

**T.C.**  
**UŞAK ÜNİVERSİTESİ**  
**FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ**

**MOLEKÜLER BİYOLOJİ VE GENETİK ANA BİLİM DALI**

**HİDROKSİAPATİT NANOMOLEKÜLLERİNE TUTTURULMUŞ TIBBİ BİTKİ**  
**EKSTRATLARINDAN ELDE EDİLEN ALKALOİDLERİN**  
**KARAKTERİZASYON VE BİYOAKTİVİTE ÇALIŞMALARI**

**YÜKSEK LİSANS TEZİ**

**HAVA KÖLEMEK**

**TEMMUZ 2018**

**UŞAK**

**T.C.**  
**UŞAK ÜNİVERSİTESİ**  
**FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜŐÜ**

**MOLEKÜLER BİYOLOJİ VE GENETİK ANA BİLİM DALI**

**HİDROKSİAPATİT NANOMOLEKÜLLERİNE TUTTURULMUŞ TIBBİ BİTKİ**  
**EKSTRATLARINDAN ELDE EDİLEN ALKALOİDLERİN**  
**KARAKTERİZASYON VE BİYOAKTİVİTE ÇALIŞMALARI**

**YÜKSEK LİSANS TEZİ**

**HAVA KÖLEMEK**

**UŞAK 2018**

## Kabul ve Onay Sayfası

Hava KÖLEMEK tarafından hazırlanan “Hidroksiapatit Nanomoleküllerine Tutturulmuş Tıbbi Bitki Ekstratlarından Elde Edilen Alkaloidlerin Karakterizasyon Ve Biyoaktivite Çalışmaları” adlı bu tezin Yüksek Lisans Tezi olarak uygun olduğunu onaylarım.

Prof. Dr. Safiye Elif KORCAN

(Tez Danışmanı, Mikrobiyoloji /Uşak Üniversitesi )

Bu çalışma, jürimiz tarafından oy birliği / oy çokluğu ile Moleküler Biyoloji ve Genetik Anabilim Dalında Yüksek Lisans Tezi olarak kabul edilmiştir.

Prof.Dr.İbrahim Hakkı CİĞERCİ .....

(Moleküler Biyoloji ve Genetik, Afyon Kocatepe Üniversitesi)

Prof. Dr. Safiye Elif KORCAN .....

(Mikrobiyoloji /Uşak Üniversitesi)

Doç.Dr. Recep LİMAN .....

(Moleküler Biyoloji ve Genetik, Uşak Üniversitesi)

Dr. Öğretim Üyesi İbrahim BULDUK .....

(Kimya, Uşak Üniversitesi)

Dr.Öğretim Üyesi Funda KARABAĞ ÇOBAN .....

(Moleküler Biyoloji ve Genetik, Uşak Üniversitesi)

Tarih: ...../...../.....

Bu tez ile Uşak Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Yönetim Kurulu Yüksek Lisans derecesini onamıştır.

Prof.Dr. İsa YEŞİLYURT .....

Fen Bilimleri Enstitüsü Müdürü

## TEZ BİLDİRİMİ

Tez içindeki bütün bilgilerin etik davranış ve akademik kurallar çerçevesinde elde edilerek sunulduğunu, ayrıca tez yazım kurallarına uygun olarak hazırlanan bu çalışmada bana ait olmayan her türlü ifade ve bilginin kaynağına eksiksiz atıf yapıldığını bildiririm.

(İmza)

Hava KÖLEMEK

**HİDROKSİAPATİT NANOMOLEKÜLLERİNE TUTTURULMUŞ TIBBİ BİTKİ  
EKSTRATLARINDAN ELDE EDİLEN ALKALOİDLERİN  
KARAKTERİZASYON VE BİYOAKTİVİTE ÇALIŞMALARI**

**(Yüksek Lisans Tezi)**

**Hava KÖLEMEK**

**UŞAK ÜNİVERSİTESİ**

**FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ**

**Temmuz 2018**

**ÖZET**

Son yıllarda kontrollü ilaç salım sistemleri önem kazanmış bunlar arasında nanopartiküller sistemler ön plana çıkmıştır. Bu nedenle nanopartikül hazırlama ve karakterizasyon teknikleri önem taşımaktadır. Hidroksiapatit (HA), gözenekli yapısı, yüksek doku uyumluluğu ve yüksek adsorpsiyon özellikleri nedeniyle kontrollü ilaç salımında kullanılmaktadır. Çalışmada morfin ve noskapin içeren haşhaş kapsüllerinden konsantre morfin ve noskapin elde edilmiş morfinin fazla alımına bağlı gözlemlenen yan etkiler ve noskapin sirkülasyon süresini artırmak için hidroksiapatit nanopartiküllerine hapsedilmiştir. Çalışmada aynı zamanda haşhaş kapsülünün antioksidan aktivite çalışmaları yapılmış olup kaydadeğer antioksidan özellik belirlenmemiştir. Sentezlediğimiz boş, morfin ve noskapin yüklü HA (HA+M; HA+N) nanopartiküllerin karakterizasyon analizleri, ilaç salımları ve biyolojik aktivite çalışmaları yapılmıştır. Taramalı Elektron Mikroskobu (SEM), Transmisyon Elektron Mikroskop (TEM), Kızılötesi Spektrum (FTIR) ve Yüksek Performanslı Sıvı Kromatografisi (HPLC) analizleri ile nanopartikül oluşumu doğrulanmıştır. Salım deneylerinde ise pH 1,2 ortamında M+HA ve HA+N nanopartiküllerinin 30 saatte tam bir salım gerçekleşmişken, pH 7,4 ortamında HA+N nanopartikülünde salım gözlenmemiştir. Comet deneyinde ise konsantrasyon azaldıkça

DNA hasarı azalmıştır. En düşük konsantrasyonda HA+N  $1.67\pm0.33$  DNA hasarına neden olurken HA+M'de DNA hasarına rastlanmamıştır. Total antioksidan ve oksidan seviyesi (TAS-TOS) deneylerinin sonuçlarında ise konsantrasyon arttıkça total oksidan kapasite artmış total antioksidan kapasite azalmıştır. TAS-TOS deneyleri ile DNA hasarı uyumlu bulunmuştur. DNA hasarı olan gruplarda oksidan kapasite de anlamlı artışlar antioksidan kapasite de ise anlamlı azalmalar gözlemlenmiştir. Böylece yavaş salımlı morfin ve noskapin formları oluşturularak plazmadaki konsantrasyon düşürülmüş ve uzun etki süresi sağlanmıştır. Dolayısıyla ilaçların toksik ve yan etkileri azaltılmıştır.

**Bilim Kodu** :

**Anahtar Kelimeler** : Hidroksiapatit, Morfin, Noskapin, İlaç salımı

**Sayfa Adedi** :119

**Tez Yöneticisi** : Safiye Elif KORCAN

**CHARACTERIZATION AND BIOACTIVITY STUDIES OF ALKALOIDS  
OBTAINED FROM MEDICAL PLANT EXTRACTS ATTACHED TO  
HYDROXYAPATITE NANOMOLECULES**

**(Master of Science)**

**Hava KÖLEMEK**

**UNIVERSITY OF UŞAK**

**GRADUATE SCHOOL OF NATURAL AND APPLIED SCIENCES**

**July 2018**

**ABSTRACT**

Controlled drug release systems have gained importance in recent years, among which nanoparticle systems are at the forefront. For this reason, nanoparticle preparation and characterization techniques are important. Hydroxyapatite (HA) is used for controlled drug release due to its porous structure, high tissue compatibility and high adsorption properties. Among the poppy capsules containing morphine and noscapine in the study, concentrated morphine and noscapine were confined to hydroxyapatite nanoparticles in order to increase side effects and noscapine circulation over time due to excessive uptake of morphine obtained. In the study, antioxidant activity studies of poppy capsules were carried out and no significant antioxidant properties were determined. Characterization analyzes, drug release and biological activity studies of synthesized free, morphine and noscapine loaded HA (HA+M; HA+N) nanoparticles were performed. The formation of nanoparticles was confirmed by Scanning Electron Microscopy (SEM), Transmission Electron Microscope (TEM), Infrared Spectrum (FTIR) and High Performance Liquid Chromatography (HPLC) analyzes. In release experiments, no release was observed in the HA+N nanoparticle at pH 7,4 while a complete release of HA+M and HA+N nanoparticles in the pH 1,2 environment was achieved within 30 hours. In the Comet experiment, the DNA damage decreased as the concentration decreased. At the lowest concentration, HA + N caused DNA damage of 1.67

$\pm 0.33$ , whereas DNA damage was not observed in HA+M. In the results of total antioxidant and oxidant level (TAS-TOS) experiments, total oxidant capacity increased and total antioxidant capacity decreased as the concentration increased. DNA damage was found to be consistent with TAS-TOS assays. In the DNA-damaged groups, oxidant capacity was significantly increased and antioxidant capacity was decreased significantly. Thus, slow release morphine and noscapine forms were formed to reduce plasma concentration and ensure long duration of action. Therefore, toxic and side effects of drugs are reduced.

**Science Code:** :

**Key Words** : Hydroxyapatite, Morphine, Noscapine, Drug release

**Number of Page** : 119

**Supervisor** : Safiye Elif KORCAN



## TEŞEKKÜRLER

Tez çalışmam sırasında kıymetli bilgi, birikim ve tecrübeleri ile bana yol gösterici ve destek olan değerli danışman hocam sayın Prof. Dr. Safiye Elif KORCAN'a, ilgisini ve önerilerini göstermekten kaçınmayan İbrahim BULDUK, Doç.Dr. Recep LiMAN sonsuz teşekkür saygılarımı sunarım. Çalışmalarım boyunca yardımını esirgemeyen değerli arkadaşım Meral ÖZTÜRK'e teşekkürlerimi sunarım. Çalışmalarım boyunca maddi manevi destekleriyle beni hiçbir zaman yalnız bırakmayan aileme de sonsuz teşekkürler ederim.

Tez çalışması "Uşak Üniversitesi Sağlık Bilimleri Bilimsel Araştırma ve Yayın Etiği Kurulu" (2017-34) no'lu onayı alındıktan sonra başlanmıştır ve "Uşak Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Koordinasyon Birimi" tarafından (2017-TP/41) no'lu proje ile desteklenmiştir. Katkılarından dolayı Uşak Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Koordinasyon Birimi'ne teşekkür ederiz.

