuştur [33]. Ayrıca her iki partikül için de 8 günde denge profiline ulaşıldığı belirlenmiştir. Literatürde kitosan-PCL nanopartiküllerden kurkumin salımının gerçekleştirildiği bir çalışmada 5 günde %70 oranında kurkumin salımı gerçekleşmiştir [146]. PCL-PEG-PCL nanopartiküllerden gerçekleştirilen kurkumin salımının 4 günde % 65 olduğu belirlenmiştir [147]. Elde edilen sonuçlar doğrultusunda PBAT mikro ve nanopartiküllerden kurkumin salımının literatürde yapılan kurkumin salım sistemlerine göre oldukça yavaş ve uzun süreli gerçekleştiği görülmektedir. Bu durum PBAT ve kurkuminin hidrofobik özellikte olması nedeniyle kurkumin enkapsülasyonunun partikül yüzeyinde daha az, partikül içinde daha fazla miktarda gerçekleşmesinden kaynaklanmaktadır.



**Şekil 4.12.** Kurkumin yüklü PBAT mikro ve nanopartiküllerden kurkuminin % kümülatif salımı. (NP : nanopartikül, MP: mikropartikül)



Çizelge 4.6'da kurkumin yüklü PBAT mikro ve nanopartiküllerden kurkuminin salımı sıfıncı derece, birinci derece, Higuchi ve Hixson-Crowell olmak üzere dört farklı salım kinetik modeli için uygulanmıştır. Regresyon katsayıları incelendiğinde her iki partikül türünün de Higuchi salım modeline daha uygun olduğu görülmektedir. Bu durum partiküllerden önce lineer bir kurkumin salımının gerçekleştiğini ardından belli bir süre sonra denge profiline ulaşıldığını göstermektedir. Yüzeye yakın yüklenen kurkumin miktarının hızla salınmasının ardından partiküllerin içine yüklenen kurkumin salımının gerçekleştiği ve belli bir denge profilinde salındığı görülmektedir.

**Çizelge 4.6.** Kurkumin yüklü PBAT mikro ve nanopartiküllerin salım kinetikleri.

Deney Grupları	Salım Kinetiği Modelleri							
	Sıfıncı Derece		Birinci Derece		Higuchi		Hixson-Crowell	
	$R^2$	$K_0$ ( $\mu\text{g sa}^{-1}$ )	$R^2$	$K_1$ ( $\text{sa}^{-1}$ )	$R^2$	$K_H$ ( $\mu\text{g sa}^{-1/2}$ )	$R^2$	$K_{HC}$ ( $\text{sa}^{-1/3}$ )
Kurkumin yüklü PBAT mikropartiküller	0.72	0.0782	0.38	0.0019	0.90	2.13	0.72	0.026
Kurkumin yüklü PBAT nanopartiküller	0.61	0.0946	0.26	0.0016	0.80	2.67	0.24	0.024

### 4.3. Hücre Kültür Çalışmaları

Yapılan hücre kültür çalışmalarında kurkumin yüklü olan ve olmayan PBAT mikro ve nanopartiküllerin sitotoksitelerinin belirlenmesi için MC3T3-E1 insan kemik öncül hücreleri ve kanser hücrelerine etkilerinin belirlenmesi amacıyla insan osteosarkoma hücre hattı, MG-63 kullanılmıştır. Kurkumin yüklü olan ve olmayan PBAT mikro ve nanopartiküllerin etkileri incelenmeden önce kurkuminin inhibitör konsantrasyonu belirlenmiştir. Ardından kurkumin inhibitör konsantrasyonları göz önüne alınarak partikül uygulaması gerçekleştirilmiştir. Hücre canlılıkları MTT (3-[4,5-dimetiltiazol-2-il]-difenilterazolyum bromür) analizi ile belirlenmiştir. MTT analizinin yanında hücre morfolojisi ve canlılığı optik mikroskop ile takip edilmiştir. Hücre alım çalışmaları F-Aktin/DAPI boyama ile incelenmiştir. Canlı-ölü hücre analizi ile partikül ve kurkumin uygulamasının hücre canlılığına etkileri gözlenmiştir. Son olarak hücre döngüsü analizi ile kurkumin yüklü partiküllerin hücre döngüsüne etki ettiği fazlar incelenmiştir.

### 4.3.1. İnhibitör Konsantrasyonunun Belirlenmesi

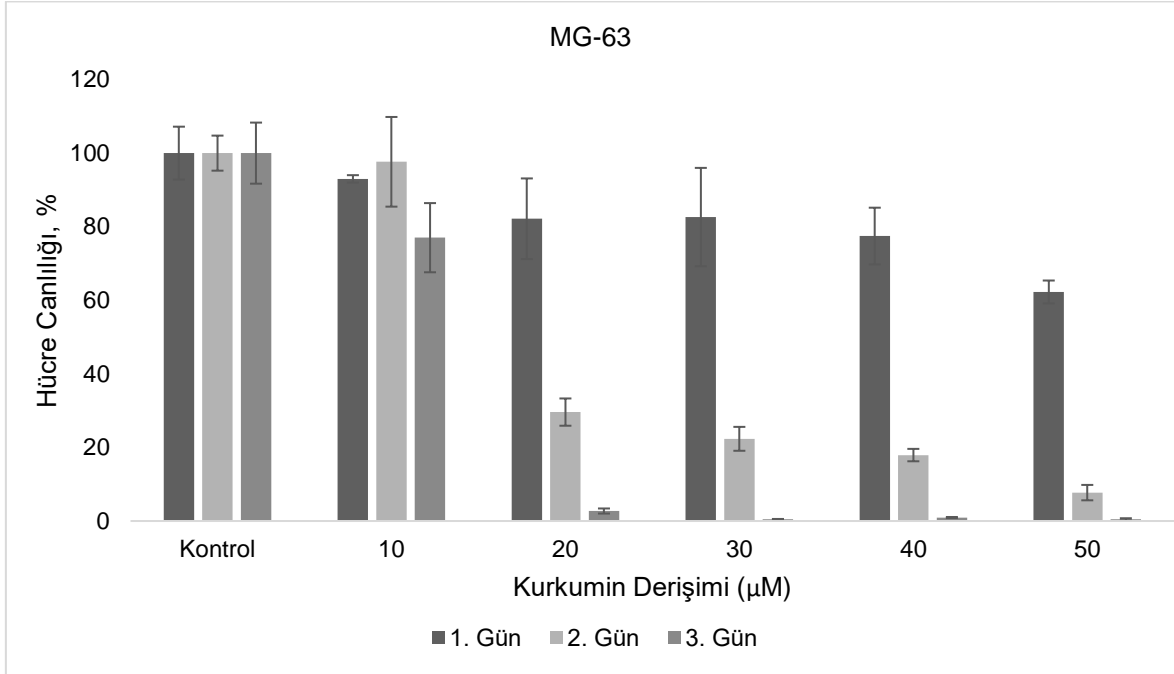
#### 4.3.1.1. Kurkuminin İnhibitör Konsantrasyonunun Belirlenmesi

Kurkumin inhibitör konsantrasyonunun belirlenmesi amacıyla MG-63 ve MC3T3-E1 hücrelerine 3 gün boyunca 0, 10, 20, 30, 40 ve 50  $\mu\text{M}$  kurkumin derişimleri uygulanmış ve hücre canlılıkları MTT analizi ile belirlenmiştir. Her iki hücre tipi için de  $2.5 \times 10^4$  hücre/ $\text{cm}^2$  hücre yoğunluğu kullanılarak uygulama gerçekleştirilmiştir.

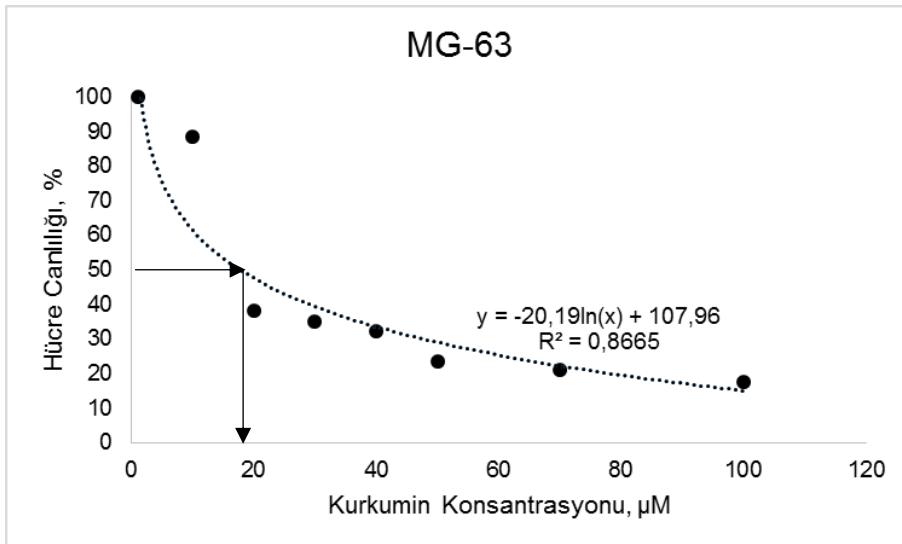
MG-63 kanser hücreleri için %50 hücre canlılığının elde edildiği kurkumin derişimi kurkumin inhibitör konsantrasyonunu ifade etmektedir. Şekil 4.13'te MTT sonuçları doğrultusunda elde edilen % hücre canlılıklarının zamana karşı değişiminin yeraldığı grafikte de görüldü gibi kurkumin derişimi arttıkça MG-63 hücrelerinin canlılığı kontrol grubuna göre önemli ölçüde azalmaktadır. 10  $\mu\text{M}$  kurkumin derişiminde daha az bir değişim olmakla birlikte diğer kurkumin derişimlerinde 2. günden itibaren MG-63 hücrelerinin inhibe olduğu görülmektedir.

Kurkumin inhibitör konsantrasyonu için % 50 canlılığın belirlenmesi amacıyla Şekil 4.14'te de görüldüğü gibi farklı kurkumin konsantrasyonlarındaki MG-63 hücrelerinin % canlılıkları grafiğe geçirilmiştir. Grafikte MG-63 hücrelerine ait % hücre canlılıkları MTT analizi ile hesaplanan 3 güne ait % hücre canlılıklarının ortalamasını ifade etmektedir. Şekil 4.14'de de görülen grafikten elde edilen denklemde % hücre canlılığını temsil eden "y" ifadesi yerine 50 yazılıp denklem çözüldüğünde "x" ifadesi kurkumin konsantrasyonunu vermektedir. Denklemden %50 MG-63 hücre canlılığına ulaşılan kurkumin derişimi 17  $\mu\text{M}$  olarak belirlenmiştir. Buna göre MG-63 hücreleri üzerindeki kurkumin inhibitör konsantrasyonu 17  $\mu\text{M}$ 'dır. Wang ve arkadaşlarına ait 72 saatlik kurkumin uygulamasının yedi farklı osteosarkoma hücre hattında gerçekleştirildiği çalışmada inhibitör konsantrasyon MG-63 hücre hattı için 19.1  $\mu\text{M}$  bulunurken, Li ve arkadaşlarının üç farklı osteosarkoma hücre hattı ile yaptığı çalışmada 72 saatlik uygulamanın sonunda MG-63 hücreleri için inhibitör konsantrasyon  $22.7 \pm 1.70$   $\mu\text{M}$  olarak rapor edilmiştir [148, 149]. MG-63 hücreleri üzerinde kurkumin sitotoksitesinin incelendiği bir çalışmada 24 saat kurkumin uygulamasının ardından 20  $\mu\text{M}$  derişimindeki kurkumin inhibitör konsantrasyon olarak belirlenmiştir [150]. Kurkuminin lipozomal partiküllere enkapsülasyonunun gerçekleştirildiği bir çalışmada MG-63 hücrelerine 48 saat boyunca uygulanan

kurkuminin inhibitör konsantrasyonu 23.39  $\mu\text{M}$  olarak belirlenmiştir [151]. Tez çalışması kapsamında elde edilen kurkumin inhibitör konsantrasyonu ilgili literatürde yer alan çalışmalar ile uyumluluk göstermektedir.



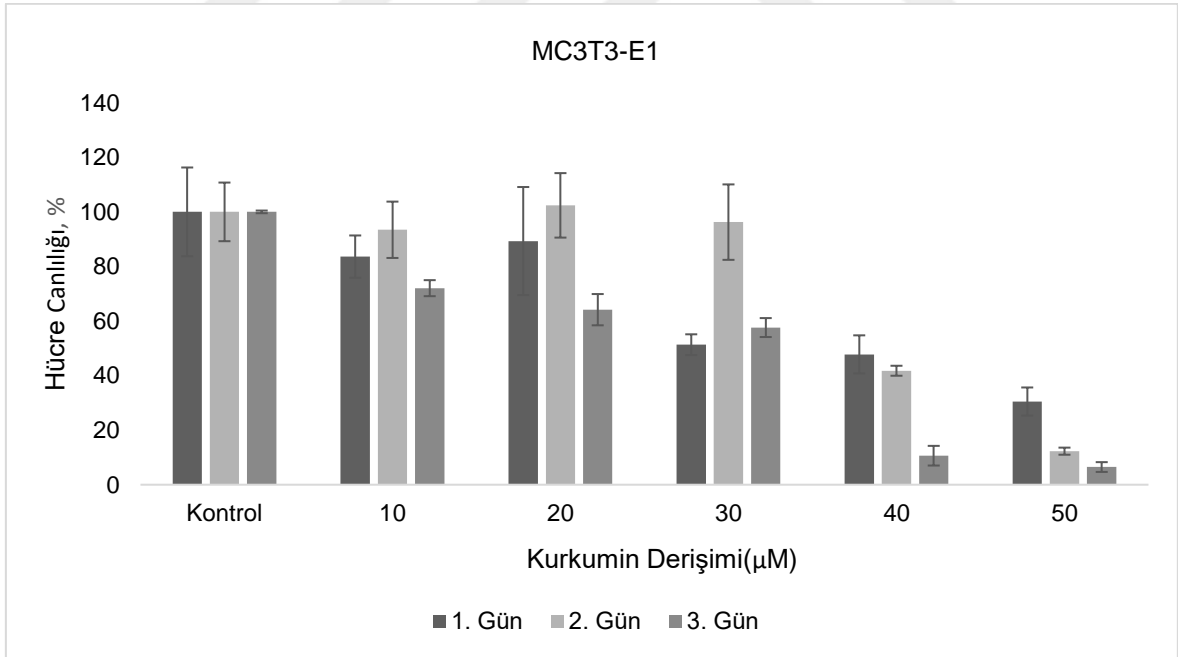
**Şekil 4.13.** Farklı kurkumin konsantrasyonlarına karşılık gelen MG-63 hücrelerine ait % hücre canlılığı.



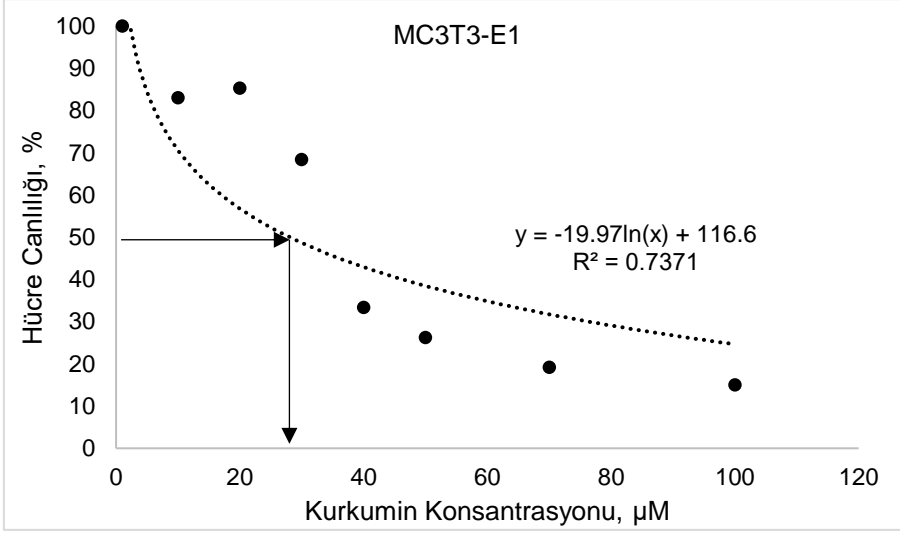
**Şekil 4.14.** Kurkumin inhibitör konsantrasyonunun belirlenmesi.

Kurkumin inhibitör konsantrasyonunun belirlenmesinin ardından MC3T3-E1 hücrelerine 3 gün boyunca 0, 10, 20, 30, 40 ve 50  $\mu\text{M}$  arasındaki kurkumin

derişimleri uygulanmış ve belirlenen inhibitör değerinin MC3T3-E1 kemik öncül hücrelerinin canlılığına olan etkisi incelenmiştir. MTT sonuçları doğrultusunda elde edilen farklı kurkumin derişimlerinin MC3T3-E1 hücrelerinin % hücre canlılığına etkisi Şekil 4.15'te görülmektedir. Kurkumin uygulamasının ilk günü, tüm derişimlere karşılık gelen % hücre canlılığında kontrol grubuna göre azalma görülmektedir. Bunun yanında 10-30  $\mu\text{M}$  aralığındaki kurkumin derişimlerinde kontrol grubuna göre 2. güne ait % hücre canlılıklarında 1. güne göre artış görülmektedir. Kurkuminin, embriyonik nöral propenitor hücreleri üzerinde 2 günlük kültür süresince uygulandığı bir çalışmada 2. günde 500 nM derişimindeki kurkuminin hücre proliferasyonunu arttırdığı rapor edilmiştir [152]. MG-63 hücreleri için belirlenen kurkumin derişiminin MC3T3-E1 hücreleri üzerindeki etkisini belirlemek için Şekil 4.16'de görüldüğü gibi % hücre canlılığına karşı kurkumin derişimleri grafiğe geçirilmiştir. Grafiğe göre % 50 MC3T3-E1 hücre canlılığının sağlandığı kurkumin konsantrasyonunun 28  $\mu\text{M}$  olduğu belirlenmiştir. Buna göre MG-63 hücreleri için belirlenen 17  $\mu\text{M}$  kurkumin inhibitör konsantrasyonunun MC3T3-E1 hücreleri için toksik bir etki yaratmadığı görülmektedir.

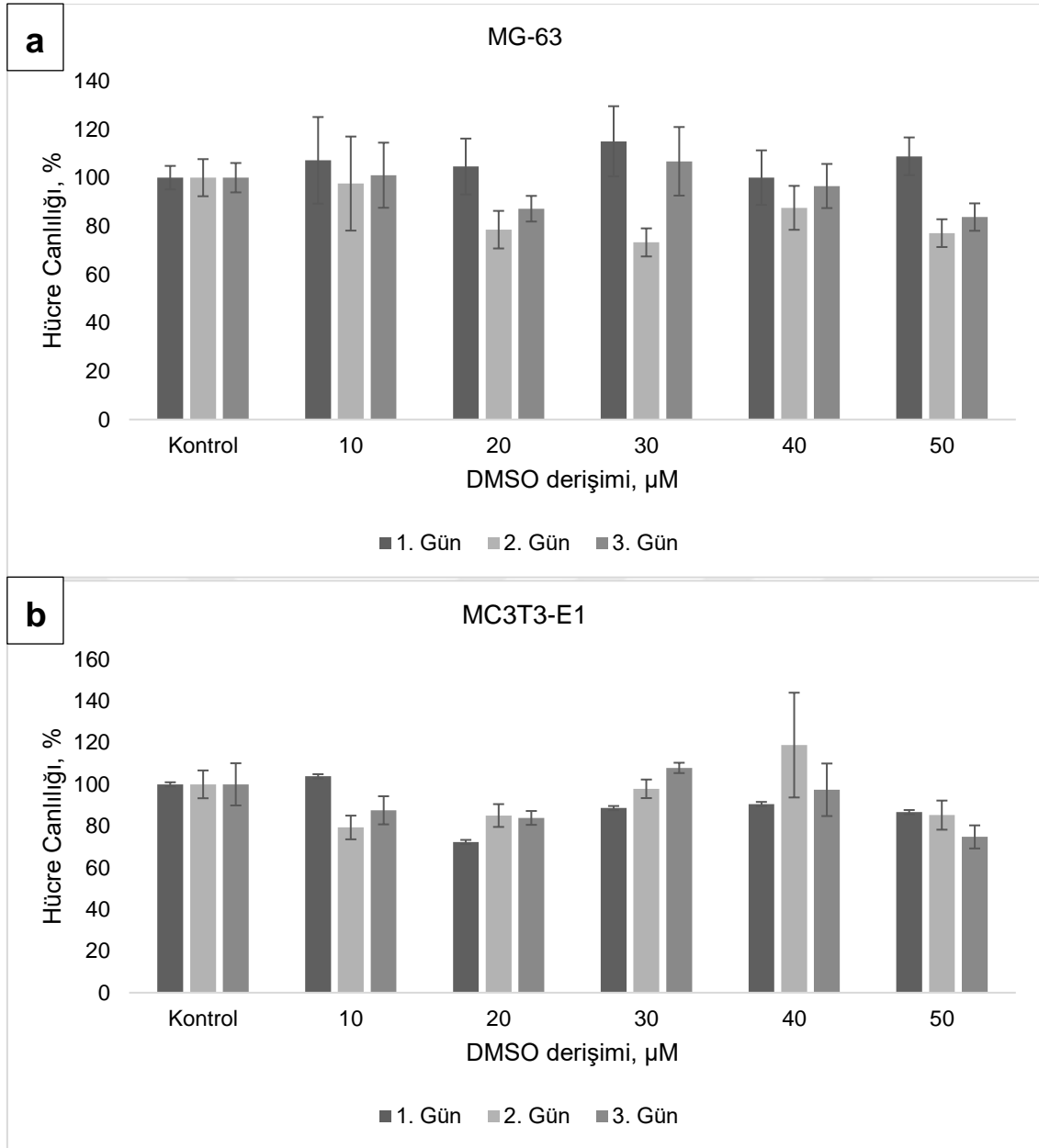


**Şekil 4.15.** Farklı kurkumin konsantrasyonlarının MC3T3-E1 hücre canlılığına etkisi.



**Şekil 4.16.** MC3T3-E1 hücrelerinde % 50 hücre canlılığının elde edildiği kurkumin konsantrasyonunun belirlenmesi.

Literatürde kurkuminin hücre canlılığına etkisinin incelendiği çalışmalarda çözücü olarak DMSO kullanılmıştır [124, 153, 154]. İlgili literatür ile benzer şekilde kurkumin inhibitör konsantrasyonunun belirlenmesi çalışmalarında kurkumin DMSO içinde çözülerek besin ortamına ilave edilmiştir. % 0.1-0.01 (v/v) arasında DMSO bulunduran besin ortamları hücrelere uygulanmıştır. DMSO'nun toksisitesinin araştırılması amacıyla farklı kurkumin konsantrasyonları için kullanılan DMSO miktarları MC3T3-E1 ve MG-63 hücrelerine uygulanmıştır. Şekil 4.17'de DMSO uygulanan MC3T3-E1 ve MG-63 hücrelerinin MTT analizi sonucu ile elde edilen % hücre canlılıkları görülmektedir. İnhibitör konsantrasyon çalışmasında kullanılan DMSO miktarları ile her iki hücre tipi için de kontrol grubuna oldukça yakın % hücre canlılıkları sağlandığı görülmektedir. Kullanılan DMSO miktarları, hem MC3T3-E1 hem de MG-63 hücreleri üzerinde herhangi bir inhibasyona neden olmamıştır.