Hava KÖLEMEK

Uşak, 2018

## İÇİNDEKİLER

ÖZET .....	v
ABSTRACT .....	vii
TEŞEKKÜRLER.....	ix
İÇİNDEKİLER.....	x
ÇİZELGELER LİSTESİ .....	xiii
ŞEKİLLER LİSTESİ.....	xiv
RESİMLER LİSTESİ.....	xv
SİMGELER VE KISALTMALAR .....	xvii
1 GİRİŞ.....	1
2 GENEL BİLGİLER.....	3
2.1. Haşhaş Bitkisi .....	3
2.2..Alkaloidler .....	4
2.2.1. Alkaloidlerin Sınıflandırılması.....	6
2.2.3. Haşhaş’ da Bulunan Bazı Alkaloidler ve Özellikleri .....	7
2.3. İlaç .....	12
2.4. Kontrollü İlaç Salımı .....	13
2.4.1. Kontrollü İlaç Taşıyıcı Sistemde Kullanılan Partiküler Sistemler .....	14
2.4.1.1. Mikroküreler .....	14
2.4.1.2. Mikrokapüller .....	15
2.4.1.3. Mikrosüngerler .....	15
2.4.1.4. Nanopartiküller .....	16
2.5. Biyomalzemeler ve Biyoyumluluk .....	17
2.5.1. Hidroksiapatit (HA) .....	18
2.5.1.1. Hidroksiapatitin Kullanım Alanları.....	19
2.5.1.2 Hidroksiapatit Hazırlama Yöntemleri .....	21
2.5.1.3 Hidroksiapatit ile Yapılan İlaç Salım Çalışmalarına Örnekler.....	22
2.6. Nanopartiküller ile Yapılan Biyoaktivite Çalışmaları .....	24
2.6.1. Antioksidan Aktivite .....	25
2.6.1.1. Antioksidatif Etkinin Belirlenmesinde Kullanılan Yöntemler .....	26
2.6.2. Antimikrobiyal aktivite .....	27
3 MATERYAL – METOT .....	28
3.1 Materyal .....	28
3.1.1 Bitkisel Materyal Temini .....	28

3.1.2 Çalışmada Kullanılan Cihazlar.....	29
3.1.3 Çalışmada Kullanılan Çözeltiler .....	30
3.2 Metot.....	36
3.2.1 Ultrasonik Destekli Metanol Ekstraksiyonu .....	36
3.2.2 Haşhaş Kapsüllerindeki Antioksidan Madde İçeriği ile İlgili Çalışmalar.....	36
3.2.2.1 Toplam Fenolik Madde Miktarı Tayini.....	36
3.2.2.2 Toplam Flavonoid Madde Miktarı Tayini.....	37
3.2.2.3 Serbest Radikal Giderim Aktivitesinin DPPH ile Belirlenmesi.....	37
3.2.2.4 Fenolik Asitlerin HPLC ile Analizi.....	38
3.2.3 Metal Analizi.....	39
3.2.4 Morfin ve Noskapin Yüklü Hidroksiapatit Nanopartiküllerin Sentezlenmesi ....	40
3.2.4.1 Haşhaş Kapsüllerinden Morfin ve Noskapin Ekstraksiyonu, Saflaştırılması	40
3.2.4.2 Boş, Morfin ve Noskapin Yüklü Hidroksiapatit Nanopartiküllerinin Sentezlenmesi.....	41
3.2.5 Nanopartiküllerin Karakterizasyon Analizleri .....	43
3.2.5.1 HPLC Analizleri ile Morfin ve Noskapin İçeriklerinin Belirlenmesi.....	43
3.2.5.2 Kızılötesi Spektrum (FTIR) Analizi.....	44
3.2.5.3 Taramalı Elektron Mikroskopu (SEM) Analizi .....	45
3.2.5.4 Transmisyon Elektron Mikroskop (TEM) Analizi.....	45
3.2.6 İlaç Salım Çalışmaları .....	46
3.2.6.1 <i>İn vitro</i> Mide Ortamında Salımın Belirlenmesi .....	46
3.2.6.2 <i>İn vitro</i> İnce Bağırsak Ortamında Salımın Belirlenmesi.....	47
3.2.7 Nanopartiküllerinin Biyoaktivite Çalışmaları .....	47
3.2.7.1 Antimikrobiyal Aktivitesinin Belirlenmesi.....	47
3.2.7.2 DNA Hasarına Etkisinin Belirlenmesi .....	48
3.2.7.3 Total Antioksidan Seviye (TAS)- Total Oksidatif Seviye (TOS)- Oksidatif Stres İndeksi (OSİ).....	49
4 BULGULAR .....	51
4.1 Toplam Fenolik Madde Miktarı Tayini.....	51
4.2 Toplam Flavonoid Madde Miktarı Tayini.....	53
4.3 Serbest Radikal Giderme Aktivitesi.....	55
4.4.Fenolik Asitlerin HPLC ile Analizi.....	59
4.6 Nanopartiküllerin Karakterizasyon Analizleri .....	60
4.6.1 HPLC Analizleri ile Morfin ve Noskapin İçeriklerinin Belirlenmesi.....	60
4.6.2 FTIR Analizi .....	60
4.6.3 SEM Analizi.....	64

4.6.4 TEM Analizi.....	68
4.7 İlaç Salım Çalışmaları .....	69
4.7.1 <i>İn-vitro</i> Mide Ortamı.....	69
4.7.2 <i>İn-vitro</i> İnce Bağırsak Ortamı .....	74
4.8 Nanopartiküllerin Biyoaktivite Çalışmaları .....	75
4.8.1 Antimikrobiyal Aktivitenin Belirlenmesi.....	75
4.8.2 DNA Hasarına Etkisinin Belirlenmesi .....	76
4.8.3 TAS- TOS- OSİ.....	77
5 TARTIŞMA VE SONUÇ.....	79
KAYNAKLAR.....	84
EKLER .....	93
ÖZGEÇMİŞ.....	117

## ÇİZELGELER LİSTESİ

Çizelge	Sayfa
Çizelge 2.1. <i>Papaver somniferum</i> ' da gösterilen bazı önemli alkaloidler	4
Çizelge 2.2. Hidroksiapatitin fiziksel, kimyasal ve biyolojik özellikleri	19
Çizelge 2.3. Hidroksiapatit bazlı ilaç taşıyıcı sistemler	21
Çizelge 3.1.1. de Çalışmada kullanılan cihazlar	28
Çizelge 3.1.2. 10X PBS Stok Çözelti İçeriği	32
Çizelge 3.1.3. Lizis Çözelti İçeriği	34
Çizelge 3.1.4. de Elektroforez Tampon Çözelti İçeriği	34
Çizelge 3.1.5. Nötralizasyon Çözeltisi İçeriği	35
Çizelge 3.2.1. DPPH radikali söndürücü kapasite yönteminde kullanılan ekstrakt miktarları	38
Çizelge 3.2.2. Fenolik asitlerin HPLC analiz koşulları	39
Çizelge 3.2.3. Alkaloid ayırımı için gradiyent koşulları	44
Çizelge 4.1. Gallik asit konsantrasyonuna karşılık absorbans değerleri	51
Çizelge 4.2. MHK ve NHK örneklerindeki fenolik madde miktarı	52
Çizelge 4.3. Kuersetin konsantrasyonuna karşılık absorbans değerleri	53
Çizelge 4.4. Çizelge 4.4 MHK ve NHK içerisindeki toplam flavonoid madde içeriği mg/QE	54
Çizelge 4.5. Bazı antioksidan bileşiklerin EC <sub>50</sub> değerleri.	55
Çizelge 4.6. MHK karşı % inhibisyon değerleri	56
Çizelge 4.7. NHK karşı % inhibisyon değerleri	57
Çizelge 4.8. MHK ve NHK 'nin EC <sub>50</sub> değerleri	58
Çizelge 4.9. MHK ve NHK ' nün HPLC ile Fenolik asit sonuçları (ppm)	59
Çizelge 4.10. MHK ve NHK nın metal analizi sonuçları (ppm)	59
Çizelge 4.11. Kapsülden nanopartiküle morfin ve noskapin miktarı (ppm)	60
Çizelge 4.12. Boş, HA+M ve HA+N'nin FTIR spektrumlarının karşılaştırılması)	62
Çizelge 4.13. Boş, HA+N ve HA+M'nin mononükleer lökositlerde Comet deneyi sonuçları	76
Çizelge 4.14.Boş, HA+M ve HA+N'nin TAS-TOS-OSİ sonuçları	78

## ŞEKİLLER LİSTESİ

Şekil	Sayfa
Şekil 2.1. Tebain açık formülü	8
Şekil 2.2. Kodeinin açık formülü	8
Şekil 2.3. Papaverin açık formülü	9
Şekil 2.4. Morfin açık formülü	10
Şekil 2.5. Noskapin açık formülü	11
Şekil 2.6. Kandaki ilaç seviyesi	13
Şekil 2.7. Nanokapsül ve nanoküreciğin şematik gösterimi	16
Şekil 3.2.1. Hidroksiapatit nanopartikülün oluşturulması	42
Şekil 3.2.2. Tek hücre jel elektroforez yöntemi	49
Şekil 4.1. Gallik asit kalibrasyon eğrisi	52
Şekil 4.2. Kuersetin kalibrasyon eğrisi	54
Şekil 4.3. MHK' nın farklı miktarlardaki ekstraktların % inhibisyon değerleri	56
Şekil 4.4. NHK 'nın farklı miktarlardaki ekstraktların % inhibisyon değerleri	58
Şekil 4.5. Boş HA'nın FTIR Spekturumu	62
Şekil 4.7. HA+M'nın FTIR Spekturumu	63
Şekil 4.7. HA+N'nın FTIR Spekturumu	63
Şekil 4.8. Boş HA nanopartikülünün SEM analizi	65
Şekil 4.9. HA+M nanopartikülünün SEM analizi	66
Şekil 4.10. HA+N nanopartikülünün SEM analizi	67
Şekil 4.11. HA+M nanopartikülünün pH 1,2 ortamında morfin konsantrasyonu ve salım grafiği	70
Şekil 4.12. HA+M nanopartikülünün pH 3 ortamında morfin konsantrasyonu ve salım grafiği	71
Şekil 4.13. HA+N nanopartikülünün pH 1,2 ortamında noskapin konsantrasyonu ve salım grafiği	72
Şekil 4.14. HA+N nanopartikülünün pH 3 ortamında noskapin konsantrasyonu ve salım grafiği	73
Şekil 4.15. HA+M nanopartikülünün pH 7,4 ortamında morfin konsantrasyonu ve salım grafiği	74

## RESİMLER LİSTESİ

<b>Resim</b>	<b>Sayfa</b>
Resim 3.1.1. Haşhaş Kapsülü	28
Resim 3.2.1. Ekstraktların filtrasyonu	36
Resim 3.2.2. Ekstraktların ayrılması ve saflaştırılması	41
Resim 3.2.3. Yüklü hidroksiapatit nanopartiküllerinin oluşturulması	43
Resim 4.1. HA TEM görüntüsü	68
Resim 4.1. HA+M TEM görüntüsü	68
Resim 4.1. HA+N TEM görüntüsü	69
Resim 4.4. Bitki ekstraktlarının, boş, HA+M ve HA+N nanopartiküllerinin antimikrobiyal aktivitesi	75

## SİMGELER LİSTESİ

Bu çalışmada kullanılmış bazı simgeler ve kısaltmalar, açıklamaları ile birlikte aşağıda sunulmuştur.

<b>Simgeler</b>	<b>Açıklama</b>
%	Yüzde
°C	Santigrat Derece
mL	Mililitre
gr	Gram
ppm	mg çözünen / kg veya litre çözeltisi
dk.	Dakika
µg	Mikrogram
nm	Nanometre
rpm	Dakikadaki devir sayısı
µL	Mikrolitre
µM	Mikromolar
<b>Kısaltmalar</b>	<b>Açıklama</b>
<b>BIA</b>	Benzilizokinolin alkaloidleri
<b>HA</b>	Hidroksiapatit
<b>PEVAc</b>	Polietilenvinilasetat
<b>5-FU</b>	5-Florourasil



<b>XDR</b>	X-Işını Kırınım yöntemi
<b>DPPH</b>	1,1-diphenyl-2-picrylhydrazil
<b>TAS</b>	Total Antioksidan Seviye
<b>TOS</b>	Total Oksidatif Seviye
<b>OSİ</b>	Oksidatif Stres İndeksi
<b>PBS</b>	Fosfat tampon çözeltisi
<b>MHA</b>	Mueller Hinton agar
<b>LMA</b>	Düşük erime noktalı agar
<b>NMA</b>	Normal erime noktalı agar
<b>EDTA</b> tuzu dihidrat	Etilendiamin tetraasetik asit disodyum
<b>MHK</b>	Morfince Zengin Haşhaş Kapsülü
<b>NHK</b>	Noskapince Zengin Haşhaş Kapsülü
<b>HPLC</b> Kromatografisi	Yüksek Performanslı Sıvı
<b>ICP-MS</b> Emisyon Spektroskopisi	İndüktif Olarak Eşleşmiş Plazma-Optik
<b>HCl</b>	Hidroklorik asit
<b>HA+M</b>	Morfin yüklü hidroksiapatit
<b>HA+N</b>	Noskapin yüklü hidroksiapatit
<b>FTIR</b>	Kızılötesi Spektrum
<b>SEM</b>	Taramalı Elektron Mikroskopu
<b>TEM</b>	Transmisyon Elektron Mikroskop

**EC<sub>50</sub>**  
%50 Azaltmak İçin Gereken Antioksidan Miktarı

Başlangıç DPPH Konsantrasyonunu

**TFA**

Trifloroasetik asit



## 1.GİRİŞ

Klasik yöntemlerle ilaçlar ağızdan alınarak veya damara enjekte edilerek uygulandığında vücuttaki ilacın miktarı önce yükselir daha sonra hızla düşer. İlacın vücutta metabolize olması veya parçalanması gibi nedenler bunun sebebi olabilir. İlaçların vücutta etkili olduğu bir miktar aralığı vardır. İlacın bu miktardan fazla veya az miktarda verilmesi ilacın hem boşa kullanılmasına hem de yan etkilere sebep olabilir. Bu nedenle bu aralığa yeterince hassasiyetin gösterilemediği klasik yaklaşımın aksine kontrollü ilaç yaklaşımı vücuttaki ilaç miktarını bu etkin alanda daha hassas bir biçimde tutarak hem tedavi olasılığını artırır hem de ilaç tasarrufu sağlar. Bunun yanında ilacın vücutta belirli bir bölgede etki göstermesi hedeflenir [1]. Kontrollü ilaç salımında etkin maddenin belirli bir hızla sistem içerisinden istenilen sürede ve gereken miktarda çıkacak şekilde tasarımı yapılabilir. Kontrollü ilaç salım sistemlerinde etkin maddelerin vücuda salımında genellikle sentetik polimerler kullanılmaktadır. Bu sentetik polimerlerin biyoyumlu ve ya biyobozunur olması istenmektedir. Kontrollü salım sistemleri arasında yüksek biyoyumluluğu ve gözenekli yapısı ile hidroksiapatit dikkat çekmektedir [2].

Kemik yapısına benzerliği ve yüksek biyoyumluluğu nedeniyle hidroksiapatit biyoseramiği bu sistemlerde son yıllarda giderek tercih edilmektedir. Araştırmalar hidroksiapatit üzerine ilaç yüklenmesi ve bu ilacın hidroksiapatitten vücuda güvenli şekilde ve kontrollü olarak salınması üzerine yoğunlaşmıştır. Bugüne kadar yapılan çalışmalarda hidroksiapatitin endüstriyel polimerler vasıtasıyla yapısı bozulmadan gözenekli hale getirilebildiği ve böylece daha çok miktarda ilacı absorblayabildiğini göstermiştir [2-4].

Bu çalışmada morfin içeren haşhaş kapsüllerinden konsantre morfin ve noskapin içeren haşhaş kapsülünden konsantre noskapin elde edilerek hidroksiapatit sentez ortamına konsantre ekstraktları ekleyerek morfin ve noskapin yüklü hidroksiapatit nanopartiküllerini üretmek amaçlanmıştır. Böylece morfin ve noskapinin yavaş salım ortamı oluşturarak bu

ilaçların toksik ve yan etkilerinin azaltılması hedeflenmiştir. Çalışmada aynı zamanda haşhaş kapsüllerinin antioksidan aktivitesi araştırılmış ve ayrıca metal analizleri yapılmıştır.



## 2. GENEL BİLGİLER

### 2.1 Haşhaş Bitkisi

Latince ismi *Papaver somniferum* L olan haşhaş tek yıllık kültür bitkisidir. Bilimsel sınıflandırmaya göre Rhodales takımının *Papaveraceae* familyasının *papaver* cinsi içerisinde yer almaktadır. Latince *Papaver* gelincik, *somniferum* da “uyku verici” anlamına gelmektedir [5].

Haşhaş ülkemizde ticari olarak yetiştirilen önemli bir tıbbi bitkidir. Tıbbi öneme sahip olan haşhaş bitkisi, iki önemli ürüne sahiptir; birincisi alkaloid içeren kapsülleri, diğeri ise tohumları ve yağıdır [6]. İçerdiği bu iki ürünü ile Türkiye açısından kültür bitkileri içerisinde rekabet gücü yüksek olan milli bir servet kaynağıdır [7]. Zengin alkaloid içeriği nedeniyle *Papaveracea* familyasına ait sekiyonların tıbbi alanda önemli kullanımları söz konusudur [6,8]. Kapsüllerinde bulunan alkaloidler önemli tıbbi ilaçların yapılmasında kullanılırken tohumları ise ağırlıklı olarak yağ elde etmek için kullanılmaktadır. Haşhaşın ilk kullanımı haşhaş özsuğunu bebeklerin uyuması için mamalarına karıştırılarak olmuştur [9]. Haşhaş kapsülünde yaklaşık 30 alkaloid bulunmaktadır ve haşhaş kapsüllerindeki alkaloidler den en önemlileri morfin, kodein, noskapin, tebain ve papaverin'dir. Çizelge 2.1.'de *P. somniferum* bitkisinin de bulunan bazı önemli alkaloidler gösterilmiştir.

Çizelge 2.1. *Papaver somniferum*'da bulunana bazı önemli alkaloidler [10]

Adı	Kimyasal Formülü
Morfin	$C_{17}H_{19}O_3N$
Noskapin	$C_{22}H_{23}O_7N$
Kodein	$C_{18}H_{21}O_3N$
Narsein	$C_{23}H_{27}O_8N$
Tebain	$C_{19}H_{21}O_3N$
Pseudomorfin	$C_{17}H_{18}O_3N$
Papaverin	$C_{20}H_{21}O_4N$
Kriptopin	$C_{21}H_{25}O_5N$
Roadin	$C_{21}H_{21}O_6N$
Lantopin	$C_{23}H_{25}O_4N$
Mekonidin	$C_{21}H_{23}O_4N$
Kodamin	$C_{20}H_{25}O_4N$
Lavdanin	$C_{20}H_{25}O_4N$
Lavdonasin	$C_{21}H_{27}O_4N$
Hidrokotarnin	$C_{12}H_{15}O_3N$
Oksinarkotin	$C_{22}H_{23}O_8N$
Protepin	$C_{20}H_{19}O_5N$
Ksantalin	$C_{20}H_{19}O_5N$
Papaveramin	$C_{21}H_{25}O_6N$
Aporein	$C_{18}H_{16}O_2N$
Neopin	$C_{18}H_{21}O_4N$
Porfidroksin	$C_{19}H_{23}O_4N$
Narkotolin	$C_{21}H_{21}O_7N$

## 2.2 Alkaloidler

Alkaloid halka içinde azot taşıyan ve genellikle kuvvetli fizyolojik ve farmakodinamik aktivite gösteren, alkali maddelere denilmektedir. Alkaloidler bitkilerin

herbivorlar ve patojenlere karşı savunmasında görev alırlar. Biyolojik aktivitelerine bağlı olarak bilinen yaklaşık 12.000 alkaloid vardır. Alkaloidler, farmakolojik, uyarıcı, narkotik ve zehir olarak kullanılmaktadır [11,12]. Alkaloidlere genellikle çiçekli bitkilerde, daha seyrek çiçeksiz bitkilerde ve bazı hayvanlarda [yenidünya kunduzu ve çörel (semender)] rastlanmaktadır [13].

Alkaloidler bitkinin genellikle belirli organlarında toplanır ve her organında alkaloid bulunmayabilir. Örneğin haşhaş bitkisinin kapsülünde alkaloid bulunurken tohumlarında alkaloid bulunmaz. Ayrıca bitkilerde tek bir alkaloid tipinden daha çok aynı esas yapıyı taşıyan alkaloid grubu bulunur. Bunlardan biri diğerlerinden daha fazladır veya daha aktiftir [14].

Karmaşık molekül yapılarına sahip olan alkaloidler, genellikle amin yapısı içinde en az bir azot atomu bulunur. Azot atomuna karbon ve hidrojenle oluşan hidrokarbon grupları bağlanır ve amin yapısı çoğu kez azot ya da hidrokarbon grupları üzerindeki halkalı bir yapının içinde bulunur. Patlıcangiller (*Soeleneceae*), gelincikgiller (*Papaveraceae*), kökboyacıgiller (*Leguminoceae*) familyalarında alkaloidlere daha fazla rastlanmaktadır. Alkaloid içeren bitkiler % 0,01 oranından fazla alkaloid içermektedir [10].

Bitkilerdeki bulunan alkaloidlerin biyokimyasal çalışmaları 1806 yılında morfinin izolasyonu ile başlamıştır. Morfin molekülün stereo-kimyasal karmaşıklığına bağlı olarak 1952 yılına kadar yapısı açıklanamamıştır. Yarım yüzyılı aşkındır bitkilerdeki alkaloid biosentezi kimyasal, biyokimyasal ve moleküler araştırmalarla anlaşılmaya çalışılmaktadır [15].

Alkaloidler genellikle hayvanlarda ve insanlarda zehirlenmelere neden olurlar. *Cotalaria* ve *Heliotropium* (balbul otu) türlerinin içerdiği bir alkaloid sürekli alındığında karaciğer sirozuna neden olmaktadır. Tahıl tohumlarında bulunan çavdarmahmuzu olarak bilinen bir tür mantarın ürettiği alkaloid, ergotizm hastalığına neden olmaktadır. Alkaloidlerin fizyolojik etkileri tıpta önem taşımaktadır. Örneğin haşhaştan elde edilen morfin tıpta ağrı kesici olarak kullanılmakta noskapin ise öksürük kesici olarak kullanılmaktadır [13].

Alkaloidlerin alım miktarları da önem taşımaktadır. Az miktarda alınana alkaloidler fayda sağlarken fazla miktarda alınana alkaloidler öldürücü olabilmektedir [10]. Baldırandan

elde edilen ve zehirli olan koniin alkaloidi fazla kullanıldığında teneffüs yollarını felç ederek ölüme yol açmaktadır. Tıpta kullanılan metadonun da yanlış kullanılması bağımlılığa neden olmaktadır. Bundan dolayı doktor kontrolü dışında ilacın kullanılması insanlar üzerinde ciddi tehlikeler oluşturmaktadır [16].

### **2.2.1 Alkaloidlerin Sınıflandırılması**

Alkaloidler şekil ve orijinlerine göre, gerçek alkaloidler, protoalkaloidler ve yalancı alkaloidler olmak üzere üç ana sınıfa ayrılır. Gerçek ve protoalkaloidler amino asitlerden türevlenirken, yalancı alkaloidler amino asitlerden türevlenmezler [17].

#### **- Gerçek Alkaloidler**

Aminoasitten türevlenen, heterosiklik halkalarını bir azotla ortaklaşa kullanan alkaloidlerdir. Yüksek biyolojik aktiviteye sahip moleküllerdir. Düşük dozları bile çok etkilidir. Gerçek alkaloidler katı ve beyaz bir renge sahiptirler (nikotin; kahverengi sıvı) ve tatları acıdır. Suda çözünebilir tuzları oluşturan alkaloidlerin pek çoğu bu tuzları oluşturabilmek için asitlerle birleşen kristal maddelerdir.

Bitkilerde, serbest durumda, tuz olarak, N-oksitler olarak bulunurlar. Gerçek alkaloidlerin öncülleri aminoasitleri L-Ornitin, L-Lizin, L-Fenilalanin/L-Tirozin, L-Triptofan ve L-Histidin dir. Gerçek alkaloidlere örnek olarak kokain, kinin, dopamin, morfin verilmektedir [17]

#### **- Protoalkaloidler**

Protoalkaloidler aminoasitten türevlenilen fakat heterosiklik halkanın bir parçası olmayan halkasal moleküllerdir. Öncül aminoasitleri L-Tirozin ve L-Triptofan'dır. Protoalkaloidler alkaloidler içerisinde az bir kısmı oluştururlar ve örnek olarak hordenin, meskalin ve yohimbin verilmektedir [17].