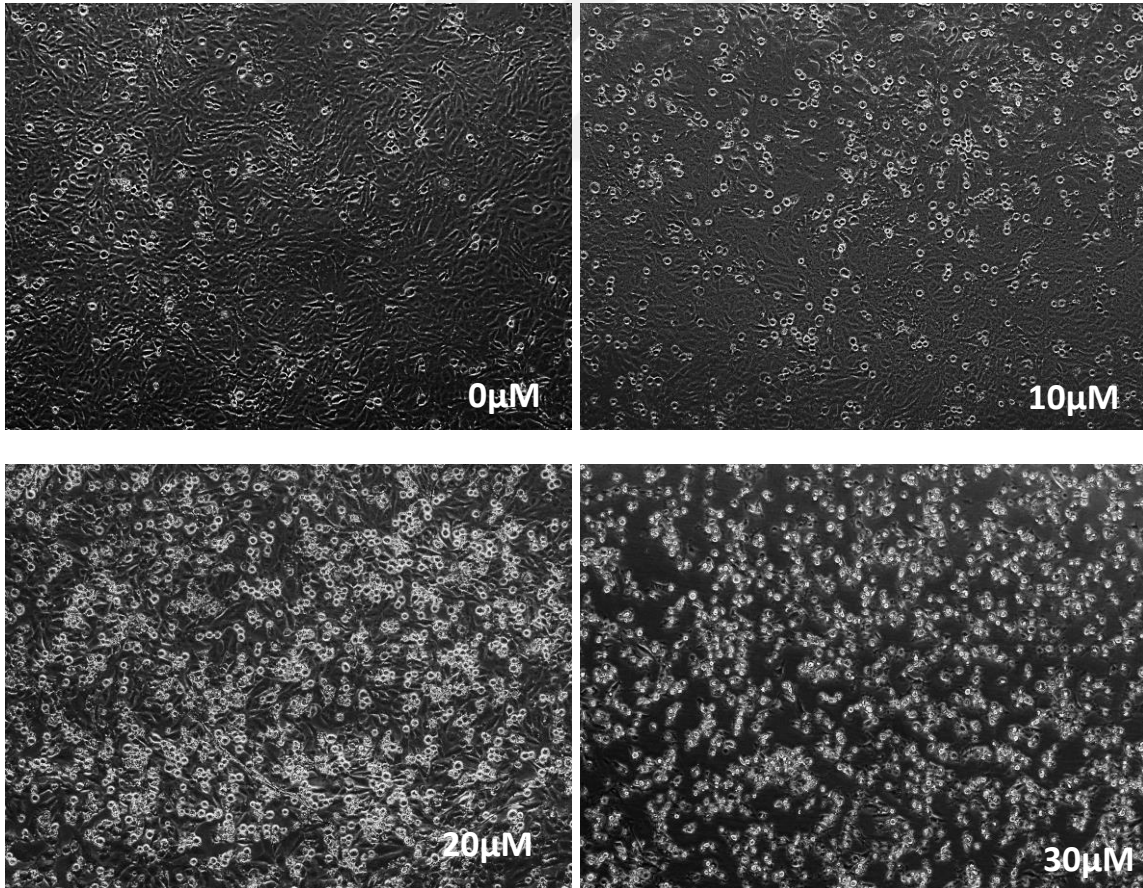
**Şekil 4.17.** Kurkuminin çözücüsü olarak kullanılan DMSO'nun MG-63, (a) ve MC3T3-E1, (b) hücrelerinin canlılığına etkisi.

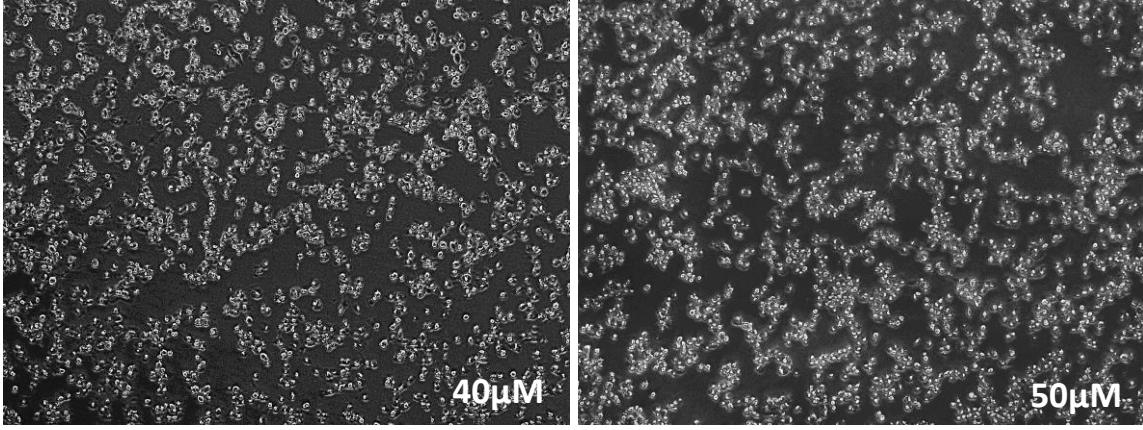
Literatürde DMSO'nun hücre canlılığı üzerindeki etkisinin incelendiği çalışmalarda % 1 (v/v)'in altındaki DMSO miktarlarının hücreler üzerinde herhangi bir toksik etkiye neden olmadığı rapor edilmiştir [155, 156]. Kurkuminin inhibitör konsantrasyonunun belirlenmesi için 5-100 µM kurkumin konsantrasyon aralığında DMSO içinde çözülerek osteosarkoma ve osteoblast hücrelerine uygulandığı bir çalışmada DMSO'nun hücreler üzerinde herhangi bir sitotoksik etkiye neden olmadığı belirlenmiştir [153].

#### 4.3.1.2. Optik Mikroskop Analizi

Kurkumin inhibitör konsantrasyonunun belirlenmesi için MG-63 ve MC3T3-E1 hücrelerine 3 gün boyunca uygulanan 0, 10, 20, 30, 40 ve 50  $\mu\text{M}$  kurkumin derişimlerinin hücre canlılığı ve morfolojisindeki etkisi optik mikroskop görüntüleri ile incelenmiştir.

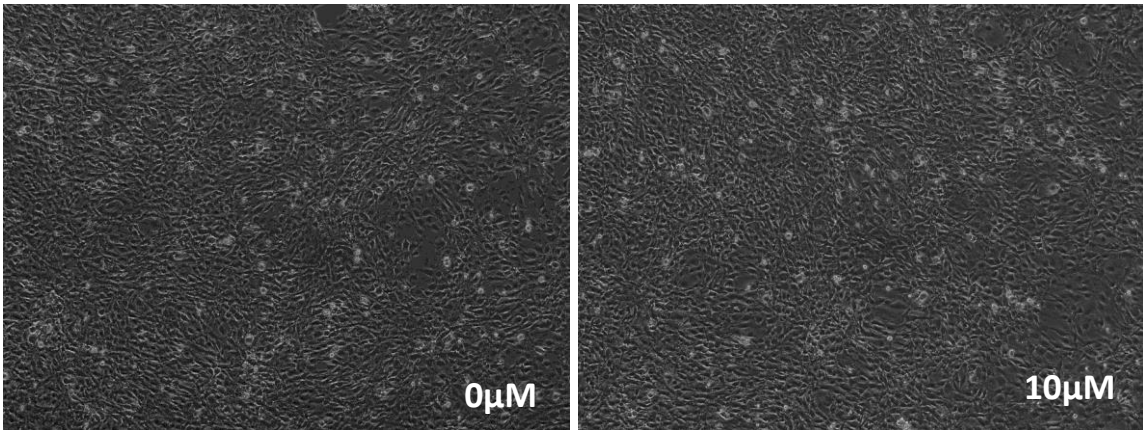
Şekil 4.18'da MG-63 hücreleri üzerindeki kurkumin uygulamasına ait 1. gün optik mikroskop fotoğrafları görülmektedir. Fibroblastik karakterdeki MG-63 hücrelerinin 24 gözlü kültür kaplarına ekildiği kontrol grubunda (0  $\mu\text{M}$ ), 3 günlük kültür süresince hücre morfolojisinin düzgün ve çoğalmasının homojen olduğu görülmektedir. Beyaz renkli küresel şekiller hücre membranı parçalanmış ölü hücreleri ifade etmektedir. Elde edilen optik mikroskop görüntülerinde, Şekil 4.13'teki MTT sonuçları doğrultusunda elde edilen % hücre canlılık değerleri ile benzer şekilde 20  $\mu\text{M}$  kurkumin derişiminden itibaren hücre canlılığında azalmaların olduğu görülmektedir.



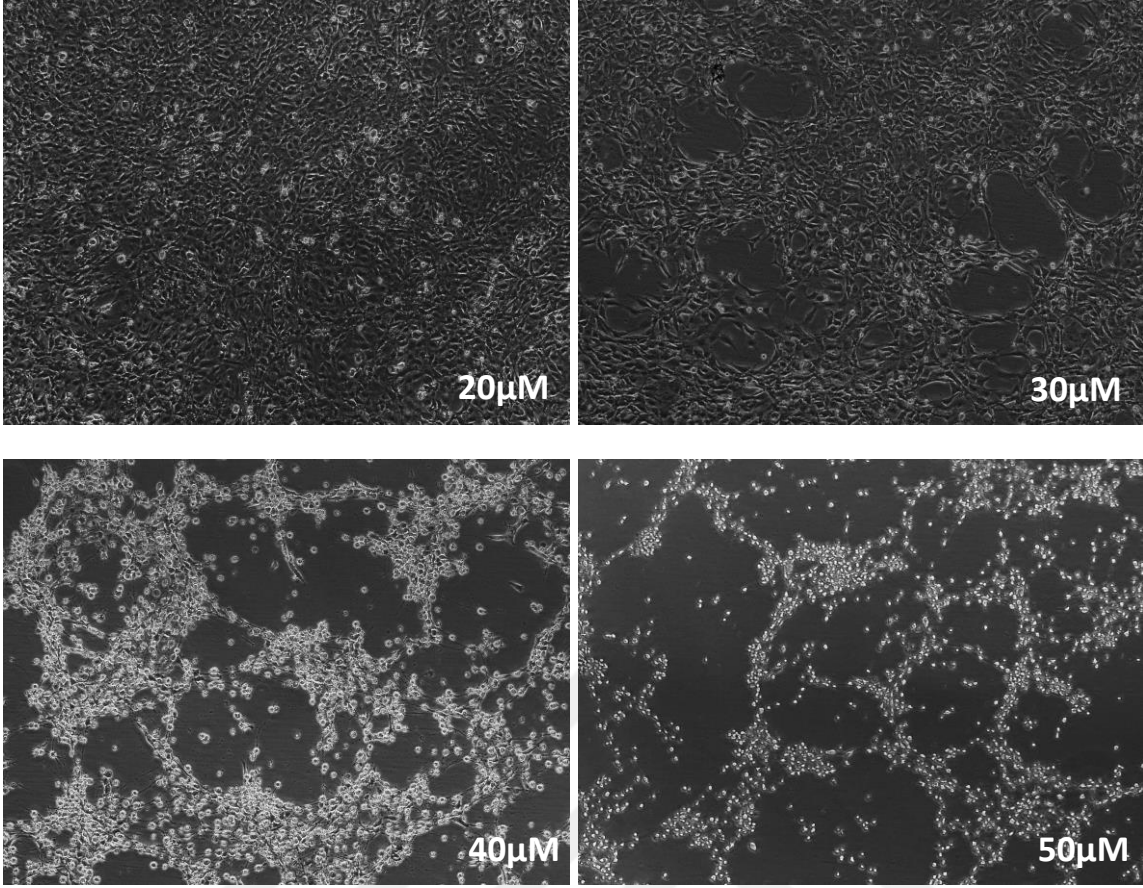


**Şekil 4.18.** Farklı kurkumin konsantrasyonlarının MG-63 hücreleri üzerindeki etkilerinin 1. gün optik mikroskop görüntüleri, (10X).

Kurkumin derişiminin 0, 10, 20, 30, 40 ve 50  $\mu\text{M}$  olarak uygulandığı MC3T3-E1 hücrelerinin morfolojileri ve canlılıkları Şekil 4.19'de verilen optik mikroskop görüntülerinde görölmektedir. Kurkumin içermeyen kontrol grubunda, MC3T3-E1 hücre morfolojisinin düzgün ve çoğalmasının homojen olduğu görölmektedir. Optik mikroskop görüntülerine göre 30  $\mu\text{M}$  kurkumin derişiminden yüksek derişimlerde kurkuminin apoptotik etkiye neden olduğu görölmektedir. Optik mikroskop görüntüleri ile Şekil 4.15'da verilen sonuçlar karşılaştırıldığında 30  $\mu\text{M}$  kurkumin derişiminden yüksek derişimlerde MC3T3-E1 hücre canlılığının azaldığı görölmektedir. Elde edilen optik mikroskop görüntüleri MTT sonuçları ile uyumluluk göstermektedir. Ayrıca MG-63 hücreleri için inhibitör doz olarak belirlenen 17  $\mu\text{M}$  kurkumin konsantrasyonuna yakın değerdeki 20  $\mu\text{M}$  kurkuminin MC3T3-E1 hücrelerinde apoptotik bir etki yaratmadığı ve hücre morfolojisinin kontrol gurubuna oldukça yakın bir morfolojide olduğu görölmektedir.



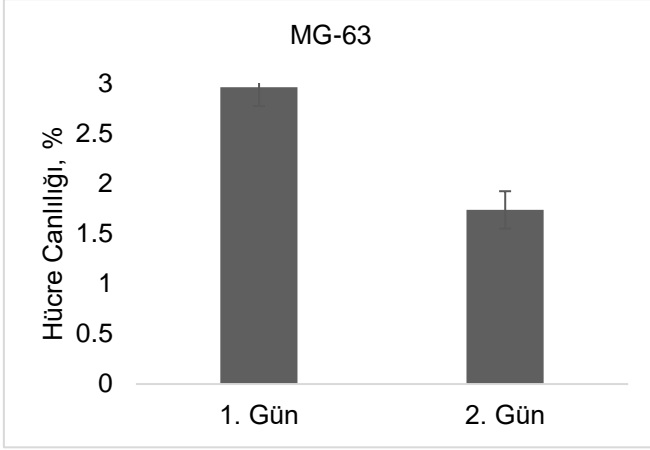




**Şekil 4.19.** Farklı kurkumin konsantrasyonlarının uygulandığı MC3T3-E1 hücrelerine ait optik mikroskop görüntüleri, (10X).

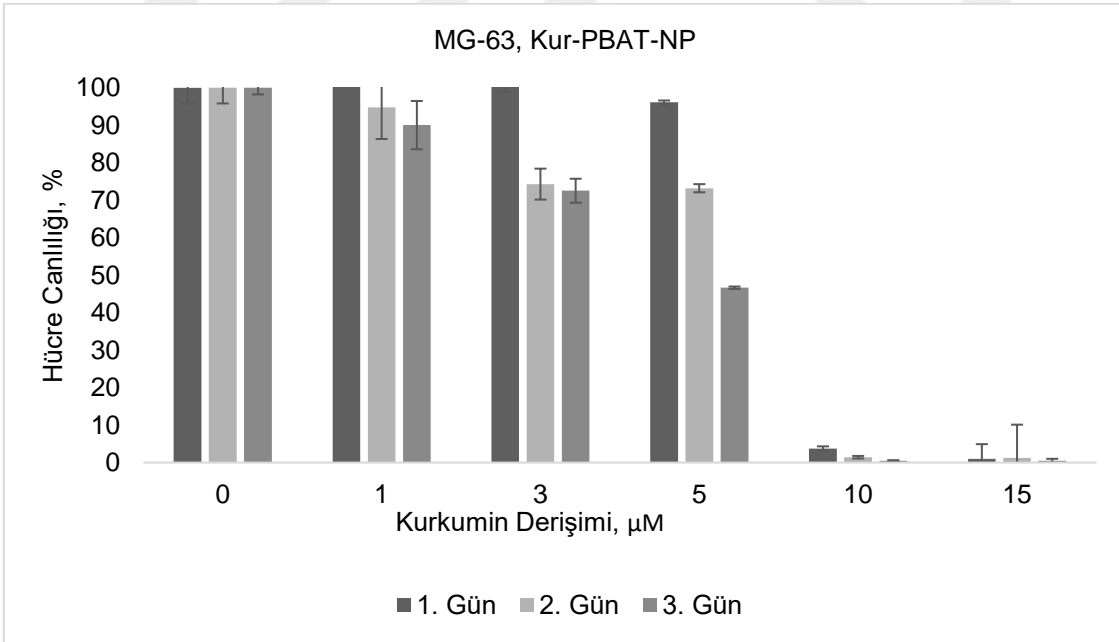
#### **4.3.1.3. Kurkumin Yüklü PBAT Nanopartiküllerin İnhibitör Konsantrasyonunun Belirlenmesi**

Kurkumin yüklü PBAT nanopartiküllerin sitotoksik etkilerinin incelenmesi için Bölüm 4.3.2’de ayrıntılı olarak bahsedildiği gibi kurkumin inhibitör konsantrasyon değeri göz önünde bulundurularak 17  $\mu\text{M}$  kurkumin içeren nanopartiküller uygulanmıştır. 17  $\mu\text{M}$  kurkumin içeren nanopartiküllerin MG-63 hücrelerinde incelenen MTT sonuçlarına göre Şekil 4.20’de de görüldüğü gibi hücre canlılığının % 3’ün altında olduğu görülmüştür. Mikropartiküller için belirlenen 17  $\mu\text{M}$  kurkumin inhibitör konsantrasyonu, nanopartiküllerin nano boyutlarından kaynaklanan farklı davranışlar nedeniyle nanopartikül uygulamasında hücreler üzerinde toksik etkiye neden olmuş ve hızlı bir ölüm gerçekleşmiştir. Daha kontrollü bir inhibisyon sağlamak için kurkumin içeren nanopartikül uygulamasında farklı doz denemeleri yapılmıştır. Bu amaçla 1, 3, 5, 10 ve 15  $\mu\text{M}$  kurkumin içeren nanopartiküllerin MG-63 hücreleri üzerindeki etkisi incelenmiştir.



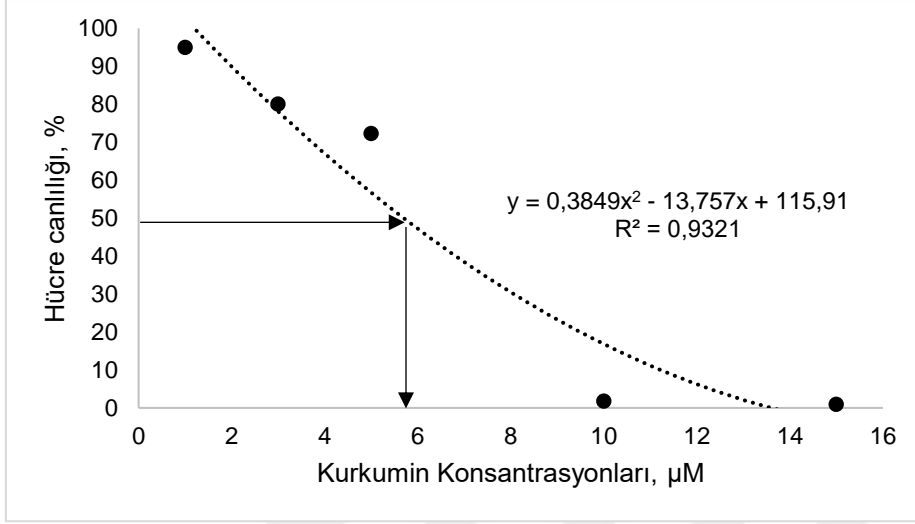
**Şekil 4.20.** 17  $\mu\text{M}$  kurkumin içeren PBAT nanopartiküllerin MG-63 hücre canlılığına etkisi.

1, 3, 5, 10 ve 15  $\mu\text{M}$  kurkumin içeren nanopartiküllerin MG-63 hücre canlılığı üzerindeki etkileri MTT sonuçları ile belirlenmiştir. Şekil 4.21’de MTT sonuçları doğrultusunda elde edilen % hücre canlılıklarının farklı miktarlarda kurkumin içeren nanopartiküllere göre değişimi incelenmektedir. Buna göre 1. günden itibaren 10 ve 15  $\mu\text{M}$  kurkumin içeren nanopartiküller MG-63 hücrelerini %97’nin üzerinde inhibe etmiştir.



**Şekil 4.21.** Farklı kurkumin derişimlerdeki kurkumin yüklü PBAT nanopartiküllerin MG-63 hücrelerinin canlılığına etkisi.