#### **- Yalancı alkaloidler**

Yalancı alkaloidler ise yapısında temel karbon iskeleti bulunduran ve aminoasitlerden türevlenmeyen bileşiklerdir. Bunlar aminoasitlerin öncül (prekürsör) veya



postkürsörlerinden oluşmaktadır. Moleküle N atomu daha sonraki evrelerinde yerleşir. Yalancı alkaloidlere örnek kapsaisin, efedrin, kafein, teobromin verilmektedir [17].

Alkaloidler, biyolojik ve ekolojik aktivitelerine, kimyasal yapılarına ve biyosentez yollarına göre de sınıflandırılabilirler. Bilinen bazı alkaloid çeşitleri:

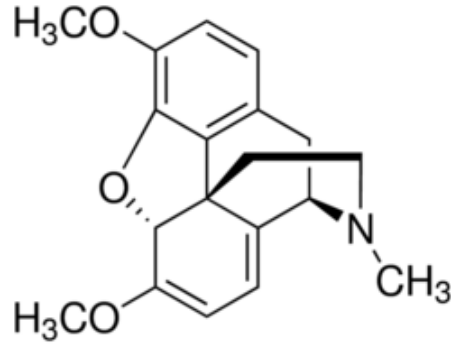
- Monoterpenoid indol alkaloidleri
- Tropan alkaloidleri ve nikotin
- Pürin alkaloidleri
- Pirolizidin alkaloidleri
- Quinolizidin alkaloidleri
- Benzilzokinolin alkaloidleri (BIA)' dir [12].

Haşhaş bitkisi benzilzokinolin alkaloidlerini sentezlemektedir [12,18]. Benzilzokinolin alkaloidleri bitki metabolitlerinin yapısal olarak farklı bir grubudur. Haşhaş farklı yapısal alt gruplara sahip olan morfinyan, protoberberin, benzofenantridin, fitalidizokinolin, aporfin, pavin, roeadin ve protopin alkaloidleri gibi çok sayıda BIA biriktirir. Analjezik (öksürük kesici) morfin ve kodein, antimikrobiyal ajan sanguinarin ve berberin ve antikanserojenik etkilere sahip noskapin bunlardan bazılarıdır [19].

## 2.2.2 Haşhaşta Bulunan Bazı Alkaloidler ve Özellikleri

### - *Tebain*

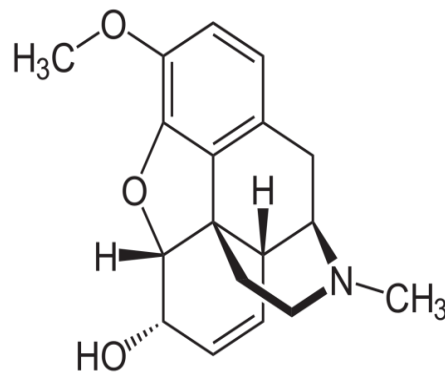
Kimyasal formülü  $C_{19}H_{21}O_3N$  ve molekül ağırlığı 311,37 g/mol 'dür. Tebainin açık formülü Şekil 2.1.'de verilmiştir. Erime noktası 193 °C'dır. Tebain % 73,29 oranında C, % 6,80 oranında H, % 15,42 oranında O ve % 4,50 oranında N atomlarını içermektedir. Morfin izomeri olarak bilinen tebain daha sonra paramorfin olarak adlandırılmıştır [10]. Afyon alkaloidleri içinde en zehirli olanıdır. Kodein sentezinde kullanılan tebain kodein türevidir. İlaç olarak kullanılmamaktadır fakat santral sinir sistemini uyarıcı etkisi vardır [20].



Şekil 2.1. Tebain açık formülü [33]

### - *Kodein*

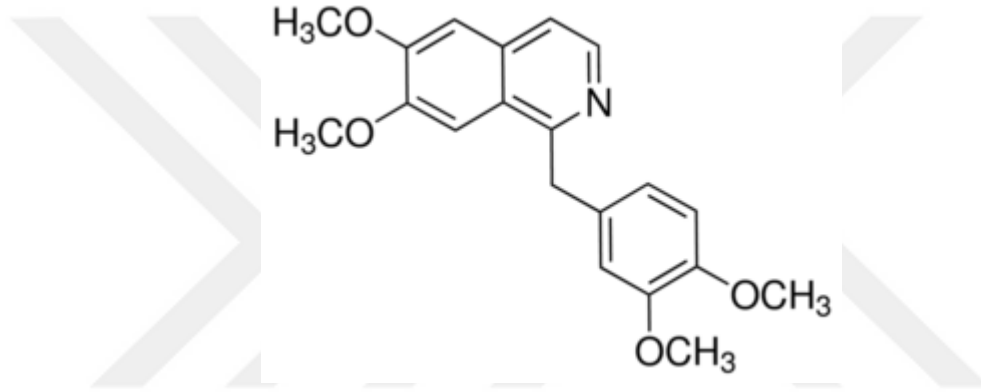
Kapalı formülü  $C_{18}H_{21}NO_3$  tür ve molekül ağırlığı 299,3'tür. Kodeinin açık formülü Şekil 2.2.'de verilmiştir. Erime noktası  $154\text{ }^{\circ}\text{C}$ 'dir. Kodein % 72,22 oranında C, % 7,07 oranında H, % 4,68 oranında N ve % 16,03 oranında O atomlarını içermektedir [10]. Genellikle morfinin metillenmesiyle sentetik olarak elde edilir. Kodein genellikle morfinden elde edilir ve morfinin monometil eteridir. Kodein haşhaşın olgunlaşmamış kapsüllerinden çıkan sıvıdan da elde edilebilir eğer bu sıvıdan elde edilirse ilaç olarak kullanılabilir. Tebainin dikkatli hidrolizi ile de kodein elde edilir. Analjezik etkisi az olmasına karşın diğer analjezik etki gösteren ilaçlarla kullanıldığında analjezik etkisi artmaktadır [14]. Morfine göre daha az zehirlidir ve bağımlılık yapma özelliği daha azdır [20].



Şekil 2.2. Kodeinin açık formülü [33]

### - *Papaverin*

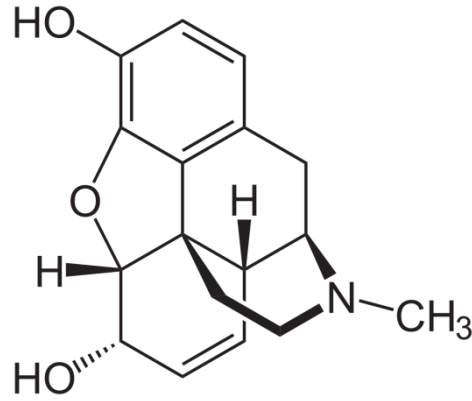
Kapalı formülü  $C_{20}H_{21}NO_4$  'dür ve molekül ağırlığı 33,38 g/mol tür. Papaverinin açık formülü Şekil 2.3.'de verilmiştir. Erime noktası 147 °C'dir. Papaverin % 70,78 oranında C, % 6,24 oranında H, % 4,13 oranında N ve % 18,86 oranında O atomlarını içermektedir [21]. Papaverin Merck tarafından 1849 yılında afyon sütünden morfin ve kodein ekstrakte edildikten sonra ortaya çıkmıştır. Haşhaş kapsülünün tüm kısımlarında özellikle ham kapsüllerinde bulunur. Uyuşturucu ve ağrı kesici özelliği yavaştır. Papaverin, merkezi sinir sistemi çevresindeki çizgisiz kaslar üzerine etki etmektedir. Papaverin düz kasların gevşemesini sağlayarak kas spazm tedavisinde kullanılır [11, 14, 20, 22].



Şekil 2.3. Papaverin açık formülü [33]

### - *Morfin*

Kapalı formülü  $C_{17}H_{19}O_3N$  tır ve molekül ağırlığı 285,33'tür. Morfinin açık formülü Şekil 2.4.'de verilmiştir. Erime noktası 254 °C'de bozularak erir. Morfin % 71,56 oranında C, % 16,82 oranında O, % 4,91 oranında N ve % 6,71 oranında H atomlarını içermektedir. Molekül suyunu 120 °C'de kaybeder [21]. Morfini diğer alkaloidlerden ayıran fenol ve alkol grubu olan iki hidroksil grubu vardır. Fenolik grubunun metillenmesiyle de kodein oluşur. Morfin kristalleri rensiz ve kokusuzdur. Morfinden eroin, pentazoin ve oksikodon gibi birçok yarı sentetik madde elde edilebilir [14].

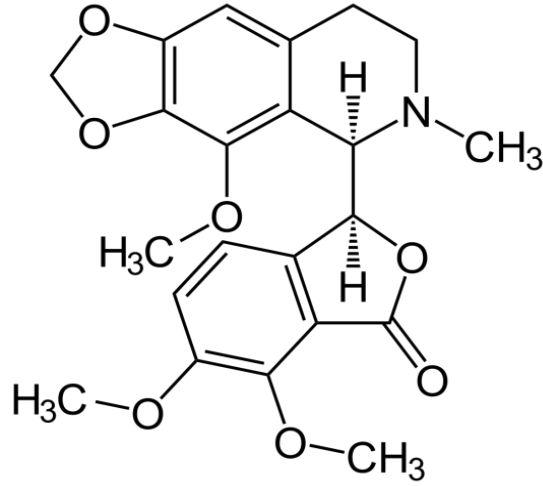


Şekil 2.4. Morfin açık formülü [33]

Morfin uyuşturucu etkiye ve ağrıkesici özelliğine sahiptir ve ağrı kesici özelliği ile bilinen en etkili doğal bileşiktir. Ağrı kesicilerin etkisiz kaldığı durumlar ve vücudun yıpranmasına neden olan hastalıklarda hastayı sakinleştirmek amacıyla verilmektedir. Morfin nedensiz taşkınlık ve neşe haline neden olur, solunum, dolaşım ve sindirim sistemlerinde birçok istenmeyen etkisi vardır. Merkezi sinir sistemi üzerindeki etkisiyle kusmaya ve belli bir dozun üstünde alındığında depresyona neden olur. Çok kolay bağımlılık yapar. Sakinleştirme gibi aranan etkiler ortadan kalkar, son şırıngadan 12 saat sonra esnemeler, iç daralması, bedensel çarpınmalar, burun, gözyaşı ve terde aşırı artma uykusuzluk, kas krampları ve ishal görülür. Kalp ve damar bozuklukları ortaya çıkar ve ölüme neden olabilir. Katlanılması çok zor olan bu etkiler morfinman tedavi olmaya karar vermedikçe morfin ya da benzerlerde birini yeniden almaya yöneltir. Bu bağımlılık morfinin tedavide yalnız akut sancılı durumlarda, kanser ağrılarında ve akciğer ödemlerinde kullanılmasına neden olmuştur [16].

#### - *Noskapin*

Kapalı formülü  $C_{22}H_{23}NO$ 'dur ve molekül ağırlığı 313,43 g/mol'dür. Noskapinin açık formülü Şekil 2.5.'de verilmiştir. Erime noktası 176 °C'dir. Noskapin % 63,91 oranında C, % 5,61 oranında H, % 3,39 oranında N ve % 27,09 oranında O atomları içermektedir. Önceleri narkotik sanıldığı için narkotin denilen noskapinin antitussif (öksürük kesici) özelliği keşfedilince adı değişmiştir. Kodeinin öksürük kesici özelliği ile aynıdır. Öksürük kesici özelliğinden dolayı tıpta ilaç olarak kullanılmaktadır [10, 20-22].



Şekil 2.5. Noskapin açık formülü [33]

Öksürük baskılayıcı bir ajan olan noskapinin kemik iliği kanserinin tedavisi için faz I/II denemelerinde anti kanser ilaç olduğu keşfedilmiştir. Noskapin tübülünün kararlı hal monomer/polimer oranını değiştirmez [23-25]. Bu sayede, noskapin kan, bağışıklık ve nöronal toksisiteye neden olmaz [24]. Bu şu anda mevcut mikrotübülleri hem aşırı bir şekilde polimerleştiren hem de polimerleri monomerlere parçalayan anti-mikrotübül ilaçlar üzerinde eşsiz bir özelliktir [26, 27]. Kapsamlı çalışmalar lenfoma, melanom, prostat, akciğer kanserlerinin tedavisinde noskapinin potansiyel yararını bildirmiştir [28, 29].