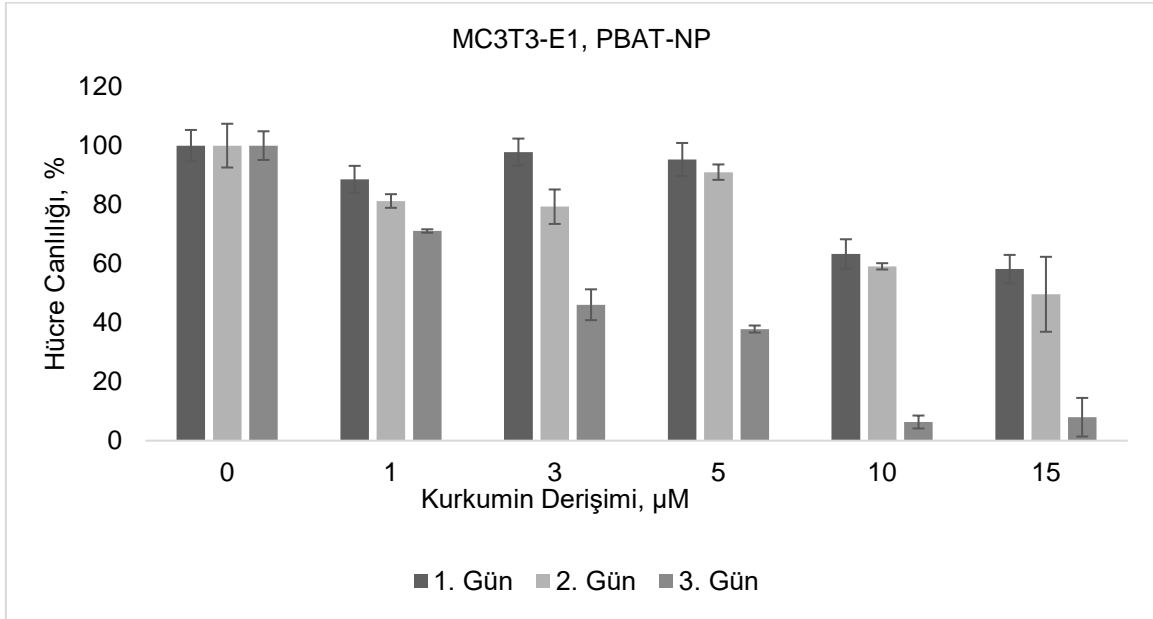
Şekil 4.22'te görüldüğü gibi nanopartiküllerin inhibitör konsantrasyonlarının belirlenmesi için % hücre canlılığına karşı kurkumin derişimleri grafiğe geçirilmiştir. Grafiğe göre % 50 MG-63 hücre canlılığının elde edildiği kurkumin derişiminin 6 µM olduğu belirlenmiştir. Sonuç olarak, kurkumin yüklü PBAT nanopartiküllerin inhibitör konsantrasyonu 6 µM olarak belirlenmiştir.



**Şekil 4.22.** Kurkumin yüklü PBAT nanopartiküller için farklı kurkumin inhibitör konsantrasyonlarının MG-63 hücre canlılığına etkisi.

Kurkumin yüklü PBAT nanopartiküller için belirlenen inhibitör konsantrasyon değerinin MC3T3-E1 hücre canlılığı üzerindeki etkileri MTT analizi ile belirlenmiştir. Şekil 4.23'te görüldüğü gibi 10 ve 15 µM kurkumin içeren nanopartiküllerin apoptotik etkiye neden olduğu görülmektedir. Ancak 5 µM kurkumin konsantrasyonunda 1. ve 2. güne ait değerlerde hücre canlılığının % 50 ve üzerinde olduğu görülmektedir. Sağlıklı osteoblast hücreleri ve osteosarkoma hücrelerine 24 saatlik kültür süresince kurkumin içerikli nanopartikül uygulamasının yapıldığı bir çalışmada, 10 µM kurkumin derişiminin üstünde sağlıklı osteoblastların hücre yoğunluğunda düşüş olduğu kaydedilmiştir. Ayrıca 5-25 µM arasında kurkumin içeren nanopartiküllerin MG-63 osteosarkoma hücrelerini inhibe ettiği rapor edilmiştir [153]. Yapılan tez çalışması ile gösterildiği gibi 5-10 µM kurkumin içeren nanopartiküllerin uygulanması ile hem MG-63 osteosarkoma hücreleri inhibe edilmiş hem de MC3T3-E1 kemik öncül hücreleri üzerinde sitotoksik bir etki görülmemiştir. Tez çalışması kapsamında 6 µM kurkumin içeren nanopartiküllerin osteosarkoma ve sağlıklı osteoblast hücrelerinin

canlılığı üzerindeki etkilerinin ilgili literatürdeki çalışmalarla benzerlik gösterdiği görülmektedir.



**Şekil 4.23.** Farklı kurkumin derişimlerdeki kurkumin yüklü PBAT nanopartiküllerin MC3T3-E1 hücrelerinin canlılığına etkisi.

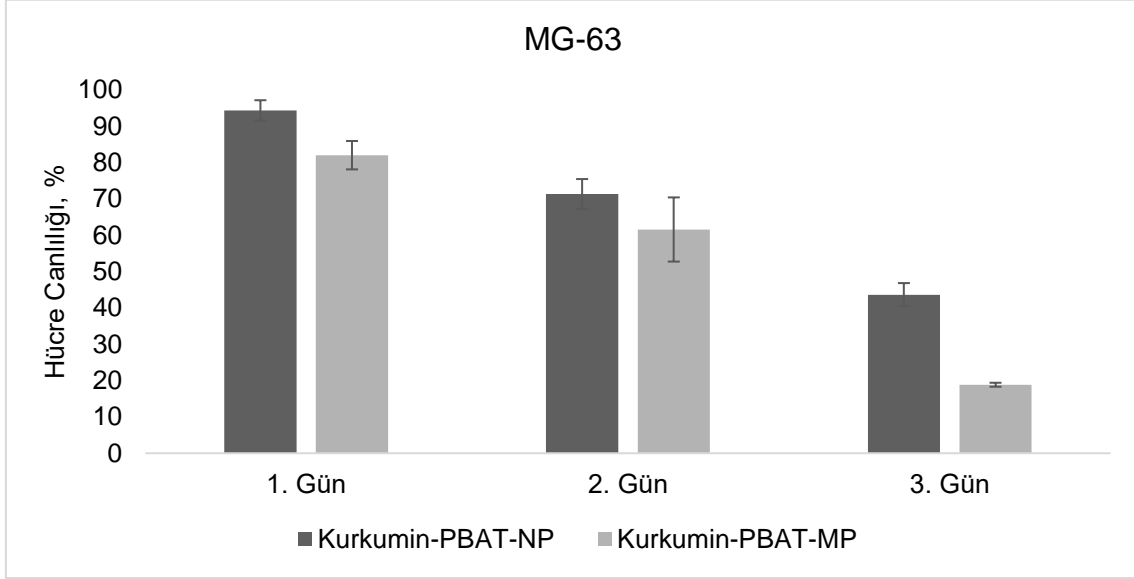
#### 4.3.2. Sitotoksosite Analizleri

Sitotoksosite analizleri kapsamında kurkumin yüklü olan ve olmayan PBAT mikro ve nanopartiküller MG-63 ve MC3T3-E1 hücrelerine uygulanmıştır. Her deney grubu MG-63 ve MC3T3-E1 hücrelerine ait kontrol gruplarını içermektedir. Kurkumin yüklü olan ve olmayan PBAT mikro ve nanopartiküller hücrelere 3 günlük kültür süresince uygulanmıştır. Hücre canlılıkları MTT analizi ile belirlenmiştir. Hücre canlılığı ve morfolojisi ise optik mikroskop ile takip edilmiştir. Her iki hücre tipi için de  $2.5 \times 10^4$  hücre/cm<sup>2</sup> hücre yoğunluğu kullanılarak partikül uygulaması gerçekleştirilmiştir.

##### 4.3.2.1. MTT Analizi

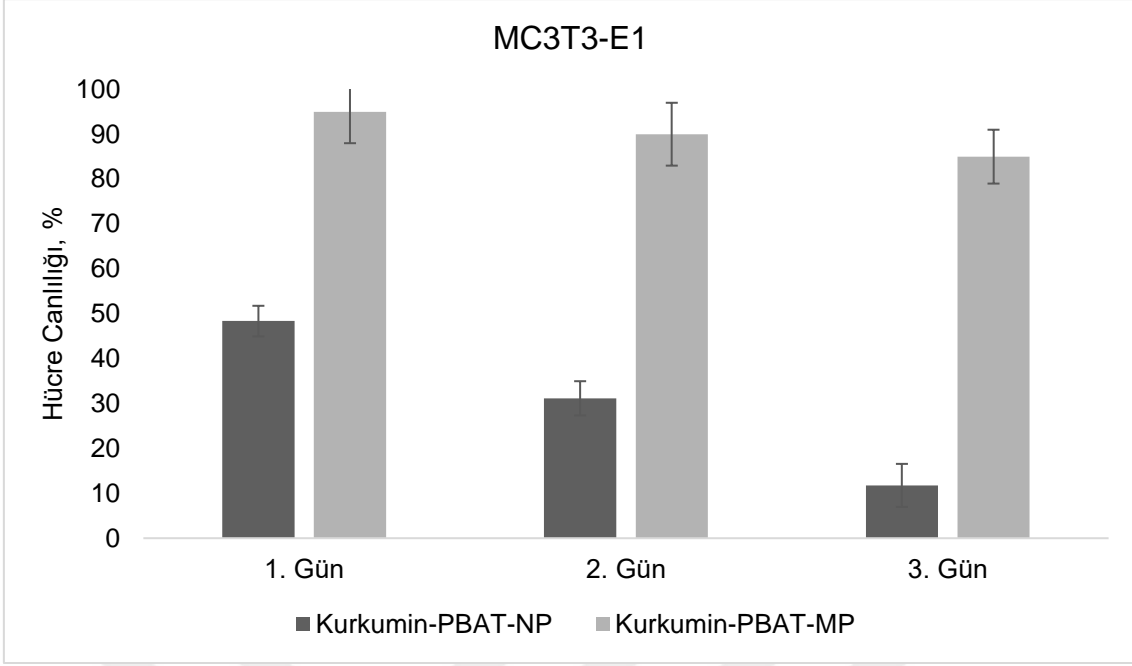
Şekil 4.24'te kurkumin yüklü PBAT mikro ve nanopartiküllerin 3 gün süresince MG-63 hücrelerine uygulanmasıyla MTT verilerinden elde edilen % hücre canlılıklarının zamana bağlı değişimleri verilmiştir. Grafiğe göre zamanla her iki partikül tipi için de MG-63 hücrelerinin inhibe olduğu görülmektedir. MG-63 hücreleri üzerindeki hücre canlılığı incelendiğinde 3. günde mikro ve nanopartiküller için oldukça farklı

% hücre canlılıkları gözlenmektedir. Nanopartiküllerin mikropartiküllere göre MG-63 hücrelerini daha fazla inhibe ettiği görülmektedir. Kurkumin yüklü PBAT nanopartiküllerin hücre içine alınması bu durumun nedeni olabilir.



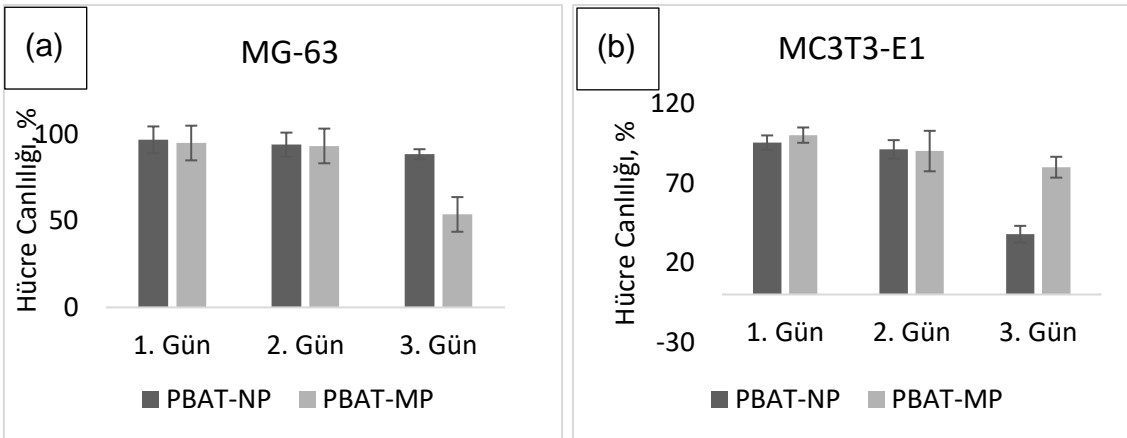
**Şekil 4.24.** 17 ve 6  $\mu\text{M}$  kurkumin yüklü PBAT mikro ve nanopartiküllerin MG-63 hücreleri üzerindeki etkisinin zamana göre değişimi.

PBAT mikro ve nanopartiküllerin sitotoksik etkilerinin belirlenmesi için MC3T3-E1 kemik öncül hücreleri üzerinde kurkumin yüklü partiküller uygulanarak MTT analizi gerçekleştirilmiştir. Şekil 4.25'da zamana karşı MC3T3-E1'e ait % hücre canlılıkları verilmiştir. Tüm kurkumin konsantrasyonlarında 2. günden itibaren hücre canlılığında bir düşüş meydana geldiği görülmektedir.



**Şekil 4.25.** Kurkumin içeren PBAT mikro ve nanopartiküllerin MC3T3-E1 hücrelerinin canlılığına olan etkisi.

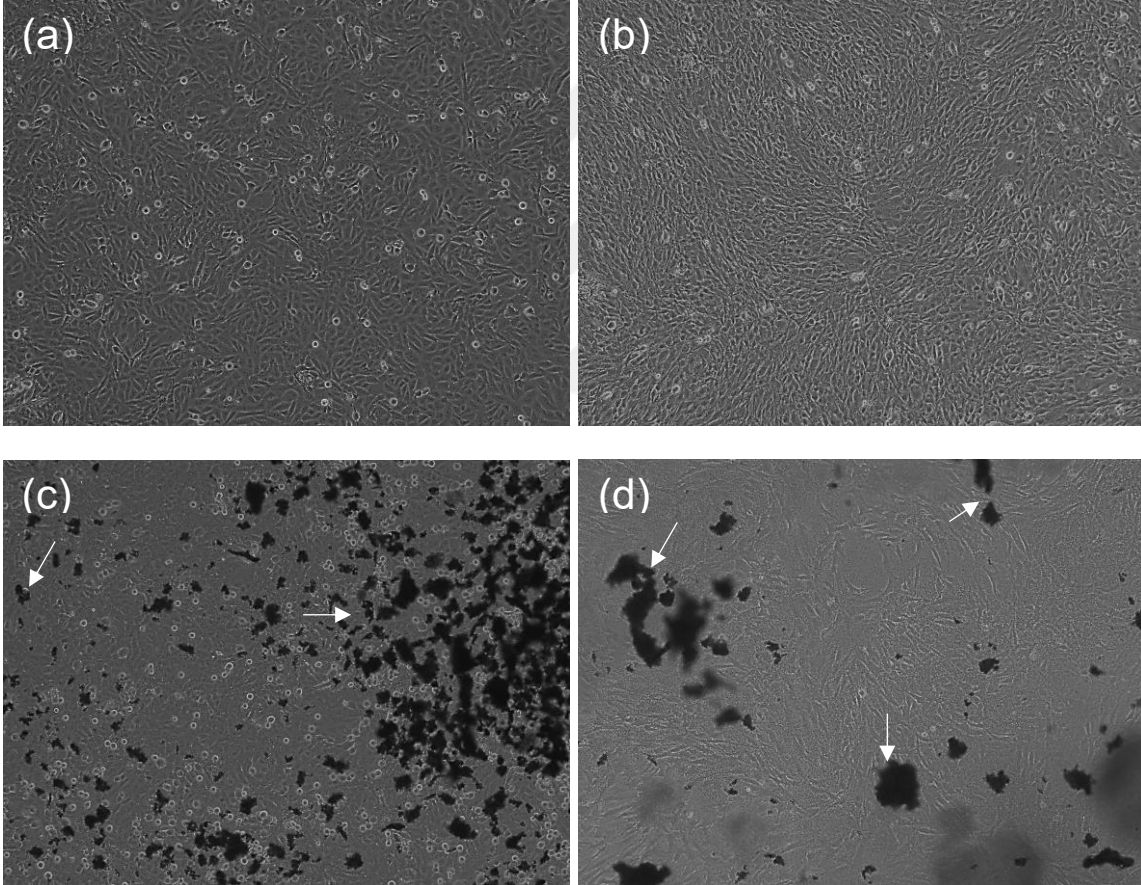
PBAT mikro ve nanopartiküllerin sitotoksik etkilerinin belirlenmesi için MC3T3-E1 kemik öncül hücreleri ve MG-63 insan kemik kanseri hücreleri üzerinde kurkumin yüklü olmayan partiküller uygulanarak MTT analizi gerçekleştirilmiştir. Mikro ve nanopartiküllerin inhibitör konsantrasyon uygulaması için kullanılan partikül miktarı ile kütlece aynı miktardaki partikül MC3T3-E1 ve MG-63 hücrelerine uygulanmıştır. Şekil 4.26'da kurkumin içermeyen PBAT mikro ve nanopartiküllerin MG-63 ve MC3T3-E1 hücreleri üzerinde toksik bir etkiye neden olmadığı görülmektedir.

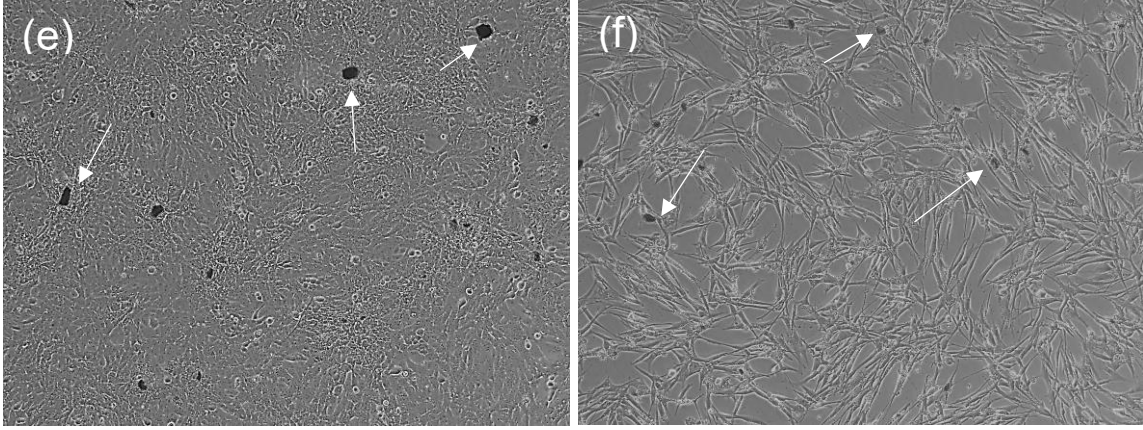


**Şekil 4.26.** Kurkumin içermeyen PBAT mikro ve nanopartiküllerin (a) MG-63 ve (b) MC3T3-E1 hücrelerinin canlılığına olan etkisi.

#### 4.3.2.2. Optik Mikroskop Analizi

Kurkumin yüklü PBAT mikro ve nanopartiküllerin sırasıyla 17  $\mu$ M ve 6  $\mu$ M kurkumin inhibitör konsantrasyonlarıyla uygulandığı MG-63 ve MC3T3-E1 hücrelerinin 1. gün optik mikroskop görüntüleri Şekil 4.27'de yer almaktadır. Oklar ile ifade edilen yapılar partiküllerin varlığını göstermektedir. Buna göre MG-63 ve MC3T3-E1 hücrelerinin kontrol grupları ile karşılaştırıldığında kurkumin yüklü PBAT mikro ve nanopartikül uygulamasıyla hem MG-63 hem MC3T3-E1 hücre gruplarında ölü hücreler görülmektedir. Optik mikroskop görüntüleri ile de desteklendiği gibi kurkumin yüklü PBAT mikro ve nanopartiküllerin MG-63 hücrelerini inhibe ettiği görülmektedir.





**Şekil 4.27.** Kurkumin yüklü PBAT mikro ve nanopartiküllerinin MG-63 ve MC3T3-E1 hücreleri üzerindeki etkilerinin 1. gün optik mikroskop görüntüleri: (a) MG-63 kontrol; (b) MC3T3-E1 kontrol; kurkumin yüklü PBAT mikropartiküllerin MG-63, (c) ve MC3T3-E1 (d) hücrelerindeki etkisi; kurkumin yüklü PBAT nanopartiküllerin MG-63, (e) ve MC3T3-E1 (f) hücrelerindeki etkisi, (10X).