Noskapin düşük toksisite gösteren organlar ve kan parametrelerine çok az veya hiç etkisi olmayan ve kanser tedavisinde kullanıma sahip bir alkaloiddir. Noscapinin dozu arttıkça zamana bağlı olarak hidrojen peroksit üretiminin azaldığı bildirilmiştir. Ayrıca noskopinin çeşitli dokularda birikmediği iddia edilmiştir. Buna sebep plazmada ve dokularda noskapinin hızlı bir şekilde yok edilmesi olabilir [34]. Noskapin oral olarak uygulandığında 2-3 saat içinde plazmada en yüksek düzeye çıktığını, 6 saat sonra tespit edilemediğini ve sistemde kısa sürede sirküle olduğunu gösteren farmakokinetiği de belirlenmiştir [30-32, 35].

## 2.3 İlaç

İlaç, kimyasal özellikleri ortaya konmuş ve hedef dokularda farmakolojik etki oluşturan sentetik, yarı sentetik ya da doğal bir moleküldür. Çoğunlukla bir ilaç molekülü, insan ya da hayvan organizmasında bulunan bir nörotransmitter ya da hormon taklidi yaparak etkisini gösterir. Diğer birçok ilaç da, organizmayı işgal etmiş olan paraziter, bakteriyel ya da viral mikroorganizmalara (kemoterapötik etki) ya da immun sistemlere etkiyerek hastalık durumlarını ortadan kaldırırlar. Kemoterapötik etkili olan ilaç insanın doğal kimyasından olmayan değişik bir moleküldür. İnsan organizmasına zarar vermeksizin (ya da en az zararlı), mikroorganizma hücrelerini inhibe eder ya da öldürür [36].

İlaçları dört ana kaynaktan elde edebilir. Bunlar; hayvansal kaynaklı, bitkisel kaynaklı, mineraller ve sentetik olarak sayılabilir. Örneğin diyabetiklerin kullandığı insülin ilacı, genellikle domuz ve sığır gibi hayvanların pankreasından hazırlanır. Bitkilerin kökleri, yaprakları, çiçekleri ve tohumları ilaçların bitkisel kaynağını oluşturabilirler. Bitkisel kaynaklı bir ilaç olan digitalis mor foxglove bitkisini çiçeğinden elde edilmekte ve kalp yetersizliğinin tedavisinde kullanılmaktadır. Kalsiyum, demir ve magnezyum gibi mineraller ise farklı tıbbi sorunların iyileştirilmesinde kullanılmaktadır [37].

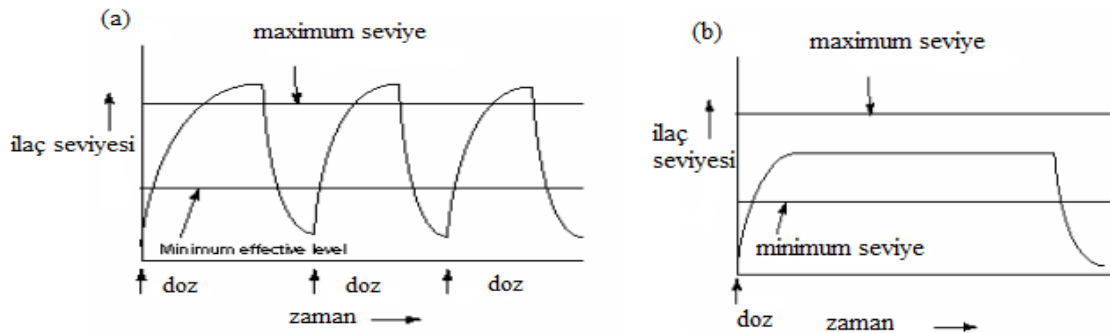
Günümüzde tedavide kullanılan ilaçların çoğunluğu, farmasötik kimya laboratuvarlarında sentez yoluyla elde edilmektedir. Sentez yoluyla ilaç eldesi, doğal yolla elde edilenlere oranla daha ekonomik olması ve yan etkilerin en aza indirgenebilmesi nedeniyle hızla gelişmektedir. Doğal ilaçların pek çoğu, sentez yolu ile elde edilebilmektedir. Ancak, morfin ve kinin gibi doğal kaynaklardan elde edilen ilaçların sentez yolu ile elde edilmeleri ekonomik olmadığından ya da bazılarının kimyasal tanımlanmasının yapılamamış olmasından dolayı doğal preparatların kullanılması tercih edilmemektedir. Doğal yolla elde edilen ilaçların kimyasal yapılarında bazı yapay değişikliklere gidilerek semi-sentetik (yarı sentetik) ilaç şekilleri oluşturulmaktadır. Örneğin, afyonun doğal alkaloidi olan morfinin kimyasal yapısındaki bazı değişikliklerle semi-sentetik türevleri olan dionin ve heroin gibi aktivite yönünden farklı olan bileşikler elde edilmiştir. Antibiyotiklerin semi-sentetik türevleri oldukça fazladır. Özellikle, penisilin gibi mide asidine dayanıksız ve yan etkileri olan bazı antibiyotiklerin, bu etkilerden arınmış çok sayıda semi-sentetik preparatları yapılmıştır [36].

## 2.4 Kontrollü İlaç Salımı

Kontrollü salım, etkin maddenin sistem içerisinde istenilen sürede, belirlenmiş bir hızla ve gereken miktarda çıkacak şekilde tasarımının yapıldığı bir yöntemdir. Farklı uygulama yolları ile verilmek üzere veya etki yerine hedeflendirilmek üzere hazırlanan taşıyıcı sistemler de kontrollü salım sistemleri arasındadır [38].

İlaç alımında kullanılan klasik yöntemler, tablet veya kapsüllerin ağızdan alımı ya da enjeksiyon şeklinde olmaktadır. Bu tip klasik yöntemlerle alınan ilacın plazma düzeyini etkili dozda tutabilmek için ilacın sık ve tekrarlanan dozlarda alınması gerekmektedir. İlaç alımının sık ve tekrarlı dozlarda olması ilaç israfına neden olmakta ve hastalara bağımlılık kazandırmaktadır [39].

Tablet veya enjeksiyonla ilacın kandaki akış profili, Şekil 2.6. (a)'de gösterilmiştir. İlacın her verilişinde seviye yükselmiş bir sonraki ilaç verimine kadar seviye düşmüştür. Bu durumda ilaç kan seviyesinin toksik seviye olduğu maksimum değer ile ilacın etkisiz olduğu seviyenin altında olduğu minimum değer arasında kalmaktadır. Kontrollü ilaç sistemlerinde kandaki ilaç seviyesi de Şekil 2.6. (b)'de gösterilmiştir. İlaç salımında istenilen maksimum ve minimum seviyede uzatılabilir ve zaman periyodu için de sabit tutulabilir. Formülasyona ve uygulamaya bağlı olarak bu uzatılmış zaman 24 saatten 1 aya ve 5 yıla kadar çıkabilir [40].



Şekil 2.6. Kandaki ilaç seviyesi (a) geleneksel ilaç dozlaması (b) kontrollü ilaç dozu [69]

Son yıllarda ise yeni kontrollü ilaç salım sistemleri keşfedilmiştir. Amaca yönelik kontrollü ilaç salım sistemleri birçok şekilde denenmektedir ve bunlar arasında en çok öne çıkan tür nanopartiküller sistem olmuştur. Birçok yöntem arasından nanopartiküller kontrollü ilaç salımı üzerinde önemli bir etki oluşturmuştur ve bu nedenle nanopartikül hazırlama ve karakterizasyon tekniklerinin geliştirilmesi önem taşımaktadır.

#### **2.4.1 Kontrollü İlaç Taşıyıcı Sistemde Kullanılan Partiküler Sistemler**

Bileşenin bir başka kimyasalla ya da bir ilaç uygulama aygıtıyla salım hızını, dokulara salımını ya da her ikisini de kontrol eden sistemlere ilaç taşıyıcı sistemler denir. Bu sistemler genel olarak, hareketli sistemler ve vücudun belirli bölgesine yerleştirilen statik sistemler olarak sınıflandırılırlar [41].

##### **2.4.1.1 Mikroküreler**

Çapları birkaç  $\mu\text{m}$ ' den birkaç yüz  $\mu\text{m}$ ' ye kadar değişebilen, monolitik yapıda taşıyıcılarıdır. Mikroküreler etkin maddeyi hücre veya dokulara taşıyan ve kontrollü şekilde salınımını sağlayan, hedefe ulaşana kadar etkin maddeyi sızdırmayan yapılardır. Mikrokürelerin biyolojik olarak parçalanabilmesi ve parçalanma ürünlerinin toksik olmaması gerekir.

Mikroküreler sentetik ve doğal polimerlerle hazırlanır. Doğal polimer olarak lipitler, amino polisakkaritler, proteinler, karbonhidratlar kullanılırken sentetik polimer olarak ise biyolojik parçalanmayan ve parçalanmayan polimerler kullanılır [42].

Mikroküreler farmasötik uygulamalarının yanı sıra dolaşım sistemi fonksiyonlarının incelenmesinde, damar çaplarının ölçülmesinde, kromatografi kolonlarında dolgu maddesi olarak da kullanılabilir. Anti-kanserojen ilaçlar, proteinler ve aşılarda mikroküre halinde vücuda verilen sistemlerdendir [41].



### 2.4.1.2 Mikrokapsüller

Mikrokapsül, çekirdeğin çeperle kaplanmasıyla oluşan dozaj şekline denilmektedir. Etkin maddeye çekirdek, kaplama maddesine de çeper adı verilir. Mikrokapsülleme katı, sıvı ve gazın inert bir polimerim madde ile film halinde kaplanması işlemine denir [42]. Bu işlemin amacı, sıvıların kolay taşınmasını sağlamak için katı hale getirmek, uçucu maddelerin buharlaşma kaybını azaltmak, istenilmeyen tat ve kokuyu gizlemek, geçimsizliği gidermek, atmosfer koşullarından korumak, stabiliteyi arttırmak, etki süresini uzatmak ve kontrollü salın sistemleri üretmektir [41].

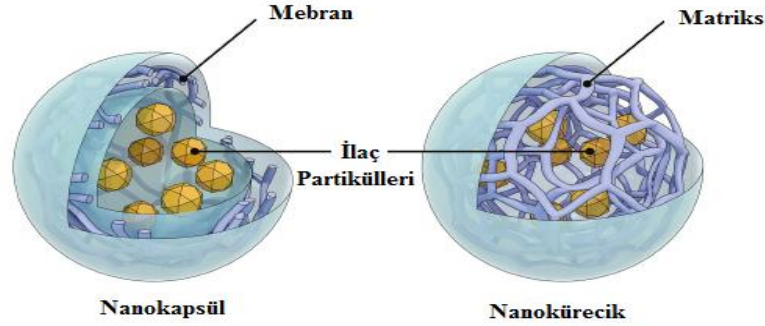
Çekirdek maddeleri katı, sıvı, gaz, süspansiyon, emülsiyon şeklinde olabilmektedir. Farklı farmakolojik gruplara ait maddeler; örneğin, antibiyotikler, analjezikler, kardiyovasküler ilaçlar, hormonlar, enzimler, bakteriler, antikorlar, hücreler, boyalar, esanslar, pigmentler kapsüllene bilmektedir. Çeper maddeleri olarak da doğal, yarı sentetik ve sentetik polimerler kullanılabilir [41].

### 2.4.1.3 Mikrosüngerler

Mikrosüngerler büyüklükleri 5-300 µm arasında değişen, mikroskobik boyutta, polimerik esaslı, genelde topikal olarak uygulanan gözenekli taşıyıcılardır. Yaklaşık 25 µm büyüklüğündeki bir mikrosüngerin etkin maddeyi kapsülleme kapasitesi ise % 50-60 arasındadır. Mikrosüngerler ilacın toksisitesini ve yan etkilerini azaltır, ilacın etkinliğini uzatır, kontrollü salını sağlayarak sık dozlama yapma zorunluluğunu ortadan kaldırır. Biyolojik olarak inert, yağ absorblama kapasitesi yüksek, biyolojik olarak parçalanmayan maddelerdir. Süspansiyon polimerizasyonu ile elde edilirler. Mikrosüngerlerden salınan ilaçlar arasında anti-fungal ilaçlar, kepeğe ve akneye karşı ilaçlar, yumuşatıcılar ve yağlar sayılabilir [41].

#### 2.4.1.4 Nanopartiküller

Nanopartiküller, doğal ya da sentetik yapıdaki polimerlerle hazırlanan, büyüklükleri 10-100 nm arasında değişen partiküler sistemlerdir [36]. Nanopartiküller, nanoküre ve nanokapsül olarak da isimlendirilebilir. Şekil 2.7.'de gösterildiği gibi nanoküre de etkin madde matris içinde homojen olarak dağılırken nanokapsülde ise etkin madde bir polimer membranla çevrilidir [44]. Nanopartiküller biyoloji, fizik ve kimyanın mühendislik ile bütünleştirildiği son dönemin en önemli yöntemlerinden biridir. Nanoteknoloji ile yapılmak istenen aynı materyalin minyatürize edilerek fiziksel özelliklerini değiştirmektir. Herhangi bir materyalin parçalanıp boyutları küçüldükçe fiziksel ve kimyasal özellikleri parçalanmamış şeklinden çok daha farklı olmaktadır [43]. Gelişen nanoteknoloji ile birlikte nanokristal, nanopartikül, nanotüp gibi nano boyutlu malzemelerin üretilmesi sağlanmaktadır. Son yıllarda nanopartiküller önem kazanmış ve nanoteknolojinin temelini oluşturmaktadır [45].



Şekil 2.7. Nanokapsül ve nanoküreciğin şematik gösterimi

Nanopartiküllerden istenen özellikler

- İlacı kontrollü olarak salması,
- Etki etmeleri istenen bölgede toplanması,
- Stabilité sorunlarının olmaması,
- Taşıyıcının fizyolojik ortamda parçalanması,

- Parçalanma ürünlerinin toksik olmaması,
- Sterilize edilebilmesi gibi özellikler olarak sıralanabilir.

Nanopartiküller farmasötik endüstride kullanımı araştırmacıların ilgisini geçmektedir. Medikal uygulamalarda kullanılacak olan nanopartiküllerin biyouyumlu ve toksik olmayan özellikte olması önemlidir. Nanopartiküllerin toksisitesini etkileyebilecek birçok faktör olduğu için bunun tahmini de zor olduğundan ilaç taşıyıcı sistemlerin toksikolojik çalışmalarının yapılması gereklidir [46, 47].

## 2.5 Biyomalzemeler ve Biyouyumluluk

Nanoteknoloji, bilişim teknolojilerindeki gelişmelere paralel olarak, üretim yöntemlerinin de geliştirilmesiyle birlikte daha işlevsel biyomalzemeler geliştirilmeye başlanmıştır. Tıbbi uygulamalarda kullanılan biyomalzemeler biyoteknoloji alanında da kullanılmaktadır. Biyomalzemeler, insan vücudunda bulunan dokuların işlevlerini yerine getirmek ya da desteklemek amacıyla kullanılan doğal ya da sentetik malzemelerdir [48]. Biyouyumlu malzemeler, biyomalzeme olarak adlandırılmıştır. Biyouyumluluk; uygulama sırasında malzemenin vücut sistemine uygun cevap verebilme yeteneği olarak tanımlanmıştır [49]. Biyouyumluluğu yüksek olan malzemeler yani biyomalzemeler metaller, seramikler, polimerler ve kompozitler olarak gruplandırılmaktadır [50]. Biyoseramikler biyouyumluluğu çok yüksek olan, vücutta zarar gören veya işlevini yitiren organların onarımı, yeniden yapılandırılması veya yerini alması amacıyla özel olarak tasarlanan seramiklerdir [51, 52]. Alüminyum oksit, biyoaktif cam, karbon ve hidroksiapatit (HA) biyouyumlu seramik malzemelere örnek olarak verilmektedir. Biyomalzemeler içinde hidroksiapatit (HA), yüksek biyouyumluluğu sahiptir [53].

Hidroksiapatit biyouygunluğu ile yapay kemik malzemesi, kemik ve diş implantları, ilaç salımı gibi uygulamalarında kullanılmaktadır [54]. Genellikle ortopedik cerrahi alanında dolgu malzemesi ve kaplama olarak metalik protezlerin biyolojik özelliklerini arttırmak için kullanılmaktadır [55]. Son yıllarda ise araştırmalar hidroksiapatit üzerine ilaç yüklenmesi ve bu ilacın hidroksiapatitten vücuda güvenli şekilde ve kontrollü olarak salınması üzerine yoğunlaşmıştır. Bugüne kadar yapılan çalışmalarda hidroksiapatitin endüstriyel polimerler

vasıtasıyla yapısı bozulmadan gözenekli hale getirilebildiği ve böylece daha çok miktarda ilaç absorplaya bildiğini göstermiştir [3,4]. Yapılan çalışmalarda nano boyutlu hidroksiapatit parçacıklarının farklı tümör türleri üzerinde gelişimi önleyici etki gösterdiği görülmüştür [56]. Bu nedenle, yalnızca hidroksiapatit veya hidroksiapatit içeren kompozit malzemeler kontrollü ilaç salımı uygulamalarında ilaç taşıyıcı ortam olarak tercih edilebilmektedirler [57].

### 2.5.1 Hidroksiapatit (HA)

Hidroksiapatit, kalsiyum fosfat grubunun termodinamik olarak en stabil fazıdır ve çok önemli biyoyumlu bir malzemedir. Biyoseramiklerin apatit grubunun bir üyesidir. Apatit terimi Yunanca'da "apatê" kelimesinden türetilmiş olup, yanıltıcı veya aldatıcı anlamına gelmektedir. Bu isimlendirme apatitlerin biçim ve renk farklılıklarından kaynaklanmaktadır. Kalsiyum fosfat apatitleri  $Ca_5(PO_4)_3X$  formüllü bileşiklerdir.

Formüldeki X;  $F^-$  iyonu olursa fluoroapatit,  $Cl^-$  iyonu olursa kloroapatit ve  $OH^-$  iyonu olursa da hidroksiapatit olarak isimlendirilir [58]. Hidroksiapatit yapısal ve kimyasal olarak az çözünen kalsiyum fosfat tuzları ailesine aittir. Hidroksiapatit genel olarak hekzagonal kristal yapıda bulunur [59].

Hidroksiapatit kimyasal olarak doğal kemik ve dişle benzer mineral bileşenlere sahiptir ve doğal kemiğin yaklaşık olarak ağırlıkça %70 ve hacimce % 50'sidir [60]. Hidroksiapatit mükemmel biyoyumluluğa sahiptir [39]. Yüksek biyoygunluğu, kemiğe bağlanma ve osteokondüktif (kemik içine yerleştirildiğinde kemikte var olan hücrelerin malzeme içindeki boşluklara ilerlemesi özelliği) gibi özellikleriyle ortopedi, dişçilikte ve metalik biyomalzemelerin kaplanmasında yaygın olarak kullanılmaktadırlar [39, 60]. Son yıllarda ise fiziksel ve kimyasal özellikleri, yüksek yüzey etkileşim özellikleri, biyoyumluluğu ile ilaç taşıyıcı ve ilaç tasınım sistemleri olarak kullanımına ilişkin çalışmalar yapılmaktadır [39]. Hidroksiapatitin fiziksel, kimyasal ve biyolojik özellikleri Çizelge 2.2.'de verilmiştir [61].

Çizelge 2.2. Hidroksiapatitin fiziksel, kimyasal ve biyolojik özellikleri [61]

Özellik	Değer
Molekül formülü	$\text{Ca}_{10}(\text{PO}_4)_6(\text{OH})_2$
Ca/P oranı	1,67
Kristal yapı	Hegzagonal
Yoğunluk ( $\text{g}/\text{m}^3$ )	3,16
Sertlik (HV)	600
Bozunma sıcaklığı ( $^{\circ}\text{C}$ )	>1000
Erime noktası ( $^{\circ}\text{C}$ )	1614
Biyoaktiflik	Yüksek
Biyouygunluk	Yüksek
Biyobozunma	Düşük
Hücreyel uygunluk	Yüksek
Kemik iletkenliği	Yüksek

### 2.5.1.1 Hidroksiapatitin Kullanım Alanları

Hidroksiapatit çok farklı alanlarda büyük ilgi gören bir bileşendir. Kemik minareli yapısına benzerliği, toksik olmaması, sert ve yumuşak dokulara uygunluğu bu ilginin sebeplerindendir [62, 63]. Hidroksiapatit kemikte oluşan boşlukta dolgu materyali olarak, kırık kemik onarımında kemikteki hasarı kapmak için köprü olarak, dişçilikte diş kökünü beslemede ve implant kaplamalarında kullanılmaktadır. Hidroksiapatit yumuşak dokuya bağlanarak yapışır ve implantın kaymasını engeller ve ayrıca vücudun implantı yabancı madde olarak algılanmamasını sağlar. Bu durum ise vücudun implantta karşı olumsuz bir reaksiyon göstermesini engeller. Bununla birlikte kemikte oluşmuş olan boşluğu doldurarak boşluktaki ödem oluşumunu ve boşluğa yumuşak dokunun girmesini engeller. Bir başka önemli görevi de kalsiyum ve fosfat kaynağı olmasıdır [64].

Ayrıca hidroksiapatit kontrollü ilaç salımında da kullanılmaktadır. İlaçları kapsül halinde taşımak için tanecik, membran veya gözenekli yapı formlarında doğal veya sentetik bozunabilir polimerler ve biyoaktif seramikler gibi çeşitli taşıyıcılar geliştirilmiştir. Seramik bazlı olan hidroksiapatit, bu taşıyıcılar arasında biyouygunluğu nedeni ile ilaç taşıyıcı sistem

olarak ilgi görmektedir [65]. Hidroksiapatit bazlı ilaç taşıyıcı sistemler Çizelge 2.3.'de verilmiştir. Hidroksiapatitin, gözenekli yapısı, yüksek doku uyumluluğu, yüksek adsorpsiyon özellikleri nedeniyle kontrollü ilaç salımında kullanıma uygun olduğu görülmüştür [66]. Son zamanlarda da hidroksiapatit veya trikalsiyum fosfat seramiklerinin kullanıldığı çalışmalara önem verilmiştir. Hidroksiapatitin ilaç salımında taşıyıcı olarak kullanıldığı çalışmalar bulunmaktadır. Örnek olarak büyüme hormonları, kemik rejenerasyon prosesini arttırmak için hidroksiapatit yüzeyine önce adsorblanmış daha sonra da desorplanmıştır. Bu tür kompleksler steroidlerin, antibiyotiklerin, aspirinin, komadinin, proteinlerin, hormonların, antikanser ilaçlarının taşınması için kullanılabilir [66-68]. Vücut tarafından kabul edilebilirliği yüksek, vücuda alındığında zararlı hiçbir kimyasal madde bırakmayacak olan hidroksiapatitin, ilaç aktif maddesi adsorpsiyon özelliği, farklı sentez yöntemleri ile arttırılarak kontrollü ilaç salımı için ideal hale getirilebilir [66].