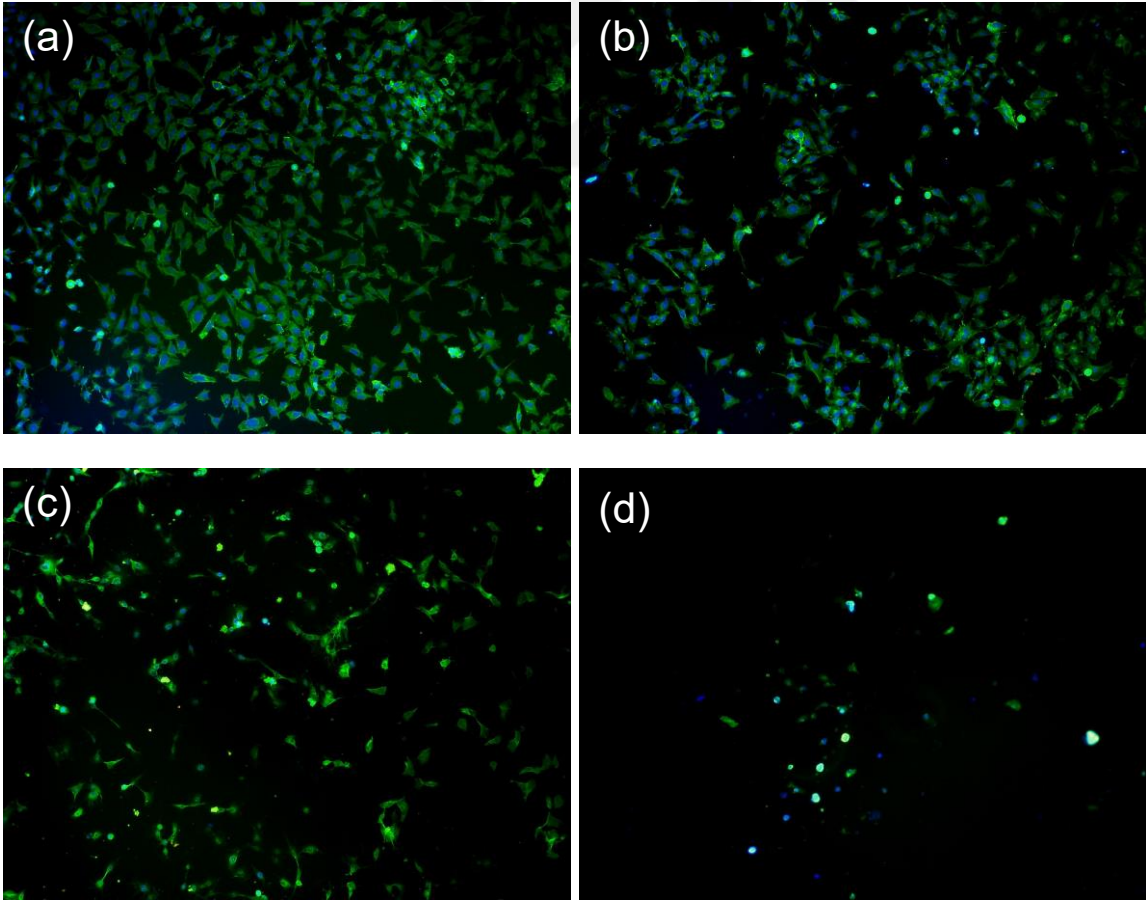
#### 4.2.1.1. Hücre Canlılığı ve Morfolojisinin Görüntülenmesi

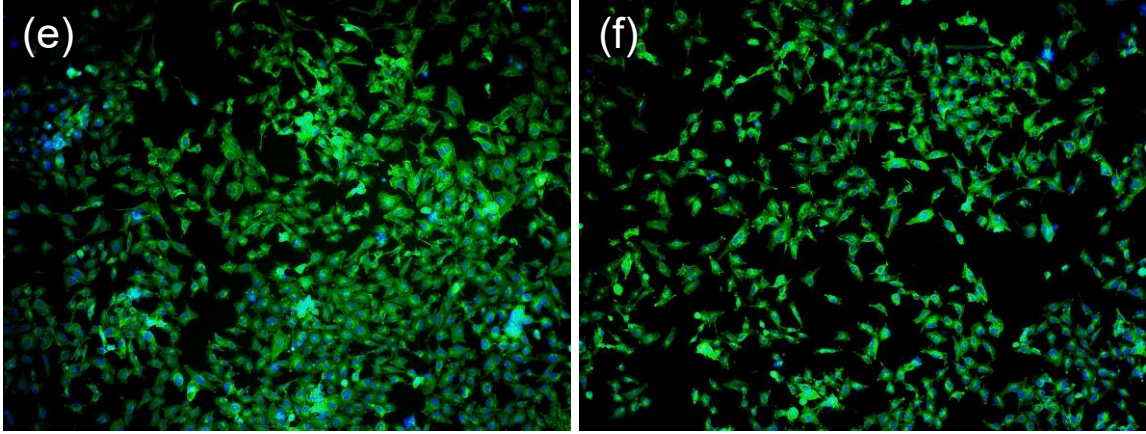
Çalışmada 17 ve 30  $\mu\text{M}$  kurkumin içeren mikropartiküller, 6 ve 10  $\mu\text{M}$  kurkumin içeren nanopartiküller, kurkumin içermeyen mikro ve nanopartiküller ve 17  $\mu\text{M}$  kurkumin inhibitör konsantrasyonunun MG-63 ve MC3T3-E1 hücrelerinin morfolojisine ve canlılığına olan etkileri incelenmiştir. Her iki hücre tipi için de  $1 \times 10^4$  hücre/göz yoğunlukta hücre ekimi yapılarak uygulama gerçekleştirilmiştir. Uygulamanın ardından 24 saat sonra boyama gerçekleştirilmiştir. Hücreler Alexa Flour 488 Phalloidin konjuge anti-F-aktin antikoru ve DAPI ile boyanmıştır. Hücre şeklinin oluşmasında görev alan aktin filamentleri yeşil ile, hücre çekirdekleri ise mavi ile boyanmıştır. Canlılığını ve morfolojilerini koruyan hücreler F-aktin organizasyonunu sağlarken, apoptotik ölümün gerçekleştiği durumlarda ise F-aktin organizasyonunun kaybedilmesiyle membran yapısında değişimler oluşmaktadır.

Şekil 4.28'de 17 ve 30  $\mu\text{M}$  kurkumin içeren mikropartiküller, 6 ve 10  $\mu\text{M}$  kurkumin içeren nanopartiküller ve 17  $\mu\text{M}$  kurkumin inhibitör konsantrasyonunun MG-63 hücrelerinin morfolojisine ve canlılığına olan etkileri görülmektedir. MG-63 hücrelerinin çekirdekleri ve aktin filamentleri mavi ve yeşil renkte görülmektedir. Fibroblastik karakterdeki MG-63 hücrelerine ait kontrol grubunda hücre iskeletinin



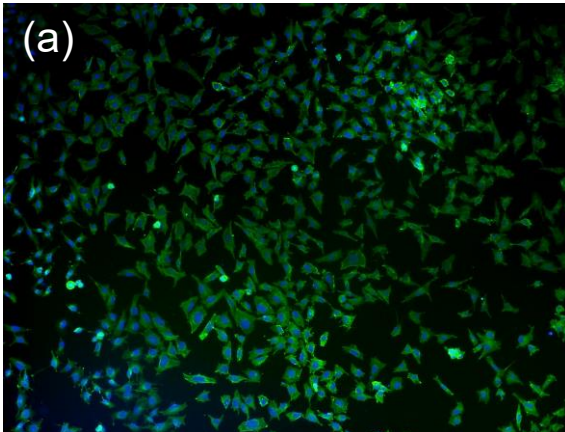
korunduğu ve hücreslerin oldukça sağlıklı olduğu görölmektedir. 17  $\mu$ M kurkumin inhibitör konsantrasyonunun uygulandığı deney grubunda ise kontrol grubuna göre hücre yoğunluğunun azaldığı görölmektedir. MTT sonuçları ile benzer şekilde, 17  $\mu$ M kurkumin uygulamasının ilk gününde kontrol grubuna göre canlılığın bir miktar azaldığı görölmektedir. 10  $\mu$ M kurkumin yüklü nanopartiküllerdeki canlılığın inhibitör miktar olarak belirlenen 6  $\mu$ M kurkumin yüklü nanopartiküllere göre daha az olduğu, hücre bütünlüklerinin bozulduğu ve hücre yoğunluğunun azaldığı görölmektedir. MTT sonuçları ile uyumlu olarak 6  $\mu$ M kurkumin derişiminden fazla kurkumin içeren nanopartiküllerin ilk gün analizinde MG-63 hücre canlılığını oldukça azalttığı görölmektedir. 30  $\mu$ M kurkumin yüklü mikropartiküllerde ise 17  $\mu$ M kurkumin yüklü mikropartiküllere göre MG-63 hücre yoğunluğunun azaldığı görölmektedir. MTT sonuçları ile uyumlu olarak 17  $\mu$ M kurkumin yüklü mikropartiküllerin ilk gün analizinde kontrol grubu ile benzer hücre canlılığı görölmektedir.

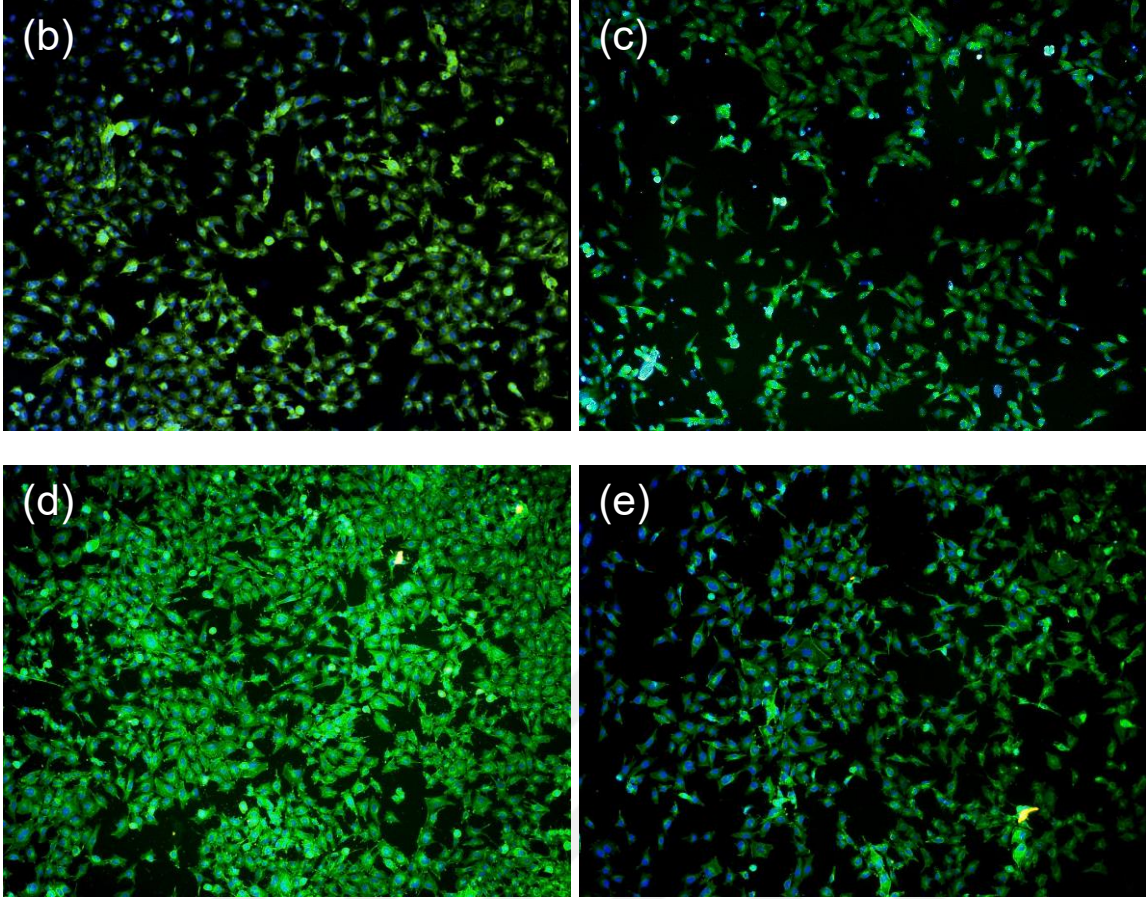




**Şekil 4.28.** MG-63 hücrelerinin uygulama sonrası F-aktin (yeşil)-DAPI (mavi) boyama görüntüleri; (a) MG-63, (b) 17  $\mu$ M kurkumin, (c) 6 ve (d) 10  $\mu$ M kurkumin içeren nanopartiküller, (e) 17 ve (f) 30  $\mu$ M kurkumin içeren mikropartiküller.

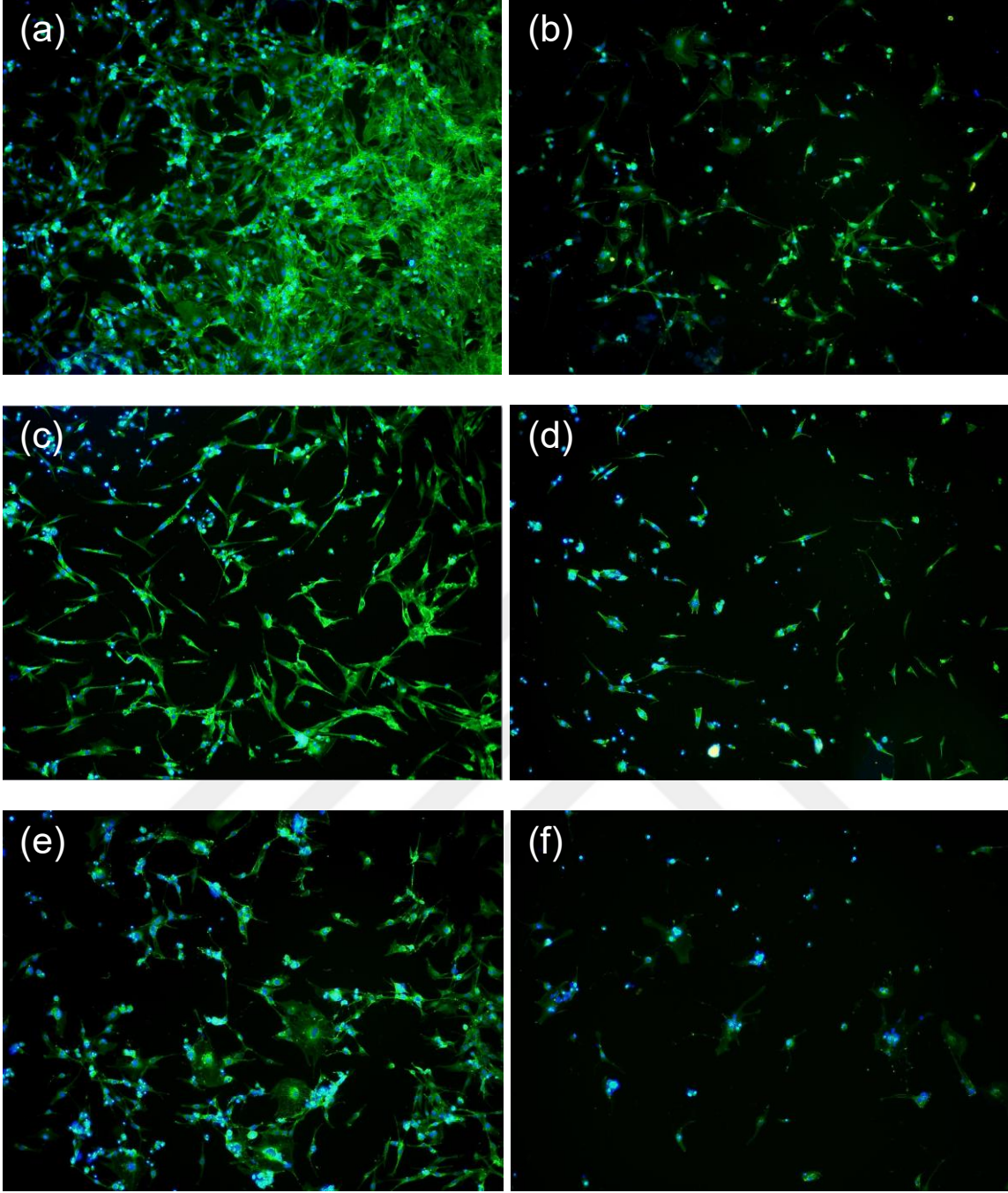
Kurkumin içermeyen mikro ve nanopartiküllerin MG-63 hücrelerinin morfolojisine ve canlılığına olan etkileri incelenmiştir. Şekil 4.29'da uygulama sonrasındaki MG-63 hücrelerinin çekirdek ve aktin filamentleri görülmektedir. Fibroblastik karakterdeki MG-63 hücrelerine ait kontrol grubunda hücre iskeletinin korunduğu ve hücrelerin oldukça sağlıklı olduğu görülmektedir. Deney grupları, mikropartiküller için 17 ve 30  $\mu$ M, nanopartiküller için 6 ve 10  $\mu$ M kurkumin inhibitör konsantrasyonunu sağlamak için kullanılan boş partikül miktarlarını içermektedir. Tüm deney gruplarında kontrol grubuna göre hücre canlılığı ve morfolojisinin korunduğu görülmektedir. MTT sonuçları ile uyumlu olarak kurkumin yüklü olmayan partiküller, MG-63 hücreleri üzerinde sitotoksik bir etki yaratmamaktadır.





**Şekil 4.29.** MG-63 hücrelerine ait F-aktin (yeşil)-DAPI (mavi) boyama görüntüleri; (a) MG-63, (b) 6 ve (c) 10  $\mu\text{M}$  kurkumin içermeyen PBAT nanopartiküller, (d) 17 ve (e) 30  $\mu\text{M}$  kurkumin içermeyen PBAT mikropartiküller.

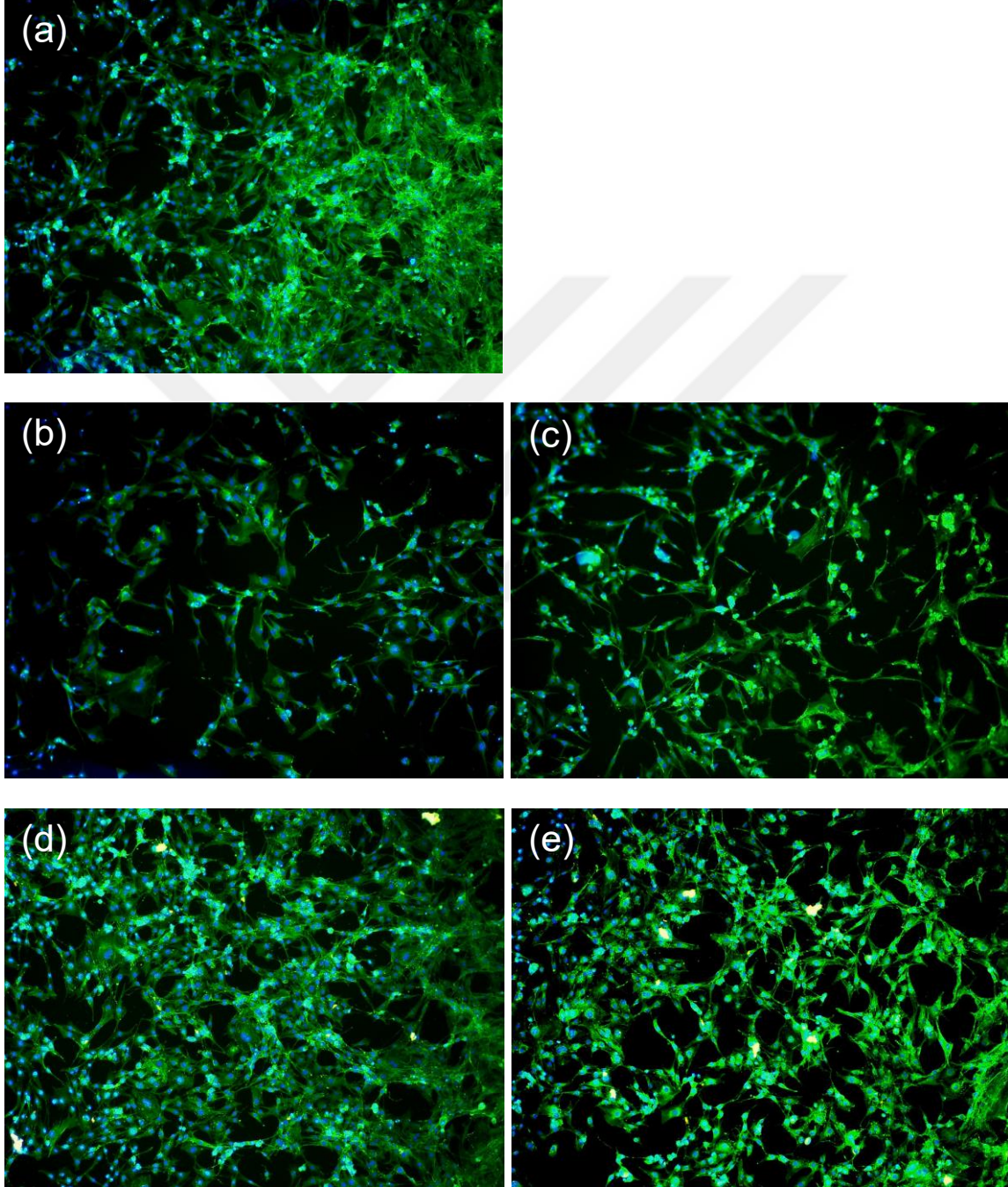
Şekil 4.30'da 17 ve 30  $\mu\text{M}$  kurkumin içeren mikropartiküller, 6 ve 10  $\mu\text{M}$  kurkumin içeren nanopartiküller ve 17  $\mu\text{M}$  kurkumin inhibitör konsantrasyonunun MC3T3-E1 hücrelerinin morfolojisine ve canlılığına olan etkileri görülmektedir. MC3T3-E1 hücrelerinin çekirdekleri ve aktin filamentleri mavi ve yeşil renkte boyanmıştır. MC3T3-E1 hücrelerine ait kontrol grubunda hücre iskeletinin korunduğu ve hücrelerin oldukça sağlıklı olduğu görülmektedir. 17  $\mu\text{M}$  kurkumin inhibitör konsantrasyonunun uygulandığı deney grubunda ise kontrol grubuna göre hücre yoğunluğunun azaldığı görülmektedir. Mikropartiküller için 17  $\mu\text{M}$  ve nanopartiküller için 6  $\mu\text{M}$  olarak belirlenen kurkumin inhibitör konsantrasyonları ile mikropartiküller için 30  $\mu\text{M}$  ve nanopartiküller için 10  $\mu\text{M}$  kurkumin içeren gruplara göre daha yüksek hücre canlılığı elde edilmiştir. Sonuçlar MTT analizi ile elde edilen veriler ile uyumudur.



**Şekil 4.30.** MC3T3-E1 hücrelerinin uygulama sonrası F-aktin (yeşil)-DAPI (mavi) boyama görüntüleri; (a) MG-63, (b) 17  $\mu$ M kurkumin, (c) 6 ve (d) 10  $\mu$ M kurkumin içeren nanopartiküller, (e) 17 ve (f) 30  $\mu$ M kurkumin içeren mikropartiküller.

Kurkumin içermeyen mikro ve nanopartiküllerin MC3T3-E1 hücrelerinin morfolojisine ve canlılığına olan etkileri incelenmiştir. Şekil 4.31’de uygulama sonrasındaki MC3T3-E1 hücrelerinin çekirdek ve aktin filamentleri görülmektedir. MC3T3-E1 hücrelerine ait kontrol grubunda hücre iskeletinin korunduğu ve hücrelerin sağlıklı olduğu görülmektedir. Deney grupları, mikropartiküller için 17 ve

30  $\mu\text{M}$ , nanopartiküller için 6 ve 10  $\mu\text{M}$  kurkumin inhibitör konsantrasyonunu sağlamak için kullanılan boş partikül miktarlarını içermektedir. Tüm deney gruplarında kontrol grubuna göre hücre canlılığı ve morfolojisinin korunduğu görülmektedir. MTT sonuçları ile uyumlu olarak kurkumin yüklü olmayan partiküller, MC3T3-E1 hücreleri üzerinde sitotoksik bir etki yaratmamaktadır.

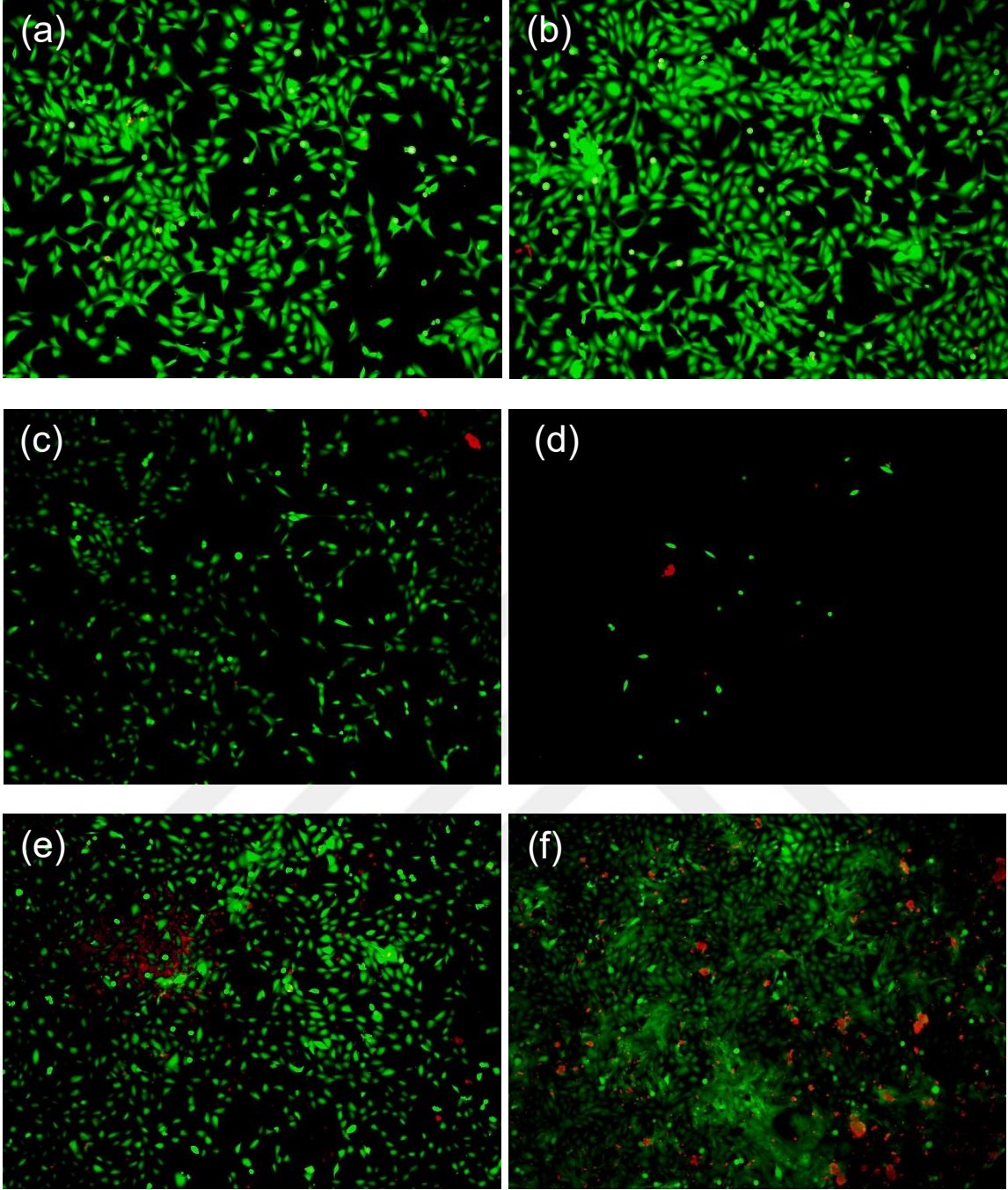


**Şekil 4.31.** MC3T3-E1 hücrelerine ait F-aktin (yeşil)-DAPI (mavi) boyama görüntüleri; (a) MG-63, (b) 6 ve (c) 10  $\mu\text{M}$  kurkumin içermeyen PBAT nanopartiküller, (d) 17 ve (e) 30  $\mu\text{M}$  kurkumin içermeyen PBAT mikropartiküller.

### 4.3.3. Canlı-Ölü Analizi

Canlı-ölü analizinde kurkumin olan ve olmayan PBAT mikro ve nanopartiküller ve 17  $\mu\text{M}$  kurkumin inhibitör konsantrasyonunun MC3T3-E1 ve MG-63 hücrelerine uygulanmasının ardından 24 saat sonra hücreler Etidyum homodimer-1 ve kalsein-AM ile boyanarak görüntülenmiştir. Yeşil ile görünen görüntüler canlı hücreleri, kırmızı ile görünen görüntüler ise ölü hücreleri göstermektedir. Apoptotik ölümün gerçekleştiği durumlarda ise membran yapısında değişimler oluşmakla birlikte, ilerleyen aşamada küçük haldeki hücre cisimciklerine rastlanmaktadır. Çalışmada 17 ve 30  $\mu\text{M}$  kurkumin içeren mikropartiküller, 6 ve 10  $\mu\text{M}$  kurkumin içeren nanopartiküller, kurkumin içermeyen mikro ve nanopartiküller ve 17  $\mu\text{M}$  kurkumin inhibitör konsantrasyonunun MG-63 ve MC3T3-E1 hücrelerinin morfolojisine ve canlılığına olan etkileri incelenmiştir. Her iki hücre tipi için de  $1 \times 10^4$  hücre/göz yoğunlukta hücre ekimi yapılarak uygulama gerçekleştirilmiştir.

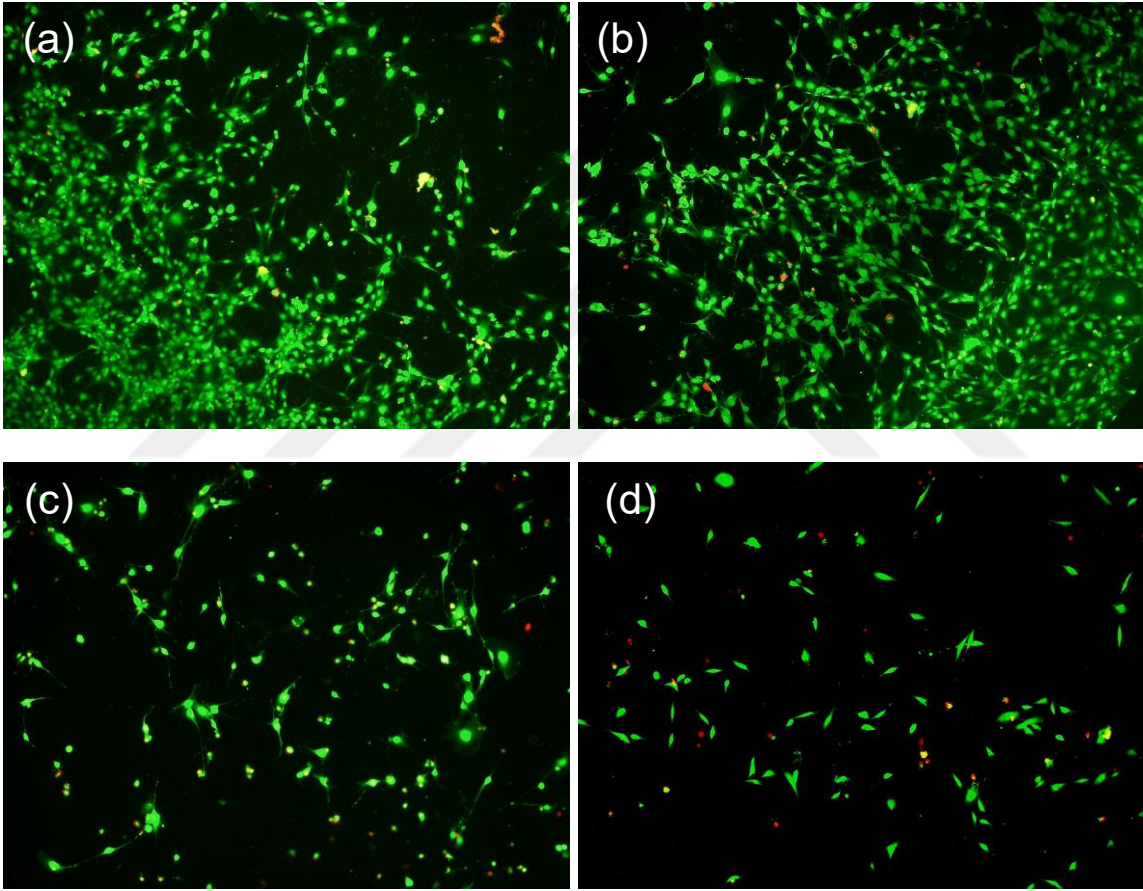
Şekil 4.32'de 17 ve 30  $\mu\text{M}$  kurkumin içeren mikropartiküller, 6 ve 10  $\mu\text{M}$  kurkumin içeren nanopartiküller ve 20  $\mu\text{M}$  kurkumin inhibitör konsantrasyonunun MG-63 hücrelerinin morfolojisine ve canlılığına olan etkileri görülmektedir. 17  $\mu\text{M}$  kurkumin inhibitör konsantrasyonu uygulaması 1. gün MTT sonuçları ile paralel olarak MG-63 hücre canlılığında anlamlı bir değişikliğe neden olmamıştır. 10  $\mu\text{M}$  kurkumin içeren nanopartikül uygulaması ile, inhibitör konsantrasyon olarak belirlenen 6  $\mu\text{M}$  kurkumin içeren nanopartikül uygulamasına göre MTT sonuçları ile uyumlu olarak MG-63 hücrelerinin canlılığında daha fazla azalma görülmüştür. Kurkumin yüklü PBAT nanopartikül uygulamasında mikropartiküllere göre hücre yoğunluğunun daha az olduğu görülmektedir. MTT sonuçları ile benzer olarak, 17  $\mu\text{M}$  kurkumin içeren PBAT mikropartiküllerde kontrol grubuna göre ölü hücrelerin olduğu görülmektedir. 30  $\mu\text{M}$  kurkumin içeren PBAT mikropartiküllerin inhibitör konsantrasyon miktarı kadar (17  $\mu\text{M}$ ) kurkumin içeren mikropartiküllere göre daha fazla sayıda hücreyi inhibe ettiği görülmektedir.



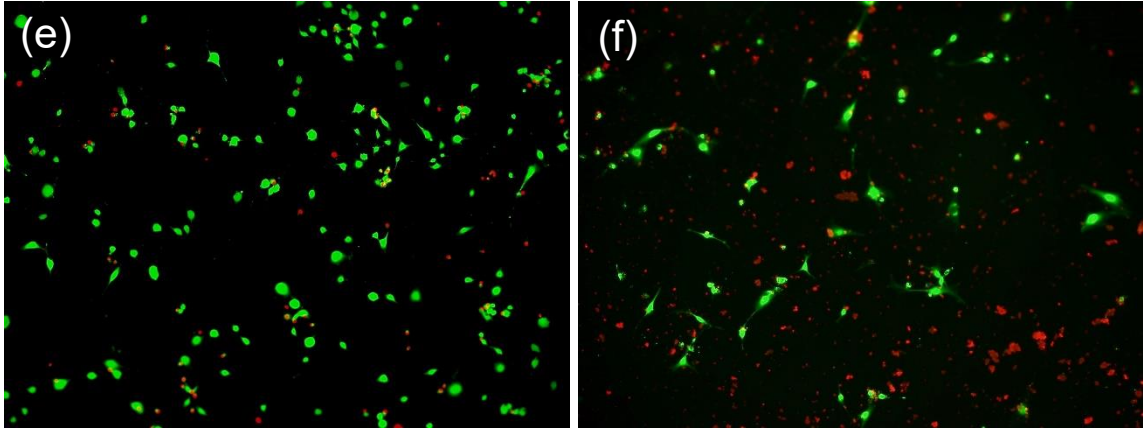
**Şekil 4.32.** MG-63 hücrelerinin uygulama sonrası canlı (yeşil)-ölü (kırmızı) analizi görüntüleri; (a) MG-63, (b) 17  $\mu$ M kurkumin, (c) 6 ve (d) 10  $\mu$ M kurkumin içeren nanopartiküller, (e) 17 ve (f) 30  $\mu$ M kurkumin içeren mikropartiküller.

Şekil 4.33'te 17 ve 30  $\mu$ M kurkumin içeren mikropartiküller, 6 ve 10  $\mu$ M kurkumin içeren nanopartiküller ve 20  $\mu$ M kurkumin inhibitör konsantrasyonunun MC3T3-E1 hücrelerinin morfolojisine ve canlılığına olan etkileri görülmektedir. 17  $\mu$ M kurkumin inhibitör konsantrasyonu uygulamasının 1.gün MTT sonuçları ile paralel olarak

MC3T3-E1 hücrelerinin canlılığı üzerinde anlamlı bir değişikliğe neden olmadığı görülmüştür. Kurkumin inhibitör konsantrasyon değerlerinden fazla miktarda kurkumin içeren (30 ve 10  $\mu\text{M}$ ) mikro ve nanopartiküllerin MC3T3-E1 hücrelerinin canlılığında azalmaya neden olduğu görülmektedir. İnhibitör konsantrasyon miktarında kurkumin içeren mikro ve nanopartiküllerde (17 ve 6  $\mu\text{M}$ ) hücre canlılığının kontrol grubuyla benzer olduğu görülmektedir. Elde edilen görüntüler ile, 17  $\mu\text{M}$  kurkumin içeren mikropartiküller, 6  $\mu\text{M}$  kurkumin içeren nanopartiküller ve 17  $\mu\text{M}$  kurkumin inhibitör konsantrasyonunun MC3T3-E1 hücreleri üzerinde sitotoksik etkiye neden olmadığı belirlenmiştir.

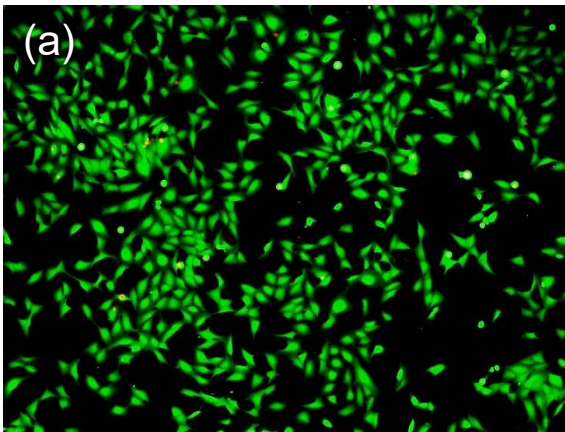


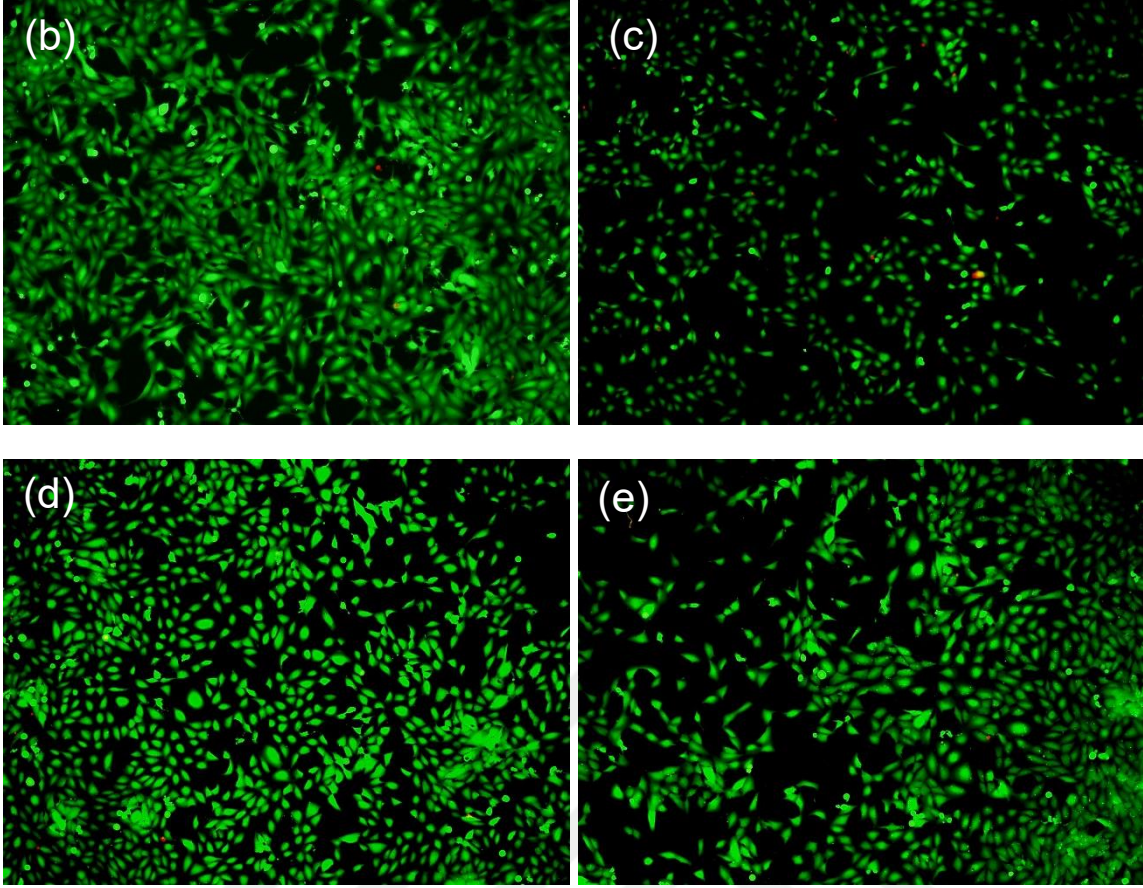




**Şekil 4.33.** MC3T3-E1 hücrelerinin uygulama sonrası canlı (yeşil)-ölü (kırmızı) analizi görüntüleri; (a) MC3T3-E1, (b) 17  $\mu\text{M}$  kurkumin, (c) 6 ve (d) 10  $\mu\text{M}$  kurkumin içeren nanopartiküller, (e) 17 ve (f) 30  $\mu\text{M}$  kurkumin içeren mikropartiküller.

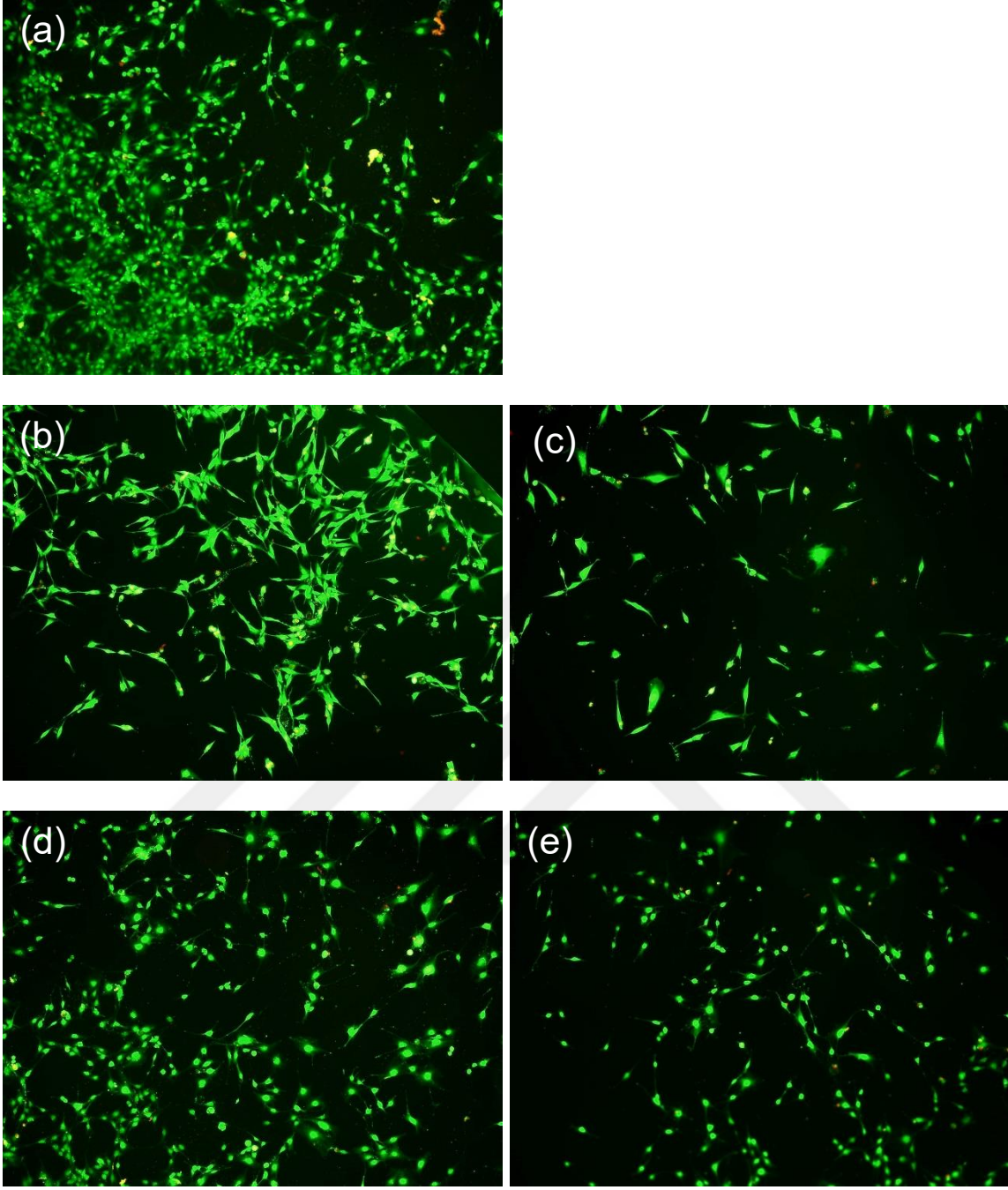
Şekil 4.34'te kurkumin içermeyen mikro ve nanopartiküllerin MG-63 hücrelerinin morfolojisine ve canlılığına olan etkileri incelenmiştir. MC3T3-E1 hücrelerine ait kontrol grubunda hücre iskeletinin korunduğu ve hücrelerin sağlıklı olduğu görülmektedir. Deney grupları, mikropartiküller için 17 ve 30  $\mu\text{M}$ , nanopartiküller için 6 ve 10  $\mu\text{M}$  kurkumin inhibitör konsantrasyonunu sağlamak için kullanılan boş partikül miktarlarını içermektedir. 10  $\mu\text{M}$  kurkumin inhibitör konsantrasyonunu sağlamak için kullanılan boş nanopartikül miktarının uygulandığı grupta inhibitör konsantrasyon için uygulanan gruba göre hücre yoğunluğunun daha az olduğu görülmektedir. Diğer deney gruplarında kontrol grubuna göre hücre canlılığı ve morfolojisinin korunduğu görülmektedir. MTT sonuçları ile uyumlu olarak kurkumin yüklü olmayan partiküller, MG-63 hücreleri üzerinde sitotoksik bir etki yaratmamaktadır.