Çizelge 2.3. Hidroksiapatit bazlı ilaç taşıyıcı sistemler [69]

Hidroksiapatitin fiziksel formu	İlaç	İlaç immobilizationu metodu	References
<b>Gözenekli seramik</b>	Ibuprofen	İslatma	Oner et al. (2011)
	Cisplatin	İslatma	Netz et al. (2001)
	Tetracycline HCl	Birleştirme	Kim et al. (2004)
	Dexamethasone, Fluorescein isothiocyanate	Enkapsilasyon, İslatma	Son et al. (2011)
	Ibuprofen-lysine ve hydrocortisone Na-succinate	Emdirme	Palazzo et al. (2005)
	Pentoxifylline	Dolgu	Szymura-Oleksiak et al. (2001)
	Methotrexate	Vakum emdirme	Itokazu et al. (1999)
	Lidocaine	Vakum emdirme	Loca et al. (2011a,b)
	Doxorubicin	Vakum emdirme	Pelss et al. (2011)
	Gentamicin	Vakum emdirme	Loca et al. (2011ab)
<b>Mikropartikül, granül ve nanopartikül</b>	Testosterone enanthate, cyclosporin A, human serum albumin	İslatma, adsorption	Mizushima et al. (2006)
	Vancomycin	İslatma	Lin et al. (2013)
	Carvedilol	Daldırma / çözücü buharlaştırma	Zhao et al. (2011a, b,c,d)
	5-Fluorouracil	Püskürtmeyle kurutma	Santos et al. (2009)
	Doxycycline HCl	İslatma adsorpsiyon	Wang et al. (2010)
	Ibuprofen	İslatma adsorpsiyon	Baradari et al. (2012)
	Bovine serum albumin	İslatma adsorpsiyon	Wu et al. (2012)
	Dexamethasone	Vakum emdirme	Hong et al. (2011)
	Human serum albumin	Vakum emdirme	Paul and Sharma (1999)
	Ibuprofen	İslatma	Yang et al. (2008)
	Cytochrome, bovine serum albumin	Adsorpsiyon	Ishihara et al. (2010)
	Bovine serum albumin ve lysozyme HCl	Adsorpsiyon	Tomoda et al. (2010)
	Vancomycin	Enkapsilasyon	Ye et al. (2010)
<b>Sıkılaştırılmış tablet</b>	Riboflavine sodium phosphate, metoprolol tartrate	İslatma, adsorpsiyon	Cosijns et al. (2007)

### 2.5.1.2 Hidroksiapatit Hazırlama Yöntemleri

Hidroksiapatitin hazırlanması kuru metot ve yaş metot olmak üzere iki ana yöntem altında incelenmektedir.

- **Kuru Metot**

Kalsiyum/Fosfor (Ca/P) molar oranı 1,67 olan hidroksiapatit üretimi için en çok kullanılan yöntemdir. Kuru metoda yüksek sıcaklık ve uzun ısı işlem süresi gerektirir. Bu yöntemle homojen kompozisyonlara ulaşmak çok güçtür. Oluşan tozların sinterlenebilirliği düşük olur ancak stokiometrik oranda ve iyi kristalize edilmiş ürün elde edilebilir [64].

- **Yaş Metot**

Yaş metot ise hidroksiapatitin Ca / P oranının 1,67' den düşük olduğu durumlarda kullanılır. Yaş metotta uygulama kolaylığı olarak özel ekipmana yüksek sıcaklık fırınlarına ihtiyaç yoktur ve bu sebeplerden dolayı daha çok tercih edilmektedir. Yaş metotla hidroksiapatit üretimi 4 sınıfta toplanabilir; [70]

- i. Çöktürme yöntemiyle nano boyutta hidroksiapatit üretimi
- ii. Kalsiyum fosfatın sulu çözeltilerinden çöktürülerek hidroksiapatit oluşumu
- iii. Kalsiyum fosfatın katı hal reaksiyonuyla hidroksiapatit oluşumu
- iv. Sol-jel metoduyla hidroksiapatit kaplama üretimi

Kimyasal çöktürme yönteminde ortamın pH'ı 7'den büyük olacak şekilde  $Ca^{2+}$  ve  $PO_4^{3-}$  iyonlarını içeren bileşiklerin sulu çözeltileri karıştırılarak hidroksiapatit çökeltisi elde etme prensibine dayanmaktadır. En sık kullanılan kalsiyum kaynakları  $Ca(Cl)_2$ ,  $Ca(NO_3)_2$ ,  $Ca(OH)_2$ ,  $CaCO_3$ ,  $CaSO_4 \cdot 2H_2O$  ve  $(CH_3COO)_2Ca$  olurken, fosfor kaynakları olarak da  $H_3PO_4$ ,  $NH_4H_2PO_4$ ,  $Na_3PO_4$  ve  $K_3PO_4$  kullanılmaktadır. Çöktürme prosesinin ilk aşamasında, çökelti bileşimi hidroksiapatit' tan farklılık gösterse de, uygun koşullarda bekletilmesi sonucunda Ca/P oranı artmakta ve hidroksiapatit kristalleri oluşumu gerçekleşmektedir. Çöktürme prosesinin hızı başlangıçtaki tuz konsantrasyonu, karıştırma sırası ve hızı, çözelti pH'ı, reaksiyon sıcaklığı ve bekletme süresi gibi birçok faktörden etkilenmektedir [71].

### 2.5.1.3 Hidroksiapatit ile Yapılan İlaç Salım Çalışmalarına Örnekler

2002 yılında Willie ve arkadaşlarının yapmış oldukları çalışmada seramik hidroksiapatit mikrokürelerine insülin yerleştirilerek PEVAc (polietilenvinilasetat) ile kaplanmışlardır. Daha sonra mikrokürelerin salınım cihazı ile ilaç salımının ilk başta hızlı bir şekilde daha sonra ise azalan bir şekilde sürekli olarak arttığını belirlemişlerdir. Salım cihazı



kullanılmayan durumda ise başlangıçta hızlı salım olduğu ancak daha sonra bunun azaldığını görmüşlerdir [72].

2003 yılında Matsumoto ve arkadaşları hidroksiapatit parçacıklarının, proteinin kontrollü salımında kullanımını incelemişlerdir ve bu çalışma ile protein sitokrom C'nin, farklı sıcaklıklarda üretilmiş hidroksiapatit parçacıklarına adsorpsiyonunu araştırmışlardır. Büyüme faktörü proteini olan sitokrom C' in hidroksiapatit parçacıklarına adsorpsiyonunu 40 °C, 60 °C ve 80 °C 'deki sıcaklıklarda yaş yöntemle sentezlemişler. Çalışmanın sonucunda farklı sıcaklıklarda sentezlenen hidroksiapatit parçacıklarının sentez sıcaklığına bağlı olarak adsorbe ettiği protein miktarının, spesifik yüzey alanının ve kristallik değerinin değiştiği gözlemlenmiştir. Sıcaklığa bağlı olarak kristallik derecesi azaldıkça, hidroksiapatitlerin spesifik yüzey alanında artış olduğunu göstermişlerdir. Parçacıkların spesifik yüzey alanı arttıkça hidroksiapatit tarafından adsorbe edilen protein miktarının arttığını belirlemişlerdir [72].

2004 yılında Larena ve arkadaşları, sitozan-hidroksiapatit malzemelerden oluşan ilaç taşıyıcısına yapılan farklı sterilizasyon işlemlerinin ibuprofen ve salisilik asit salımına etkilerini incelemişlerdir. Yapılan çalışmada, sterilizasyon işlemi sırasında kompozit malzemelerin yüzeylerinde oluşabilecek morfolojik değişimlerin ilaç salımına etkisi araştırılmıştır. Larena ve arkadaşları tarafından yapılan çalışmada iki farklı tipte numune kullanılmıştır. Birincisi sadece sitozandan oluşan membran, ikincisi ise sitozan-hidroksiapatit kompozitidir. Numunelere ilaç yüklemeleri sentezleme aşamasında yapılmıştır. İlaç salım deneyleri pH 7 deiyonize suda gerçekleştirilmiştir. İlaç salımları UV spektrofotometresinde ölçülmüştür. Sitozan membranlarda salisilik aside göre ibuprofen salım hızının daha az olduğu tespit edilmiştir. Yapılan bu çalışma sonucunda sterilizasyon işleminin kompozit ve membran tipi malzemelerde ilaç salımını değiştirmediğini bulmuşlardır [73].

Santos ve arkadaşları, püskürtmeli kurutucu kullanarak 5-Florourasil (5-FU) yüklü hidroksiapatit nanoparçacıkları elde etmiş ve ilaç salım profilini incelemişlerdir. Elde edilen parçacıkların XRD karakterizasyonu sonucunda hidroksiapatit ve 5-FU kristallerinin varlığı doğrulanmış, ancak kurutucuda yüksek sıcaklıklara (180 °C) çıkılması durumunda hidroksiapatit yapısında değişim ve 5-FU'da bozunma gerçekleştiği gözlemlenmiştir. İlaç salımına bakıldığında, salınan ilaç miktarı yüklenen ilaç miktarına çok yakın değerde elde edilmiş, bu nedenle hidroksiapatitin 5-FU için uygun bir taşıyıcı olduğu sonucuna varılmıştır. Ancak, salım profilinde ani bir pik gözlenerek tüm ilacın 5 dakika içerisinde

salınması, yalnızca hidroksiapatit taşıyıcı ortam olarak 5-FU'nun kontrollü salımı için yeterli olmadığını göstermektedir [74].

Yapılan başka bir çalışmada ise sürekli antibiyotik salımı için anyonik kolajen: hidroksiapatit kompoziti incelenmişler. Salım çalışmaları 15x3 mm hidroksiapatit: anyonik kolajen kompozit pelletleri hazırlanarak yapılmış ve deneyler 37°C±1°C'de 100 ml PBS çözeltisinde gerçekleştirmişlerdir. 170 saat boyunca belirli aralıklar ile 1 ml örnek alınarak 270,6 nm'de UV-görünür alan spektrofotometresi ile antibiyotik konsantrasyonu belirlemişler ve sonuç olarak; hidroksiapatit: anyonik kolajen kompozitinin kemik iliği iltihabı tedavisinde etkili olabileceğini belirlemişlerdir.

## 2.6 Nanopartiküller ile Yapılan Biyoaktivite Çalışmaları

Biyolojik uyum için; malzemenin kimyasal yapısı, restorasyonun tasarımı, elde edilme yöntemleri, mekanik özellikleri, doku ile temasının şekli ve dokunun özellikleri gibi birçok faktörün bir arada uyum içerisinde olması gereklidir. Biyolojik uyum özelliği olmayan materyaller doku reaksiyonuna yol açmaktadırlar. *In-vitro* koşullarda kullanılması düşünülen materyallerin vücut dokuları üzerindeki toksik etkilerinin değerlendirilmesi ve oluşturabilecekleri biyolojik reaksiyonların taklit ve tahmin edilebilmesi amacı ile *in-vitro* biyoyumluluk testleri geliştirilmiştir [75,76]. *In-vitro* biyoyumluluk testlerinde; vücut dokularının üzerine veya içerisine yerleştirilen malzemelere karşı gelişecek olan biyolojik reaksiyonların test ortamında oluşturulması amaçlanmaktadır [75].

Çözünmüş ilaç hapsedilmesi, kapsüllenmesi ya da eklenmesi nanopartikül matrislerine yapılabilmektedir. Nanokapsüller sistemlerde tek bir polimer membran ile içerisindeki boşluğa ilaç hapsedilebilir [77]. İlacın hapsedileceği sistemde kullanılacak nanopartiküllerin canlı sistemler üzerinde meydana getirebileceği etkilerinin araştırılması gerekmektedir. Nanopartiküllerin ayrıntılı olarak araştırılması bu nano yapıların kullanımının ne kadar güvenilir olduğunun tespit edilebilmesi için oldukça önemlidir. Bu nedenle kullanılacak nano yapılarda bazı biyolojik aktivite çalışmalarının yapılması avantaj sağlayacaktır [78].