**Şekil 4.34.** MG-63 hücrelerine ait canlı (yeşil)-ölü (kırmızı) analizi görüntüleri; (a) MG-63, (b) 6 ve (c) 10  $\mu\text{M}$  kurkumin içermeyen PBAT nanopartiküller, (d) 17 ve (e) 30  $\mu\text{M}$  kurkumin içermeyen PBAT mikropartiküller.

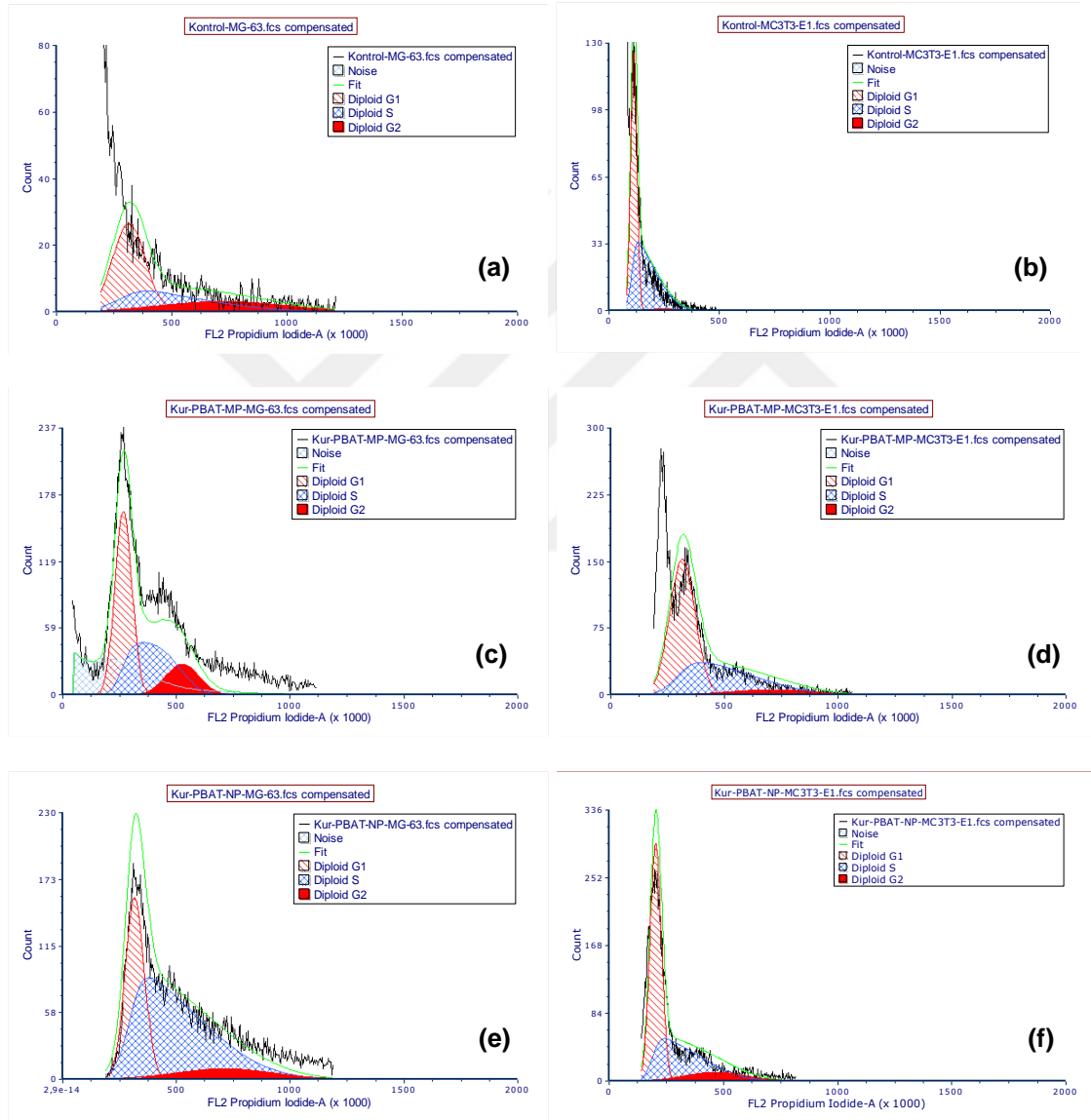
Şekil 4.35'te kurkumin içermeyen mikro ve nanopartiküllerin MC3T3-E1 hücrelerinin morfolojisine ve canlılığına olan etkileri incelenmiştir. Uygulama sonrasında canlı MC3T3-E1 hücreleri yeşil renkte, ölü hücreler ise kırmızı renkte görülmektedir. MC3T3-E1 hücrelerine ait kontrol grubunda hücre iskeletinin korunduğu ve hücrelerin sağlıklı olduğu görülmektedir. Deney grupları, mikropartiküller için 17 ve 30  $\mu\text{M}$ , nanopartiküller için 6 ve 10  $\mu\text{M}$  kurkumin inhibitör konsantrasyonunu sağlamak için kullanılan boş partikül miktarlarını içermektedir. Tüm deney gruplarında kontrol grubuna göre hücre canlılığı ve morfolojisinin korunduğu görülmektedir. MTT sonuçları ile uyumlu olarak kurkumin yüklü olmayan partiküller, MC3T3-E1 hücreleri üzerinde sitotoksik bir etki yaratmamaktadır.



**Şekil 4.35.** MC3T3-E1 hücrelerine ait canlı (yeşil)-ölü (kırmızı) analizi görüntüleri; (a) MC3T3-E1, (b) 6 ve (c) 10  $\mu$ M kurkumin içermeyen PBAT nanopartiküller, (d) 17 ve (e) 30  $\mu$ M kurkumin içermeyen PBAT mikropartiküller (10X).

#### 4.3.4. Hücre Döngü Analizi

Kurkumin yüklü PBAT mikro ve nanopartiküllerin, MG-63 hücrelerinin hücre döngüsünde inhibe ettikleri fazı ve MC3T3-E1 hücrelerinin hücre döngüsüne etkilerini belirlemek amacıyla hücre döngü analizi gerçekleştirilmiştir. Analiz, partiküllerin 24 saat boyunca ayrı ayrı her iki hücre tipi ile etkileştirilmesinin ardından gerçekleştirilmiştir. Akış sitometrisi analizinde G1, S ve G2 fazlarında bulunan birim hücre miktarını gösteren grafikler Şekil 4.36'da görülmektedir.



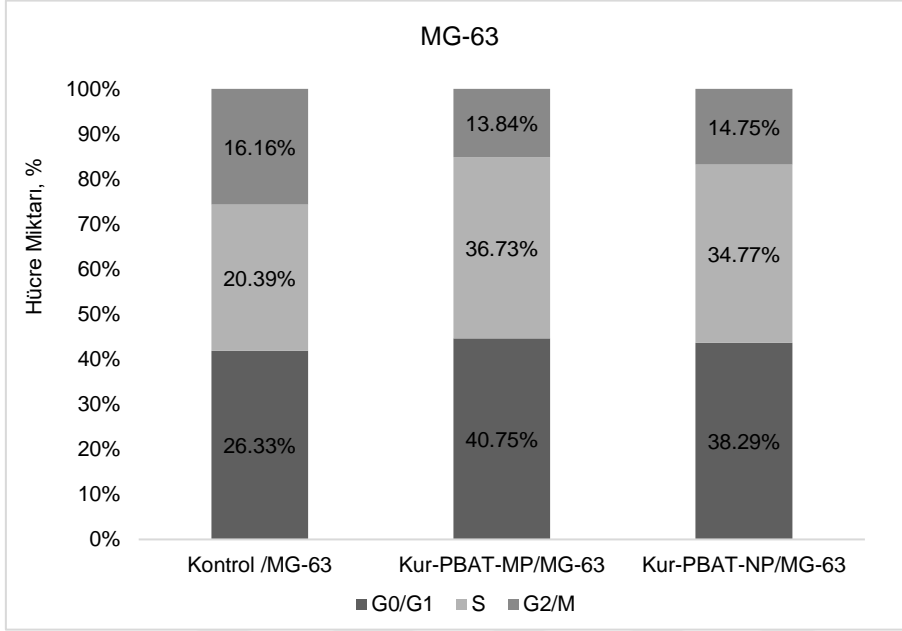
**Şekil 4.36.** Akış sitometrisi analizinde G1, S ve G2 fazlarında bulunan birim hücre miktarları.

Akış sitometrisi analizinden elde edilen veriler her bir hücre döngü fazı için yüzde hücre sayısı olarak Şekil 4.37 ve Şekil 4.38'de verilmiştir. Şekil 4.37'de

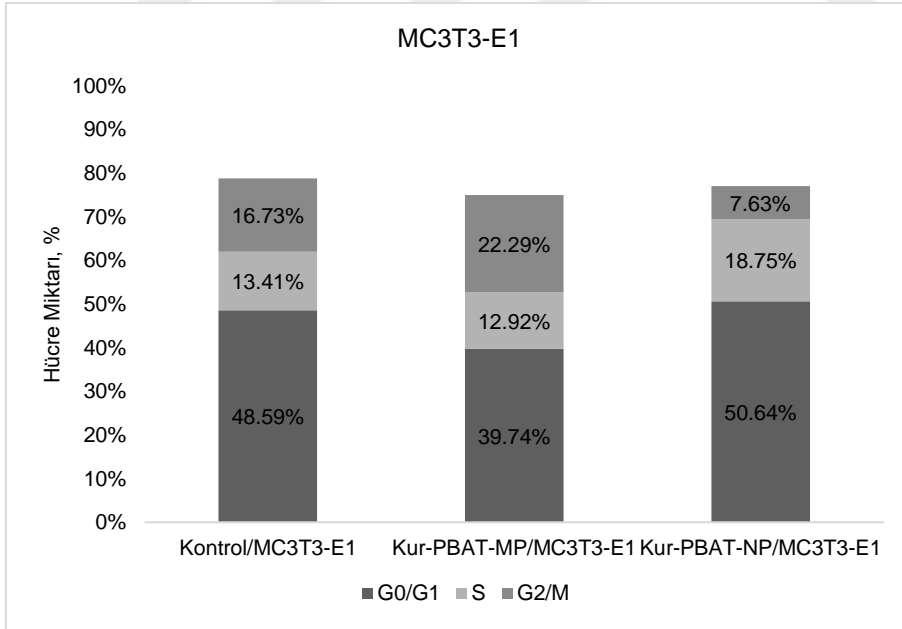
kontrol grubu olarak MG-63 seçilmiştir. MG-63 kontrol grubunda G0/G1 fazında % 26.33 oranında hücre bulunurken, kurkumin yüklü PBAT mikro ve nanopartiküllerde sırasıyla % 40.75 ve % 38.29 oranında hücre bulunmaktadır. Kurkumin yüklü PBAT mikro ve nanopartiküllerin G0/G1 fazında bulunan yüzde hücre sayılarının kontrol grubuna göre anlamlı miktarda fazla olduğu görülmektedir. Bu durum kurkumin yüklü PBAT mikro ve nanopartiküllerin, MG-63 hücrelerinde G0/G1 kontrol noktasına etki ederek S fazına giden MG-63 hücre sayısında azalmaya yol açtığını göstermektedir. Literatürde kurkuminin kanserli hücrelerin G0/G1 veya G2/M fazına etki ettiği bilinmektedir [157]. Kurkumin ile etkileştirilen insan osteosarkoma U2OS hücrelerinin akış sitometri analizinin gerçekleştirildiği bir çalışmada 12 saat sonunda G0/G1 fazında bulunan hücre miktarının kontrol grubuna göre anlamlı miktarda arttığı belirlenmiştir [158]. Kurkumin ile etkileştirilen HOS insan osteosarkoma hücrelerinin akış sitometri analizinde kurkuminin G0/G1 ve G2/M fazına etki ettiği rapor edilmiştir [159]. Akış sitometri analizi ile kurkuminin SK-MEL-37 insan melanoma hücreleri üzerindeki etkisinin incelendiği bir çalışmada 24 saat sonunda kurkuminin G0/G1 fazına etki ederek hücreleri inhibe ettiği rapor edilmiştir [160]. U266 omurilik kanseri hücreleri ile akış sitometri analizinin gerçekleştirildiği bir çalışmada kurkuminle etkileştirilmeyen grupta G0/G1 fazında bulunan hücre miktarının % 57 olduğu, kurkumin ile 24 saat süresince etkileştirilen hücrelerde ise G0/G1 fazında bulunan hücre miktarının % 70 olduğu görülmüştür [161]. İlgili literatürde bulunan çalışmalara göre kurkuminin osteosarkoma ve melanoma gibi hücrelerin G0/G1 fazına etki ettiği görülmektedir.

Kurkumin yüklü PBAT mikro ve nanopartiküllerin 24 saat MC3T3-E1 hücreleri ile etkileştirilmesinin ardından akış sitometri analizi ile elde edilen sonuçlara göre G0/G1, S ve G2/M fazlarında bulunan yüzde hücre miktarları Şekil 4.38'de görülmektedir. Kurkumin yüklü PBAT mikropartiküllerde G0/G1 fazındaki % hücre sayısının MC3T3-E1 kontrol grubuna kıyasla daha az olduğu görülmektedir. Bu durum, kurkuminin MC3T3-E1 preosteoblast hücrelerinde G1 fazında bulunan hücrelerde artışa neden olduğunu göstermektedir. Literatürde kurkumin ile etkileştirilen ROS, sıçan osteoblast hücrelerinin akış sitometre analizinde incelendiği bir çalışmaya göre 48 saatin sonunda G1 fazında bulunan hücrelerde bir miktar artış olduğu görülmüştür [154]. Kontrol grubu MC3T3-E1 hücreleri ile

kurkumin yüklü PBAT mikropartiküllerin S ve G2/M fazlarında bulunan hücre miktarlarında ise anlamlı bir farklılık bulunmamaktadır.



**Şekil 4.37.** Kurkumin yüklü PBAT mikro ve nanopartiküllerin akış sitometri analizi sonucu G0/G1, S ve G2/M fazlarında bulunan MG-63 hücrelerine ait yüzde hücre miktarları



**Şekil 4.38.** Kurkumin yüklü PBAT mikro ve nanopartiküllerin akış sitometri analizi sonucu G0/G1, S ve G2/M fazlarında bulunan MC3T3-E1 hücrelerine ait yüzde hücre miktarları.

## 5. GENEL SONUÇLAR

Sunulan tez çalışması kapsamında, PBAT mikro ve nanopartiküllerin sentezi ve karakterizasyonu gerçekleştirilerek ilaç salım sistemleri için kullanım potansiyelleri incelenmiştir. Bu amaçla doğal ve antikanserojen bir ilaç olan kurkuminin partiküllere yüklenmesi ve *in-vitro* salımı gerçekleştirilmiş ve partiküllerin iki farklı hücre hattı kullanılarak hücre kültür sistemlerindeki sitotoksik etkileri incelenmiştir. Çalışmalar kapsamında elde edilen önemli bulgular, aşağıda özetlenmiştir.

- PBAT mikro ve nanopartiküller emülsiyon hazırlama-çözücü buharlaştırma yöntemi ile elde edilmiştir. Elde edilen PBAT mikro ve nanopartiküllerin boy ve boy dağılımları ve morfolojik özellikleri dikkate alınarak SEM ve DLS analiz sonuçları ile en uygun morfolojideki partiküller seçilmiştir. Buna göre, en uygun morfoloji ve boy özelliklerine uygun olarak küresel formda ve düzgün morfolojide partiküllerin elde edildiği gruptan %1 PBAT, %1 PVA ile hazırlanan partiküller mikropartiküller; %1 PBAT, %1.5 DMAB ile hazırlanan partiküller ise nanopartikülleri temsil etmek üzere seçilmiştir.
- PBAT mikro ve nanopartiküllerin boy ve boy dağılımları SEM analizi ile sırasıyla  $1.05 \pm 0.53 \mu\text{m}$  ve  $0.38 \pm 0.18 \mu\text{m}$  olarak, DLS analizi ile  $1.32$  ve  $0.39 \mu\text{m}$  olarak belirlenmiştir. SEM ve DLS ile elde edilen boy ve boy dağılımı sonuçları uyumludur.
- PBAT mikro ve nanopartiküllere kurkumin yüklemesi gerçekleştirilmesi ile en yüksek kurkumin enkapsülasyon verimleri PBAT ve kurkuminin kütlece oranınının 10 kat olduğu durumda elde edilmiştir. Buna göre PBAT mikro ve nanopartiküllerin kurkumin enkapsülasyon verimleri sırasıyla  $\% 80 \pm 5$  ve  $\% 90 \pm 3$  olarak belirlenmiştir. Nanopartiküller ile mikropartiküllere kıyasla daha yüksek enkapsülasyon verimleri elde edilmiştir.
- Kurkumin yüklü olan ve olmayan PBAT mikro ve nanopartiküllerin karakterizasyon çalışmalarında FTIR, XRD ve TG-DTA gibi analizler ile kimyasal ve termal özellikleri ayrıntılı olarak belirlenmiştir. PBAT

mikro ve nanopartiküllere enkapsüle edilen kurkuminin yapıdaki varlığı kanıtlanmıştır. Nanopartiküllerin mikropartiküllere göre termal olarak daha farklı bir davranış gösterdiği görülmüştür.

- Kurkumin yüklü PBAT mikro ve nanopartiküllerden kurkuminin 22 günde sırasıyla %49 ve %73 oranında, uzun süreli salındığı belirlenmiştir. Mikropartiküller ile kurkumin salımının nanopartiküllere göre daha yavaş gerçekleştiği görülmüştür. Partiküllerin kurkumin salım kinetikleri incelendiğinde ise her iki tip partikülden kurkumin salımının Higuchi salım kinetik modeline uyduğu belirlenmiştir.
- Kurkumin yüklü PBAT mikro ve nanopartiküllerin hücre kültür sistemlerinde uygulanmasından önce kurkuminin inhibitör konsantrasyonu belirlenmiştir. Buna göre inhibitör konsantrasyon olarak belirlenen 17  $\mu\text{M}$  kurkumin derişiminin MG-63 hücreleri üzerinde % 50 hücre canlılığına neden olduğu ve aynı zamanda MC3T3-E1 hücrelerine toksik etki yapmadığı tespit edilmiştir. Kurkumin uygulamasında çözücü olarak kullanılan DMSO miktarları her iki hücre tipi için de toksik etkiye neden olmamıştır. Kurkumin yüklü PBAT nanopartiküllerin nano boyuttaki davranışlarının getirileri nedeniyle bu partiküller için ayrı bir inhibitör konsantrasyon değeri belirlenmiştir. Buna göre nanopartikül uygulaması için kurkumin inhibitör konsantrasyonu 6  $\mu\text{M}$  olarak bulunmuştur.
- Sitotoksisite testlerinde, kurkumin yüklü PBAT mikro ve nanopartiküllerin MG-63 hücrelerini inhibe ettiği MTT analizi ile belirlenmiş, optik mikroskop, floresan boyama ve canlı-ölü analizleri ile elde edilen görüntüler ile desteklenmiştir. İnhibitör değerin üzerinde kurkumin içeren partiküller hücreler üzerinde apoptotik etkiye neden olmuşlardır. Kurkumin yüklü olmayan partiküller MG-63 hücreleri üzerinde toksik etkiye neden olmamıştır.
- Kurkumin yüklü olan ve olmayan PBAT mikro ve nanopartiküllerin MC3T3-E1 hücrelerinde toksik etkiye neden olmadığı MTT analizi ile belirlenmiş, optik mikroskop, floresan boyama ve canlı-ölü analizleri ile elde edilen görüntüler ile desteklenmiştir.



- Kurkumin yüklü PBAT mikro ve nanopartiküllerin uygulandığı MG-63 osteosarkoma hücrelerinin akış sitometri analizinde, her iki partikülün de MG-63 hücrelerini G0/G1 fazında inhibe ettiği belirlenmiştir. Kurkumin yüklü PBAT mikro ve nanopartiküllerin uygulandığı MC3T3-E1 preosteoblast hücrelerinin akış sitometri sonuçlarında ise, mikropartikül uygulamasında G1 fazındaki hücre miktarının ve nanopartikül uygulamasında ise S fazındaki hücre miktarının arttığı görülmüştür.

MG-63 insan kemik kanseri hücrelerinin ve MC3T3-E1 fare kemik öncül hücrelerinin tek tabaka kültürleri üzerinde kurkumin yüklü olan ve olmayan PBAT mikro ve nanopartiküllerin sitotoksik etkileri incelenmiştir. Hücrelerin canlılığı ve üremesi MTT (3-[4,5-dimetiltiazol-2-il]-2,5-difeniltetrazolyum bromür) analiziyle ve hücre morfolojileri optik mikroskop ve floresan mikroskop görüntüleri ile takip edilmiştir. Partiküllerin MG-63 hücrelerini inhibe ettiği ve MC3T3-E1 hücreleri üzerinde sitotoksik bir etkiye neden olmadığı belirlenmiştir. Kurkuminin antikanserojen özelliğinin hücre döngüsündeki etkisi ise akış sitometre ile belirlenmiştir. Elde edilen sonuçlara göre kurkuminin MG-63 hücrelerini G0/G1 hücre döngü fazında inhibe ettiği ve MC3T3-E1 hücreleri üzerinde G1 ve S fazındaki hücre miktarlarının artması ile olumlu bir etki sağladığı belirlenmiştir.

## KAYNAKLAR

- [1] Uhrich, K.E., Cannizzaro, S.M., Langer, R.S., Shakesheff, K.M., Polymeric systems for controlled drug release, *Chemical Reviews*, 99, 3181-3198, **1999**.
- [2] Gümüşderelioğlu, M., Deniz, G., Sustained release of mitomycin-C from poly(DL-lactide)/poly(DL-lactide-co-glycolide) films, *Journal of Biomaterials Science, Polymer Edition*, 11, 1039-1050, **2000**.
- [3] Kopeček, J., Biomaterials and drug delivery: past, present, and future, *Molecular Pharmaceutics*, 7, 922-925, **2010**.
- [4] Couvreur, P., Nanoparticles in drug delivery: Past, present and future, *Advanced Drug Delivery Reviews*, 65, 21-23, **2013**.
- [5] 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**.
- [6] Xia, Y., Pack, D.W., Uniform biodegradable microparticle systems for controlled release, *Chemical Engineering Science*, 125, 129-143, **2015**.
- [7] Bikiaris, D.N., Nanocomposites of aliphatic polyesters: An overview of the effect of different nanofillers on enzymatic hydrolysis and biodegradation of polyesters, *Polymer Degradation and Stability*, 98, 1908-1928, **2013**.
- [8] Witt, U., Müller, R.-J., Deckwer, W.-D., New biodegradable polyester-copolymers from commodity chemicals with favorable use properties, *Journal of environmental polymer degradation*, 3, 215-223, **1995**.
- [9] Marten, E., Müller, R.-J., Deckwer, W.-D., Studies on the enzymatic hydrolysis of polyesters. II. Aliphatic–aromatic copolyesters, *Polymer degradation and stability*, 88, 371-381, **2005**.
- [10] Arslan, A., Çakmak, S., Cengiz, A., Gümüşderelioğlu, M., Poly (butylene adipate-co-terephthalate) scaffolds: processing, structural characteristics and cellular responses, *Journal of Biomaterials Science, Polymer Edition*, 1-38, **2016**.

- [11] Bansal, S.S., Goel, M., Aqil, F., Vadhanam, M.V., Gupta, R.C., Advanced drug-delivery systems of curcumin for cancer chemoprevention, *Cancer prevention research (Philadelphia, Pa.)*, 4, 1158-1171, **2011**.
- [12] Kotcherlakota, R., Barui, A.K., Prashar, S., Fajardo, M., Briones, D., Rodriguez-Dieguez, A., Patra, C.R., Gomez-Ruiz, S., Curcumin loaded mesoporous silica: an effective drug delivery system for cancer treatment, *Biomaterials Science*, 4, 448-459, **2016**.
- [13] Jain, K.K., Drug delivery systems - an overview, in *Drug Delivery Systems*, Jain, K.K., Editor. 2008, Humana Press: Totowa, NJ. p. 1-50.
- [14] Paolino, D., Sinha, P., Fresta, M., Ferrari, M., Drug delivery systems, in *Encyclopedia of Medical Devices and Instrumentation*. 2006, John Wiley & Sons, Inc.
- [15] Tiwari, G., Tiwari, R., Sriwastawa, B., Bhati, L., Pandey, S., Pandey, P., Bannerjee, S.K., Drug delivery systems: An updated review, *International Journal of Pharmaceutical Investigation*, 2, 2-11, **2012**.
- [16] Xu, X., Ho, W., Zhang, X., Bertrand, N., Farokhzad, O., Cancer nanomedicine: from targeted delivery to combination therapy, *Trends in Molecular Medicine*, 21, 223-232, **2015**.
- [17] Folkman, J., How the field of controlled-release technology began, and its central role in the development of angiogenesis research, *Biomaterials*, 11, 615-618, **1990**.
- [18] Bangham, A., Standish, M.M., Watkins, J., Diffusion of univalent ions across the lamellae of swollen phospholipids, *Journal of molecular biology*, 13, 238-IN27, **1965**.
- [19] Hoffman, A.S., The origins and evolution of "controlled" drug delivery systems, *Journal of Controlled Release*, 132, 153-163, **2008**.
- [20] Adler-Moore, J., Proffitt, R.T., AmBisome: liposomal formulation, structure, mechanism of action and pre-clinical experience, *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, 49, 21-30, **2002**.
- [21] Park, K., Controlled drug delivery systems: Past forward and future back, *Journal of Controlled Release*, 190, 3-8, **2014**.

- [22] Mantripragada, S., A lipid based depot (DepoFoam® technology) for sustained release drug delivery, *Progress in lipid research*, 41, 392-406, **2002**.
- [23] Liechty, W.B., Kryscio, D.R., Slaughter, B.V., Peppas, N.A., Polymers for drug delivery systems, *Annual review of chemical and biomolecular engineering*, 1, 149-173, **2010**.
- [24] Wong, P.T., Choi, S.K., Mechanisms of drug release in nanotherapeutic delivery systems, *Chemical Reviews*, 115, 3388-3432, **2015**.
- [25] Pushpamalar, J., Veeramachineni, A.K., Owh, C., Loh, X.J., Biodegradable polysaccharides for controlled drug delivery, *ChemPlusChem*, 81, 504-514, **2016**.
- [26] Coelho, J.F., Ferreira, P.C., Alves, P., Cordeiro, R., Fonseca, A.C., Góis, J.R., Gil, M.H., Drug delivery systems: Advanced technologies potentially applicable in personalized treatments, *The EPMA Journal*, 1, 164-209, **2010**.
- [27] Faisant, N., Siepmann, J., Benoit, J.P., PLGA-based microparticles: elucidation of mechanisms and a new, simple mathematical model quantifying drug release, *European Journal of Pharmaceutical Sciences*, 15, 355-366, **2002**.
- [28] Kumari, A., Yadav, S.K., Yadav, S.C., Biodegradable polymeric nanoparticles based drug delivery systems, *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*, 75, 1-18, **2010**.
- [29] Yeo, Y., Park, K., Control of encapsulation efficiency and initial burst in polymeric microparticle systems, *Archives of Pharmacal Research*, 27, 1-12, **2004**.
- [30] Huang, X., Brazel, C.S., On the importance and mechanisms of burst release in matrix-controlled drug delivery systems, *Journal of Controlled Release*, 73, 121-136, **2001**.
- [31] Hasan, A.S., Socha, M., Lamprecht, A., Ghazouani, F.E., Sapin, A., Hoffman, M., Maincent, P., Ubrich, N., Effect of the microencapsulation of nanoparticles on the reduction of burst release, *International Journal of Pharmaceutics*, 344, 53-61, **2007**.

- [32] Zanotto-Filho, A., Coradini, K., Braganhol, E., Schroder, R., de Oliveira, C.M., Simoes-Pires, A., Battastini, A.M., Pohlmann, A.R., Guterres, S.S., Forcelini, C.M., Beck, R.C., Moreira, J.C., Curcumin-loaded lipid-core nanocapsules as a strategy to improve pharmacological efficacy of curcumin in glioma treatment, *Eur J Pharm Biopharm*, 83, 156-67, **2013**.
- [33] Asghar, W., Islam, M., S.Wadajkar, A., Wan, Y., Ilyas, A., T. Nguyen, K., Iqbal, S.M., PLGA micro and nanoparticles loaded into gelatin scaffold for controlled drug release, *IEEE Transactions On Nanotechnology*, 11, 546-552, **2012**.
- [34] Brown, S.D., Nativo, P., Smith, J.-A., Stirling, D., Edwards, P.R., Venugopal, B., Flint, D.J., Plumb, J.A., Graham, D., Wheate, N.J., Gold nanoparticles for the improved anticancer drug delivery of the active component of oxaliplatin, *Journal of the American Chemical Society*, 132, 4678-4684, **2010**.
- [35] Wang, L., Su, W., Liu, Z., Zhou, M., Chen, S., Chen, Y., Lu, D., Liu, Y., Fan, Y., Zheng, Y., Han, Z., Kong, D., Wu, J.C., Xiang, R., Li, Z., CD44 antibody-targeted liposomal nanoparticles for molecular imaging and therapy of hepatocellular carcinoma, *Biomaterials*, 33, 5107-5114, **2012**.
- [36] Wang, M., Thanou, M., Targeting nanoparticles to cancer, *Pharmacol Res*, 62, 90-9, **2010**.
- [37] Hans, M.L., Lowman, A.M., Biodegradable nanoparticles for drug delivery and targeting, *Current Opinion in Solid State and Materials Science*, 6, 319-327, **2002**.
- [38] Zimmer, A., Kreuter, J., Microspheres and nanoparticles used in ocular delivery systems, *Advanced Drug Delivery Reviews*, 16, 61-73, **1995**.
- [39] Bramwell, V.W., Perrie, Y., Particulate Delivery Systems for Vaccines, in *Critical reviews in therapeutic drug carrier systems*, Sachdeva, M., Editor. 2005, Begel: New York. p. 151-214.
- [40] Couvreur, P., Puisieux, F., Nano- and microparticles for the delivery of polypeptides and proteins, *Advanced Drug Delivery Reviews*, 10, 141-162, **1993**.

- [41] Anselmo, A.C., Mitragotri, S., An overview of clinical and commercial impact of drug delivery systems, *Journal of Controlled Release*, 190, 15-28, **2014**.
- [42] Brannon-Peppas, L., Ghosn, B., Roy, K., Cornetta, K., Encapsulation of nucleic acids and opportunities for cancer treatment, *Pharmaceutical Research*, 24, 618-627, **2007**.
- [43] Varde, N.K., Elucidation of drug release mechanisms in PLGA microspheres. 2007: ProQuest.
- [44] Kim, K.K., Pack, D.W., Microspheres for drug delivery, in *BioMEMS and Biomedical Nanotechnology: Volume I Biological and Biomedical Nanotechnology*, Ferrari, M., Lee, A.P., Lee, L.J., Editors. 2006, Springer US: Boston, MA. p. 19-50.
- [45] Singh, M.N., Hemant, K.S.Y., Ram, M., Shivakumar, H.G., Microencapsulation: A promising technique for controlled drug delivery, *Research in Pharmaceutical Sciences*, 5, 65-77, **2010**.
- [46] Shi, J., Votruba, A.R., Farokhzad, O.C., Langer, R., Nanotechnology in drug delivery and tissue engineering: from discovery to applications, *Nano Letters*, 10, 3223-3230, **2010**.
- [47] Mudshinge, S.R., Deore, A.B., Patil, S., Bhalgat, C.M., Nanoparticles: Emerging carriers for drug delivery, *Saudi Pharmaceutical Journal*, 19, 129-141, **2011**.
- [48] Zhang, L., Gu, F., Chan, J., Wang, A., Langer, R., Farokhzad, O., Nanoparticles in medicine: therapeutic applications and developments, *Clinical pharmacology and therapeutics*, 83, 761-769, **2008**.
- [49] Desai, N., Challenges in development of nanoparticle-based therapeutics, *The AAPS Journal*, 14, 282-295, **2012**.
- [50] 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**.

- [51] Rose, J., Auffan, M., Proux, O., Niviere, V., Bottero, J.-Y., Physicochemical properties of nanoparticles in relation with toxicity, in *Encyclopedia of Nanotechnology*, Bhushan, B., Editor. 2012, Springer Netherlands: Dordrecht. p. 2085-2085.
- [52] Zolnik, B.S., González-Fernández, Á., Sadrieh, N., Dobrovolskaia, M.A., Nanoparticles and the immune system, *Endocrinology*, 151, 458-465, **2010**.
- [53] Wu, H.C., Chang, D.K., Peptide-mediated liposomal drug delivery system targeting tumor blood vessels in anticancer therapy, *J Oncol*, 2010, 723798, **2010**.
- [54] Gamucci, O., Bertero, A., Gagliardi, M., Bardi, G., Biomedical nanoparticles: overview of their surface immune-compatibility, *Coatings*, 4, 139-159, **2014**.
- [55] Felice, B., Prabhakaran, M.P., Rodriguez, A.P., Ramakrishna, S., Drug delivery vehicles on a nano-engineering perspective, *Mater Sci Eng C Mater Biol Appl*, 41, 178-95, **2014**.
- [56] Mahapatro, A., Singh, D.K., Biodegradable nanoparticles are excellent vehicle for site directed in-vivo delivery of drugs and vaccines, *Journal of Nanobiotechnology*, 9, 1-11, **2011**.
- [57] Nagavarma, B.V.N., Yadav, H.K.S., Ayaz, A., Vasudha, L.S., Shivakumar, H.G., Different techniques for preparation of polymeric nanoparticles- A review, *Asian Journal of Pharmaceutical and Clinical Research*, 5, 16-23, **2012**.
- [58] Desgouilles, S., Vauthier, C., Bazile, D., Vacus, J., Grossiord, J.-L., Veillard, M., Couvreur, P., The design of nanoparticles obtained by solvent evaporation: A comprehensive study, *Langmuir*, 19, 9504-9510, **2003**.
- [59] 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*, Percec, V., Editor. 2013, Springer International Publishing: Cham. p. 329-344.
- [60] Andreas, K., Zehbe, R., Kazubek, M., Grzeschik, K., Sternberg, N., Bäuml, H., Schubert, H., Sittlinger, M., Ringe, J., Biodegradable insulin-loaded PLGA microspheres fabricated by three different emulsification

techniques: Investigation for cartilage tissue engineering, *Acta Biomaterialia*, 7, 1485-1495, **2011**.

- [61] Staff, R.H., Schaeffel, D., Turshatov, A., Donadio, D., Butt, H.-J., Landfester, K., Koynov, K., Crespy, D., Particle formation in the emulsion-solvent evaporation process, *Small*, 9, 3514-3522, **2013**.
- [62] Zhang, Y., Ji, X., Mohapatra, R.N., A naturally light sterile neutrino in an asymmetric dark matter model, *Journal of High Energy Physics*, 2013, 1-19, **2013**.
- [63] Rambhia, K.J., Ma, P.X., Controlled drug release for tissue engineering, *Journal of Controlled Release*, 219, 119-128, **2015**.
- [64] 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**.
- [65] Neuse, E.W., Synthetic polymers as drug-delivery vehicles in medicine, *Metal-Based Drugs*, 2008, 469531, **2008**.
- [66] Tian, H., Tang, Z., Zhuang, X., Chen, X., Jing, X., Biodegradable synthetic polymers: Preparation, functionalization and biomedical application, *Progress in Polymer Science*, 37, 237-280, **2012**.
- [67] Lu, Y., Chen, S.C., Micro and nano-fabrication of biodegradable polymers for drug delivery, *Advanced Drug Delivery Reviews*, 56, 1621-1633, **2004**.
- [68] Cutright, D.E., Beasley, J.D., 3rd, Perez, B., Histologic comparison of polylactic and polyglycolic acid sutures, *Oral Surg Oral Med Oral Pathol*, 32, 165-73, **1971**.
- [69] Racey, G.L., 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, *J Oral Surg*, 36, 766-70, **1978**.
- [70] Sinha, V.R., Bansal, K., Kaushik, R., Kumria, R., Trehan, A., Poly- $\epsilon$ -caprolactone microspheres and nanospheres: an overview, *International Journal of Pharmaceutics*, 278, 1-23, **2004**.



- [71] Savarino, L., Baldini, N., Greco, M., Capitani, O., Pinna, S., Valentini, S., Lombardo, B., Esposito, M.T., Pastore, L., Ambrosio, L., Battista, S., Causa, F., Zeppetelli, S., Guarino, V., Netti, P.A., The performance of poly-epsilon-caprolactone scaffolds in a rabbit femur model with and without autologous stromal cells and BMP4, *Biomaterials*, 28, 3101-9, **2007**.
- [72] Wei, X., Gong, C., Gou, M., Fu, S., Guo, Q., Shi, S., Luo, F., Guo, G., Qiu, L., Qian, Z., Biodegradable poly(epsilon-caprolactone)-poly(ethylene glycol) copolymers as drug delivery system, *Int J Pharm*, 381, 1-18, **2009**.
- [73] Knop, K., Hoogenboom, R., Fischer, D., Schubert, U.S., Poly(ethylene glycol) in drug delivery: pros and cons as well as potential alternatives, *Angew Chem Int Ed Engl*, 49, 6288-308, **2010**.
- [74] Kamaly, N., Yameen, B., Wu, J., Farokhzad, O.C., Degradable controlled release polymers and polymeric nanoparticles: Mechanisms of controlling drug release, *Chemical Reviews*, 116, 2602-2663, **2016**.
- [75] Ivanova, E.P., Bazaka, K., Crawford, R.J., Natural polymer biomaterials: advanced applications-2, **2014**.
- [76] Miele, E., Spinelli, G.P., Miele, E., Tomao, F., Tomao, S., Albumin-bound formulation of paclitaxel (Abraxane®) ABI-007) in the treatment of breast cancer, *International Journal of Nanomedicine*, 4, 99-105, **2009**.
- [77] Elgadir, M.A., Uddin, M.S., Ferdosh, S., Adam, A., Chowdhury, A.J.K., Sarker, M.Z.I., 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**.
- [78] Dosio, F., Arpicco, S., Brusa, P., Stella, B., Cattel, L., Poly(ethylene glycol)-human serum albumin-paclitaxel conjugates: preparation, characterization and pharmacokinetics, *Journal of Controlled Release*, 76, 107-117, **2001**.
- [79] Shoichet, M.S., Li, R.H., White, M.L., Winn, S.R., Stability of hydrogels used in cell encapsulation: An in vitro comparison of alginate and agarose, *Biotechnology and bioengineering*, 50, 374-381, **1996**.
- [80] Müller, R.-J., Kleeberg, I., Deckwer, W.-D., Biodegradation of polyesters containing aromatic constituents, *Journal of Biotechnology*, 86, 87-95, **2001**.

- [81] Müller, R.J., Witt, U., Rantze, E., Deckwer, W.D., Architecture of biodegradable copolyesters containing aromatic constituents, *Polymer Degradation and Stability*, 59, 203-208, **1998**.
- [82] Kleeberg, I., Hetz, C., Kroppenstedt, R.M., Müller, R.-J., Deckwer, W.-D., Biodegradation of aliphatic-aromatic copolyesters by *Thermomonospora fusca* and other thermophilic compost isolates, *Applied and environmental microbiology*, 64, 1731-1735, **1998**.
- [83] Fukushima, K., Rasyida, A., Yang, M.-C., Characterization, degradation and biocompatibility of PBAT based nanocomposites, *Applied Clay Science*, 80, 291-298, **2013**.
- [84] Brunner, C.T., Baran, E.T., Pinho, E.D., Reis, R.L., Neves, N.M., Performance of biodegradable microcapsules of poly(butylene succinate), poly(butylene succinate-co-adipate) and poly(butylene terephthalate-co-adipate) as drug encapsulation systems, *Colloids Surf B Biointerfaces*, 84, 498-507, **2011**.
- [85] Stloukal, P., Sedlarik, V., Husarova, L., Kasparkova, V., Koutny, M., Mladenov, V., Psarris, K., Mastorakis, N., Caballero, A., Vachtsevanos, G. *Preparation of submicroparticles based on biodegradable co-polyester*. in *International Conference on Development, Energy, Environment, Economics*. 2010. WSEAS Press.
- [86] Niaounakis, M., *Biopolymers: processing and products*. 2014: William Andrew.
- [87] Chieng, B.W., Ibrahim, N.A., Wan Yunus, W., Effect of organo-modified montmorillonite on poly (butylene succinate)/poly (butylene adipate-co-terephthalate) nanocomposites, *Express Polym Lett*, 4, 404-414, **2010**.
- [88] Ecoflex F Blend C1200 Product Information, *BASF Chemical Company*,
- [89] Siegenthaler, K.O., Künkel, A., Skupin, G., Yamamoto, M., Ecoflex® and Ecovio®: Biodegradable, performance-enabling plastics, in *Synthetic Biodegradable Polymers*, Rieger, B., Künkel, A., Coates, W.G., Reichardt, R., Dinjus, E.Zevaco, A.T., Editors. 2012, Springer Berlin Heidelberg: Berlin, Heidelberg. p. 91-136.
- [90] Witt, U., Müller, R.J., Deckwer, W.D., Studies on sequence distribution of aliphatic/aromatic copolyesters by high - resolution <sup>13</sup>C nuclear magnetic

resonance spectroscopy for evaluation of biodegradability, *Macromolecular Chemistry and Physics*, 197, 1525-1535, **1996**.

- [91] Fukushima, K., Wu, M.-H., Bocchini, S., Rasyida, A., Yang, M.-C., PBAT based nanocomposites for medical and industrial applications, *Materials Science and Engineering: C*, 32, 1331-1351, **2012**.
- [92] Jao, W.C., Lin, C.H., Hsieh, J.Y., Yeh, Y.H., Liu, C.Y., Yang, M.C., Effect of immobilization of polysaccharides on the biocompatibility of poly (butyleneadipate - co - terephthalate) films, *Polymers for Advanced Technologies*, 21, 543-553, **2010**.
- [93] Rodrigues, B.V., Silva, A.S., Melo, G.F., Vasconcellos, L.M., Marciano, F.R., Lobo, A.O., Influence of low contents of superhydrophilic MWCNT on the properties and cell viability of electrospun poly (butylene adipate-co-terephthalate) fibers, *Materials Science and Engineering: C*, 59, 782-791, **2016**.
- [94] Neto, W.A.R., de Paula, A.C.C., Martins, T.M., Goes, A.M., Averous, L., Schlatter, G., Bretas, R.E.S., Poly (butylene adipate-co-terephthalate)/hydroxyapatite composite structures for bone tissue recovery, *Polymer Degradation and Stability*, 120, 61-69, **2015**.
- [95] Oliveira, J.T., Correlo, V.M., Sol, P.C., Costa-Pinto, A.R., Malafaya, P.B., Salgado, A.J., Bhattacharya, M., Charbord, P., Neves, N.M., Reis, R.L., Assessment of the suitability of chitosan/polybutylene succinate scaffolds seeded with mouse mesenchymal progenitor cells for a cartilage tissue engineering approach, *Tissue Engineering Part A*, 14, 1651-1661, **2008**.
- [96] Fu, Y., Kao, W.J., Drug release kinetics and transport mechanisms of non-degradable and degradable polymeric delivery systems, *Expert opinion on drug delivery*, 7, 429-444, **2010**.
- [97] Witt, U., Einig, T., Yamamoto, M., Kleeberg, I., Deckwer, W.-D., Müller, R.-J., Biodegradation of aliphatic–aromatic copolyesters: evaluation of the final biodegradability and ecotoxicological impact of degradation intermediates, *Chemosphere*, 44, 289-299, **2001**.
- [98] Herrera, R., Franco, L., Rodríguez - Galán, A., Puiggali, J., Characterization and degradation behavior of poly (butylene adipate - co - terephthalate) s, *Journal of Polymer Science Part A: Polymer Chemistry*, 40, 4141-4157, **2002**.

- [99] Aggarwal, B.B., Sundaram, C., Malani, N., Ichikawa, H., Curcumin: the Indian solid gold, in *The molecular targets and therapeutic uses of curcumin in health and disease*. 2007, Springer. p. 1-75.
- [100] Goel, A., Kunnumakkara, A.B., Aggarwal, B.B., Curcumin as "Curecumin": from kitchen to clinic, *Biochem Pharmacol*, 75, 787-809, **2008**.
- [101] Aggarwal, B.B., Kumar, A., Bharti, A.C., Anticancer potential of curcumin: preclinical and clinical studies, *Anticancer Res*, 23, 363-98, **2003**.
- [102] Shen, L., Ji, H.-F., Theoretical study on physicochemical properties of curcumin, *Spectrochimica Acta Part A: Molecular and Biomolecular Spectroscopy*, 67, 619-623, **2007**.
- [103] Li, B., Konecke, S., Wegiel, L.A., Taylor, L.S., Edgar, K.J., Both solubility and chemical stability of curcumin are enhanced by solid dispersion in cellulose derivative matrices, *Carbohydrate polymers*, 98, 1108-1116, **2013**.
- [104] Wang, Y.-J., Pan, M.-H., Cheng, A.-L., Lin, L.-I., Ho, Y.-S., Hsieh, C.-Y., Lin, J.-K., Stability of curcumin in buffer solutions and characterization of its degradation products, *Journal of pharmaceutical and biomedical analysis*, 15, 1867-1876, **1997**.
- [105] Pari, L., Murugan, P., Tetrahydrocurcumin prevents brain lipid peroxidation in streptozotocin-induced diabetic rats, *Journal of medicinal food*, 10, 323-329, **2007**.
- [106] Murugan, P., Pari, L., Antioxidant effect of tetrahydrocurcumin in streptozotocin–nicotinamide induced diabetic rats, *Life sciences*, 79, 1720-1728, **2006**.
- [107] Somparn, P., Phisalaphong, C., Nakornchai, S., Unchern, S., Morales, N.P., Comparative antioxidant activities of curcumin and its demethoxy and hydrogenated derivatives, *Biological and Pharmaceutical Bulletin*, 30, 74-78, **2007**.
- [108] Tomren, M., Masson, M., Loftsson, T., Tønnesen, H.H., Studies on curcumin and curcuminoids: XXXI. Symmetric and asymmetric curcuminoids: stability, activity and complexation with cyclodextrin, *International journal of pharmaceutics*, 338, 27-34, **2007**.

- [109] Cheng, A.-L., Hsu, C.-H., Lin, J.-K., Hsu, M.-M., Ho, Y.-F., Shen, T.-S., Ko, J.-Y., Lin, J.-T., Lin, B.-R., Ming-Shiang, W., Phase I clinical trial of curcumin, a chemopreventive agent, in patients with high-risk or pre-malignant lesions, *Anticancer Res*, 21, 2895-2900, **2001**.
- [110] Garcea, G., Berry, D.P., Jones, D.J., Singh, R., Dennison, A.R., Farmer, P.B., Sharma, R.A., Steward, W.P., Gescher, A.J., Consumption of the putative chemopreventive agent curcumin by cancer patients: assessment of curcumin levels in the colorectum and their pharmacodynamic consequences, *Cancer Epidemiology Biomarkers & Prevention*, 14, 120-125, **2005**.
- [111] Sun, A., Shoji, M., Lu, Y.J., Liotta, D.C., Snyder, J.P., Synthesis of EF24-tripeptide chloromethyl ketone: a novel curcumin-related anticancer drug delivery system, *Journal of medicinal chemistry*, 49, 3153-3158, **2006**.
- [112] Bisht, S., Feldmann, G., Soni, S., Ravi, R., Karikar, C., Maitra, A., Maitra, A., Polymeric nanoparticle-encapsulated curcumin ("nanocurcumin"): a novel strategy for human cancer therapy, *Journal of nanobiotechnology*, 5, 1, **2007**.
- [113] Kurzrock, R., Li, L. *Liposome-encapsulated curcumin: in vitro and in vivo effects on proliferation, apoptosis, signaling, and angiogenesis*. in *ASCO Annual Meeting Proceedings*. 2005.
- [114] Nair, K.L., Thulasidasan, A.K., Deepa, G., Anto, R.J., Kumar, G.S., Purely aqueous PLGA nanoparticulate formulations of curcumin exhibit enhanced anticancer activity with dependence on the combination of the carrier, *Int J Pharm*, 425, 44-52, **2012**.
- [115] Duan, J., Zhang, Y., Han, S., Chen, Y., Li, B., Liao, M., Chen, W., Deng, X., Zhao, J., Huang, B., Synthesis and in vitro/in vivo anti-cancer evaluation of curcumin-loaded chitosan/poly (butyl cyanoacrylate) nanoparticles, *International journal of pharmaceuticals*, 400, 211-220, **2010**.
- [116] Yallapu, M.M., Gupta, B.K., Jaggi, M., Chauhan, S.C., Fabrication of curcumin encapsulated PLGA nanoparticles for improved therapeutic effects in metastatic cancer cells, *Journal of colloid and interface science*, 351, 19-29, **2010**.
- [117] Chang, R., Sun, L., Webster, T.J., Selective inhibition of MG-63 osteosarcoma cell proliferation induced by curcumin-loaded self-assembled

arginine-rich-RGD nanospheres, *International Journal of Nanomedicine*, 10, 3351-3365, **2015**.

- [118] Anitha, A., Maya, S., Deepa, N., Chennazhi, K.P., Nair, S.V., Jayakumar, R., Curcumin-loaded N,O-carboxymethyl chitosan nanoparticles for cancer drug delivery, *Journal of Biomaterials Science, Polymer Edition*, 23, 1381-1400, **2012**.
- [119] Shahani, K., Swaminathan, S.K., Freeman, D., Blum, A., Ma, L., Panyam, J., Injectable sustained release microparticles of curcumin: A new concept for cancer chemoprevention, *Cancer research*, 70, 4443-4452, **2010**.
- [120] Chen, Y., Lin, J., Fei, Y., Wang, H., Gao, W., Preparation and characterization of electrospinning PLA/curcumin composite membranes, *Fibers and Polymers*, 11, 1128-1131, **2010**.
- [121] Khalil, N.M., Nascimento, T.C.F.d., Casa, D.M., Dalmolin, L.F., Mattos, A.C.d., Hoss, I., Romano, M.A., Mainardes, R.M., Pharmacokinetics of curcumin-loaded PLGA and PLGA-PEG blend nanoparticles after oral administration in rats, *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*, 101, 353-360, **2013**.
- [122] Kasinathan, N., Amirthalingam, M., Reddy, N.D., Jagani, H.V., Volety, S.M., Rao, J.V., In-situ implant containing PCL-curcumin nanoparticles developed using design of experiments, *Drug Delivery*, 23, 1007-1015, **2016**.
- [123] Shehzad, A., Lee, J., Lee, Y.S., Curcumin in various cancers, *BioFactors*, 39, 56-68, **2013**.
- [124] Chan, W.-H., Wu, H.-Y., Chang, W.H., Dosage effects of curcumin on cell death types in a human osteoblast cell line, *Food and Chemical Toxicology*, 44, 1362-1371, **2006**.
- [125] Campbell, N.A., Reece, J.B., Biyoloji, ed. Gündüz, E., Demirsoy, A.Gürkan, İ. 2006, Ankara: Palme Yayıncılık. 1247.
- [126] Sa, G., Das, T., Anti cancer effects of curcumin: cycle of life and death, *Cell Division*, 3, 14-14, **2008**.
- [127] Sa, G., Das, T., Anti cancer effects of curcumin: cycle of life and death, *Cell Division*, 3, 14, **2008**.

- [128] Choi, B.H., Kim, C.G., Lim, Y., Shin, S.Y., Lee, Y.H., Curcumin down-regulates the multidrug-resistance *mdr1b* gene by inhibiting the PI3K/Akt/NF kappa B pathway, *Cancer Letters*, 259, 111-118, **2008**.
- [129] López-Lázaro, M., Anticancer and carcinogenic properties of curcumin: Considerations for its clinical development as a cancer chemopreventive and chemotherapeutic agent, *Molecular Nutrition & Food Research*, 52, S103-S127, **2008**.
- [130] Tıǧlı Aydın, R.S., Kaynak, G., Gümüşderelioǧlu, M., Salinomycin encapsulated nanoparticles as a targeting vehicle for glioblastoma cells, *Journal of Biomedical Materials Research Part A*, 104, 455-464, **2016**.
- [131] Brunner, C.T., Baran, E.T., Pinho, E.D., Reis, R.L., Neves, N.M., Performance of biodegradable microcapsules of poly(butylene succinate), poly(butylene succinate-co-adipate) and poly(butylene terephthalate-co-adipate) as drug encapsulation systems, *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*, 84, 498-507, **2011**.
- [132] Altındal, D.Ç., Gümüşderelioǧlu, M., Melatonin releasing PLGA micro/nanoparticles and their effect on osteosarcoma cells, *Journal of Microencapsulation*, 33, 53-63, **2016**.
- [133] Kutlu, C., Çakmak, A.S., Gümüşderelioǧlu, M., Double-effective chitosan scaffold-PLGA nanoparticle system for brain tumour therapy: in vitro study, *Journal of Microencapsulation*, 31, 700-707, **2014**.
- [134] 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**.
- [135] Weng, Y.-X., Jin, Y.-J., Meng, Q.-Y., Wang, L., Zhang, M., Wang, Y.-Z., Biodegradation behavior of poly(butylene adipate-co-terephthalate) (PBAT), poly(lactic acid) (PLA), and their blend under soil conditions, *Polymer Testing*, 32, 918-926, **2013**.
- [136] Madhusudana Rao, K., Krishna Rao, K.S.V., Ramanjaneyulu, G., Ha, C.-S., Curcumin encapsulated pH sensitive gelatin based interpenetrating polymeric network nanogels for anti cancer drug delivery, *International Journal of Pharmaceutics*, 478, 788-795, **2015**.

- [137] Anitha, A., Deepagan, V.G., Divya Rani, V.V., Menon, D., Nair, S.V., Jayakumar, R., Preparation, characterization, in vitro drug release and biological studies of curcumin loaded dextran sulphate–chitosan nanoparticles, *Carbohydrate Polymers*, 84, 1158-1164, **2011**.
- [138] Mohanty, C., Sahoo, S.K., The in vitro stability and in vivo pharmacokinetics of curcumin prepared as an aqueous nanoparticulate formulation, *Biomaterials*, 31, 6597-6611, **2010**.
- [139] Gou, M., Men, K., Shi, H., Xiang, M., Zhang, J., Song, J., Long, J., Wan, Y., Luo, F., Zhao, X., Qian, Z., Curcumin-loaded biodegradable polymeric micelles for colon cancer therapy in vitro and in vivo, *Nanoscale*, 3, 1558-1567, **2011**.
- [140] Arruda, L.C., Magaton, M., Bretas, R.E.S., Ueki, M.M., Influence of chain extender on mechanical, thermal and morphological properties of blown films of PLA/PBAT blends, *Polymer Testing*, 43, 27-37, **2015**.
- [141] Song, Z., Zhu, W., Yang, F., Liu, N., Feng, R., Preparation, characterization, in vitro release, and pharmacokinetic studies of curcumin-loaded mPEG–PVL nanoparticles, *Polymer Bulletin*, 72, 75-91, **2015**.
- [142] Lee, L.Y., Smith, K.A., Wang, C.-H., Fabrication of micro and nanoparticles of paclitaxel-loaded poly L lactide for controlled release using supercritical antisolvent method: effects of thermodynamics and hydrodynamics, **2006**.
- [143] Zhang, Z., Feng, S.-S., The drug encapsulation efficiency, in vitro drug release, cellular uptake and cytotoxicity of paclitaxel-loaded poly(lactide)–tocopheryl polyethylene glycol succinate nanoparticles, *Biomaterials*, 27, 4025-4033, **2006**.
- [144] Chereddy, K.K., Coco, R., Memvanga, P.B., Ucakar, B., des Rieux, A., Vandermeulen, G., Preat, V., Combined effect of PLGA and curcumin on wound healing activity, *J Control Release*, 171, 208-15, **2013**.
- [145] Shahani, K., Panyam, J., Highly loaded, sustained-release microparticles of curcumin for chemoprevention, *J Pharm Sci*, 100, 2599-609, **2011**.
- [146] Liu, J., Xu, L., Liu, C., Zhang, D., Wang, S., Deng, Z., Lou, W., Xu, H., Bai, Q., Ma, J., Preparation and characterization of cationic curcumin nanoparticles for improvement of cellular uptake, *Carbohydrate Polymers*, 90, 16-22, **2012**.



- [147] Feng, R., Song, Z., Zhai, G., Preparation and in vivo pharmacokinetics of curcumin-loaded PCL-PEG-PCL triblock copolymeric nanoparticles, *Int J Nanomedicine*, 7, 4089-98, **2012**.
- [148] Walters, D.K., Muff, R., Langsam, B., Born, W., Fuchs, B., Cytotoxic effects of curcumin on osteosarcoma cell lines, *Investigational new drugs*, 26, 289-297, **2008**.
- [149] Li, Y., Zhang, J., Ma, D., Zhang, L., Si, M., Yin, H., Li, J., Curcumin inhibits proliferation and invasion of osteosarcoma cells through inactivation of Notch - 1 signaling, *FEBS Journal*, 279, 2247-2259, **2012**.
- [150] Moran, J.M., Roncero-Martin, R., Rodriguez-Velasco, F.J., Calderon-Garcia, J.F., Rey-Sanchez, P., Vera, V., Canal-Macias, M.L., Pedrera-Zamorano, J.D., Effects of curcumin on the proliferation and mineralization of human osteoblast-like cells: Implications of nitric oxide, *International Journal of Molecular Sciences*, 13, 16104-16118, **2012**.
- [151] Dhule, S.S., Penfornis, P., He, J., Harris, M.R., Terry, T., John, V., Pochampally, R., The combined effect of encapsulating curcumin and C6 ceramide in liposomal nanoparticles against osteosarcoma, *Mol Pharm*, 11, 417-27, **2014**.
- [152] Kim, S.J., Son, T.G., Park, H.R., Park, M., Kim, M.-S., Kim, H.S., Chung, H.Y., Mattson, M.P., Lee, J., Curcumin stimulates proliferation of embryonic neural progenitor cells and neurogenesis in the adult hippocampus, *The Journal of Biological Chemistry*, 283, 14497-14505, **2008**.
- [153] Chang, R., Sun, L., Webster, T.J., Short communication: selective cytotoxicity of curcumin on osteosarcoma cells compared to healthy osteoblasts, *International Journal of Nanomedicine*, 9, 461-465, **2014**.
- [154] Notoya, M., Nishimura, H., Woo, J.-T., Nagai, K., Ishihara, Y., Hagiwara, H., Curcumin inhibits the proliferation and mineralization of cultured osteoblasts, *European Journal of Pharmacology*, 534, 55-62, **2006**.
- [155] Malinin, T.I., Perry, V.P., Toxicity of dimethyl sulfoxide on HeLa cells, *Cryobiology*, 4, 90-96, **1967**.

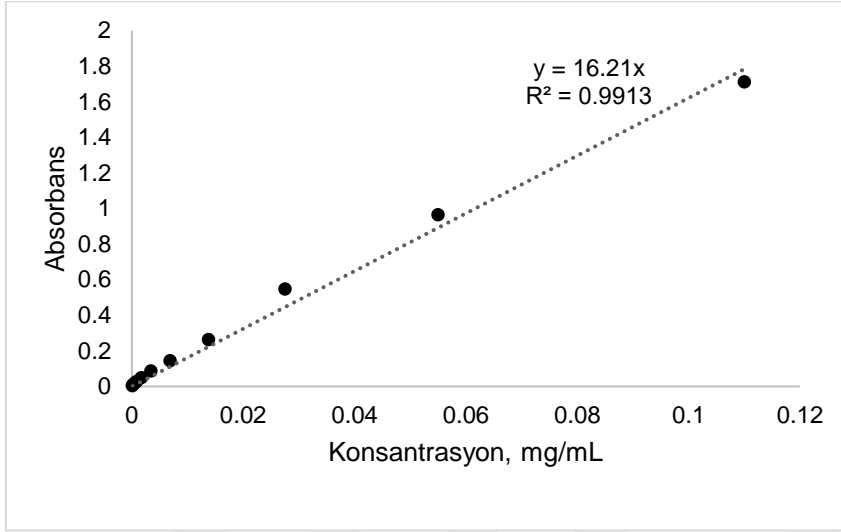
- [156] Chakravarty, S., Maitra, S., Reddy, R.G., Das, T., Jhelum, P., Kootar, S., Rajan, W.D., Samanta, A., Samineni, R., Pabbaraja, S., A novel natural product inspired scaffold with robust neurotrophic, neurogenic and neuroprotective action, *Scientific reports*, 5, **2015**.
- [157] Park, W., Amin, A.R., Chen, Z.G., Shin, D.M., New perspectives of curcumin in cancer prevention, *Cancer prevention research*, 6, 387-400, **2013**.
- [158] Jin, S., Xu, H.g., Shen, J.n., Chen, X.w., Wang, H., Zhou, J.g., Apoptotic effects of curcumin on human osteosarcoma U2OS cells, *Orthopaedic surgery*, 1, 144-152, **2009**.
- [159] Lee, D.S., Lee, M.K., Kim, J.H., Curcumin induces cell cycle arrest and apoptosis in human osteosarcoma (HOS) cells, *Anticancer research*, 29, 5039-5044, **2009**.
- [160] Carneiro, M.L.B., Porfírio, E.P., Otake, A.H., Chammas, R., Bão, S.N., Guillo, L.A., Morphological alterations and G0/G1 cell cycle arrest induced by curcumin in human SK-MEL-37 melanoma cells, *Brazilian Archives of Biology and Technology*, 53, 343-352, **2010**.
- [161] Bharti, A.C., Donato, N., Singh, S., Aggarwal, B.B., Curcumin (diferuloylmethane) down-regulates the constitutive activation of nuclear factor- $\kappa$ B and I $\kappa$ B $\alpha$  kinase in human multiple myeloma cells, leading to suppression of proliferation and induction of apoptosis, *Blood*, 101, 1053-1062, **2003**.

## EKLER

### EK-1

#### Kurkumin enkapsülasyon veriminin belirlenmesinde kullanılan etanol-kurkumin kalibrasyon grafiği

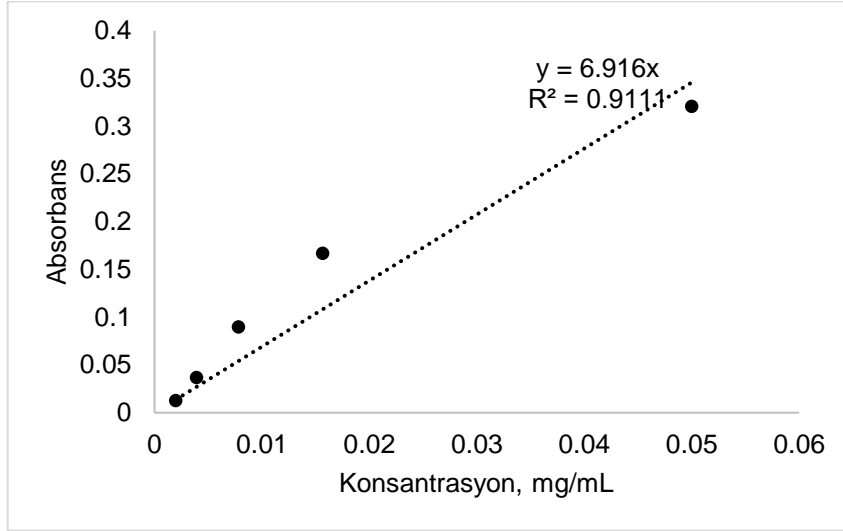
Bölüm 3.4'te kurkuminin enkapsülasyon veriminin belirlenmesinde kullanılan etanol-kurkumin kalibrasyon grafiği aşağıda gösterilmiştir.



## EK-2

### ***İn-vitro* salım çalışması için salınan kurkumin miktarının belirlenmesinde kullanılan PBS-Etanol, (1:1, v:v)-kurkumin kalibrasyon grafiği**

Bölüm 3.5'te *in-vitro* salım çalışmasında salınan kurkumin miktarının belirlenmesinde kullanılan PBS-etanol(1:1, v:v)-kurkumin kalibrasyon grafiği aşağıda gösterilmiştir.



## ÖZGEÇMİŞ

### Kimlik Bilgileri

Adı Soyadı : Ebru TAMAHKAR  
Doğum Yeri : EDİRNE  
Medeni Hali : Bekar  
E-posta : tamahkar.ebru@gmail.com  
Adresi : Fatih Mah. Ümranakkan Cad. No.22 D:4, EDİRNE

### Eğitim

Lise : Edirne Anadolu Lisesi (2010)  
Lisans : Gazi Üniversitesi Kimya Mühendisliği Bölümü (2014)  
Yüksek Lisans : Hacettepe Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Kimya Mühendisliği Ana Bilim Dalı

### Yabancı Dil ve Düzeyi

İngilizce (ileri), Almanca (başlangıç).

### İş Deneyimi

-

### Deneyim Alanları

- İlaç salım sistemleri
- Biyobozunur polimerler
- Nanopartiküller

### Tezden Üretilmiş Projeler ve Bütçesi

- Hacettepe Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projesi, Proje Kodu: FHD-2016-11953, "Poli(bütülenadipat-ko-tereftalat) (PBAT) Mikro Ve Nanopartiküller: Sentez, Karakterizasyon ve Kurkumin Salım Kinetiğinin İncelenmesi"– 21,459 TL

## Tezden Üretilmiş Yayınlar

-

## Tezden Üretilmiş Tebliğ ve/veya Poster Sunumu ile Katıldığı Toplantılar

**Tamahkar, E.**, Bektaş, Ş., Gümüşderelioğlu, M. Poli(bütülenadipat-ko-tereftalat) (PBAT) Mikro ve Nanopartiküllerin İlaç Salım Sistemleri için Değerlendirilmesi. 12. Ulusal Kimya Mühendisliği Kongresi, 23-26 Ağustos 2016, İzmir, Türkiye, (Sözlü Bildiri).

## Diğer Sunumlar

**Tamahkar E.**, Dilsiz N., Nanoteknolojide Doku Mühendisliği Uygulamaları. 1. Ulusal Kimya Mühendisliği Öğrenci Kongresi, 12-14 Mayıs 2011, Çorum, Türkiye, (Poster sunumu)

**Tamahkar, E.**, Erdoğan, S. Poli(metil metakrilat) (PMMA) Polimerizasyonunda Kesikli Polimer Reaktörünün PID ile Sıcaklık Kontrolü. 11. Ulusal Kimya Mühendisliği Kongresi, 2-5 Eylül 2014, Eskişehir, Türkiye, (Poster sunumu).