### 2.6.1 Antioksidan Aktivite

Moleküler biyoloji ve biyoteknoloji alanlarında en önemli ve temel çalışmalardan birisi de çeşitli materyal ve bileşiklerin antioksidan potansiyelleridir. Antioksidanlar, serbest radikalleri giderici etkileri sayesinde biyolojik süreçlerde biyosistemler için oldukça önemli bir role sahiptir. Antioksidan aktivite çalışmaları canlı sistemler içerisinde biyomoleküllerin araştırılacak materyaller ile aralarındaki reaksiyonun gözlenmesine izin verir [79].

Vücudumuzda bulunan biyomoleküller her gün oksijen gerektiren birçok reaksiyona uğrarlar. Reaksiyon ürünü olarak serbest radikaller ortaya çıkar. Serbest radikaller çok reaktiftir ve hücre hasarlarına neden olurlar. Çevremizdeki oksitleyici ajanlar serbest radikallerle birleşip hücrelerimize zarar vererek yaşlanmaya ve kronik hastalıklara neden olurlar. Antioksidanlar serbest radikalleri zarar vermeden durdurabilir ve oksidatif reaksiyonları engelleyebilirler [80]. Antioksidanlar biyolojik sistemlerdeki serbest radikallerin düzeyini regüle ederler. Böylece zarar vermeden yararlı biyolojik fonksiyonları yerine getirmeleri sağlanır. Kaçınılmaz olarak vücuttaki kritik moleküllere zarar verilir ve böylece hücre yaşamını sürdürmek için onarım sistemlerine gerek duyar [81]. Antioksidantlar, hem doğrudan hem de dolaylı olarak ilaçların, karsinojenlerin ve bazı toksik radikal reaksiyonlarının istenmeyen etkilerine karşı hücreleri korurlar. Vitamin A, C, E, beta-karoten, melatonin, flavonoidler, fitoöstrojenler, metiyonin, bu gruba giren antioksidantlar arasındadır [82].

#### - *Serbest radikaller*

Canlı sistemlerinde kendi içlerinde serbest radikal oluşumuna neden olan faktörlerin yanında çevrede maruz kaldıkları kimyasal maddeler ve radyasyon gibi diğer faktörlerde bulunmaktadır. Bu faktörler canlı metabolizmasında sürekli olarak oksidasyon olayları meydana gelmekte, dışarıdan alınan reaktif oksijen maddeler de bu oksidasyon olaylarını hızlandırmaktadır. Serbest radikallerin artışı hücre hasarına neden olarak birçok hastalığa sebep olurlar. Antioksidanlar oksidan maddeleri engelleyen seviyede olmalıdır. Serbest radikallerin oluşumunun önlenmesinden ve giderimin den antioksidan maddeler sorumludur [83].

### 2.6.1.1 Antioksidatif Etkinin Belirlenmesinde Kullanılan Yöntemler

Bazı bileşikler antioksidatif özelliğe sahiptir ve bileşiğin antioksidatif etkisinin belirlenmesi için çeşitli yöntemler kullanılmaktadır. DPPH (1,1-diphenyl-2-picrylhydrazil) giderim aktivitesi bunlardan biridir. Aynı zamanda hücrelerdeki total antioksidan seviyesi ve total oksidan seviyesi de belirlenebilmektedir.

#### - *Serbest Radikal aktivitesinin DPPH ile giderimi*

Yöntem DPPH radikallerinin antioksidan moleküllerin belirlenmesi için kullanılmıştır. Yöntem DPPH çözeltilisinin hidrojen atomu verebilen madde (antioksidan) ile elektronunun yer değiştirmesi sonucunda başlangıçtaki mor menekşe renginin kaybı ile 517 nm' de sarı renkli indirgenmiş form oluşmasına dayanmaktadır. Antioksidan özelliği araştırılan maddenin DPPH ile reaksiyon hızı farklı olmaktadır. Bunun nedeni kimyasal yapısındaki hidroksil grubu ve molekül büyüklüğü ile ilgilidir [84].

#### - *Total Antioksidan Seviye (TAS)- Total Oksidatif Seviye (TOS)- Oksidatif Stres İndeksi (OSİ)*

Birçok oksidan ve antioksidan molekülün serum veya plazma düzeylerini ölçen çeşitli analitik yöntemler bulunmaktadır (16). Ancak bu moleküllerin ayrı ayrı ölçülmesi hem zaman alıcı, hem de zordur. Ayrıca ekonomik yönden de zorlayıcıdır. Bu nedenle “total antioksidan durum” ya da “total oksidan durum” ölçümü bir örnekteki oksidan ve antioksidan moleküllerin ayrı ayrı ölçülmesinden daha pratiktir [85, 86]. Oksidatif stresin toplam değeri; total oksidan seviye (TOS) olarak ifade edilir. Bu durum, aşırı reaktif oksijen ve/veya nitrojen türlerinin üretimi veya antioksidan tampon mekanizmasının eksikliği sonucu oluşur. Plazma ve vücut sıvılarında bulunan bütün antioksidanların toplam etkisini TAS yansıtır. TAS, biyolojik sıvılarda mevcut antioksidanların membranları ve diğer hücrel komponentleri oksidatif hasara karşı koruma kapasitesinin bir göstergesi olarak kabul edilmektedir. Oksidatif Stres İndeksi (OSİ) Organizmadaki oksidan/antioksidan dengeyi gösterir. TOS değerlerinin TAS değerlerine oranlanarak bulunur ve oksidatif stresin derecesinin göstergesi olarak kullanılır [87].

### - *DNA Hasarının Belirlenmesinde Comet*

Sentezlenen nanopartiküllerin toksisite potansiyellerinin araştırılması önem taşımaktadır. Bazı standart testlere ihtiyaç duyulmaktadır. Bu nedenle genotoksik etkilerinin araştırılması oldukça önemlidir. DNA hasar tespiti genotoksik etkinin belirlenmesinde en sık başvurulan yöntemlerden birisidir. DNA hasarını belirlenmesinde ise en sık kullanılan yöntem Comet (tek hücre jel elektroforezi) analizidir [72].

### **2.6.2 Antimikrobiyal aktivite**

Sentezlenen nanopartiküllerin antimikrobiyal aktivitesi de belirlenebilmektedir. Sentezlenen bazı partiküller antibiyotik özeliğe sahipken bazılarında da sonradan antibakteriyel özellik kazandırılabilir. Bu gibi nedenlerden dolayı nanopartiküllerin antimikrobiyal testleri yapılmaktadır. Antimikrobiyal; bakteri, mantar, virüs gibi mikroorganizmaları öldüren veya büyümelerini engelleyen maddeye denir. Antimikrobiyaller ilk olarak Pasteur ve Joubert tarafından bir bakterinin diğer bakterinin büyümesini durduğunu gözlemlenmesi ile keşfedilmiştir. Antibiyotikler sadece bir mikroorganizma tarafından üretilen, başka bir mikroorganizmanın büyümesini durduran veya mikroorganizmayı öldüren maddelerdir. Antibiyotik kavramı bakteriyel enfeksiyonu iyileştiren herhangi bir ilaç için kullanılır [88].

Antimikrobiyaller sadece antibiyotikleri kapsamaz, sentetik olarak oluşturulan bileşikler de kapsarlar. Birçok kullanım alanına sahip olan nanopartiküller bazı mikroorganizmalar üzerinde öldürücü etki yaratmaktadır. Çalışılacak olan nanopartikülün bir mikroorganizma üzerindeki etkileri test edilebilmektedir. Bu durum kullanılacak olan nanopartikülün amacına yönelik olarak avantaj ve dezavantaj sağlayabilmektedir [78].

### 3. MATERYAL – METOT

#### 3.1 Materyal

##### 3.1.1 Bitkisel Materyal Temini

Morfin ve noskapince zengin haşhaş kapsülleri (MHK-NHK) Afyon Alkaloid Fabrikası İşletme Müdürlüğü'nden 12.08.2017 tarihinde temin edilmiştir (Resim 3.1.). Kapsüller kırılarak tohumlarından ayrılmıştır. Tohumları ayrılan kapsüller oda sıcaklığında karanlık bir odada 15 gün süreyle kurutulmuştur. Ekstraksiyon öncesi değirmende 80 mesh tane boyutuna öğütülerek ekstraksiyona hazır hale getirilmiştir.



Resim 3.1. Haşhaş Kapsülü

Morfin Referans Standardı, Amerika Birleşik Devletleri Farmakopesi'nden (USP) temin edilmiştir. Tüm deneylerde kullanılan tüm kimyasallar analitik saflıktadır ve HPLC analizlerinde kromatografik amaçlar için kullanılan tüm çözücüler HPLC saflıktadır. Çalışmada kullanılan tüm kimyasallar Sigma Aldrich'ten satın alınmıştır. Tüm çözeltilerin filtrelenmesi için 0.45 µm membran filtre (Millipore, Bedford) kullanılmıştır.

### 3.1.2 Çalışmada Kullanılan Cihazlar

Çalışmada kullanılan cihazlar Çizelge 3.1.1.'de verilmiştir.

Çizelge 3.1.1. Çalışmada kullanılan cihazlar

<b>Cihazlar</b>	<b>Marka-Model</b>
Ultrasonik Su Banyosu	Wisebath ( 50 kHz frekanslı)
Santrifüj	Awel (MF20-R)
UV-Spektrofotometre	Shimadzu ( UV-100 240V)
Etüv	Incubator (DHP-9052)
Vorteks	Scilogex (MX-S)
FTIR	Perkinelmer (Spectrum two )
HPLC	Agilent (Infinity)
Mekanik Karıştırıcı	WiseStir (Wisd)
Hassas tartı	Mettler Toledo (ME203)
Hotplate	Prowhite
Elektroforez	Cleaver (CSL-COM20)
Mikroskop	Bab-(TAM-F)
Orbital çalkalatıcı	Biosan (ES-20)
ICP-OES	Thermo (İcap Q )
SEM	Phenom (ProX )

### 3.1.3 Çalışmada Kullanılan Çözeltiler

#### - Ekstraksiyon için Kullanılan Çözelti

- **% 70'lik metanol hazırlanması;** 700 mL metanol ile 300 mL deiyonize su karıştırılarak hazırlanmıştır.

#### - Toplam Fenolik Madde Miktarının Belirlenmesi için Kullanılan Çözeltiler

- **% 0,75 Sodyum karbonat ( $Na_2CO_3$ );** 100 mL lik bir behere 7,5 gr  $Na_2CO_3$  tartılmış ve 50 mL kadar deiyonize su eklenerek çözülmüştür. Çözelti 1 L lik balona aktarılmış ve hacim suyla 1 L'ye tamamlanmıştır.
- **Gallik asit çözeltisi;** Bir behere 100 mg gallik asit tartılmıştır ve 50 mL'ye kadar metanol eklenerek çözünmesi sağlanmıştır. Çözünme sağlandıktan sonra hacim 100 mL'ye metanol ile tamamlanmıştır. 1000 ppm'lik stok çözelti hazırlanmıştır. Stok çözeltilerinden standart eğrilerinin oluşturulması için 50 ppm, 100 ppm, 150 ppm, 200 ppm, 250 ppm'lik çözeltiler oluşturulmuştur.

#### - Toplam Flavonoid Madde Miktarının Belirlenmesi için Kullanılan Çözeltiler

- **Kuarsetin Çözeltisi;** Bir behere 100 mg kuarsetin tartılmıştır ve 50 mL'ye kadar metanol eklenerek çözünmesi sağlanmıştır. Çözünme sağlandıktan sonra hacim 100 mL'ye metanol ile tamamlanmıştır. 1000 ppm'lik stok çözeltisi hazırlanmıştır. Stok çözeltilerinden standart eğrilerinin oluşturulması için 50 ppm, 100 ppm, 150 ppm, 200 ppm ve 250 ppm'lik çözeltiler oluşturularak oluşturulmuştur.
- **% 5 Sodyum Nitrit ( $NaNO_2$ );** 50 mL'lik behere 5 gr  $NaNO_2$  tartılmış 50 mL kadar deiyonize su eklenerek çözünmesi sağlanmıştır. Çözelti 100 mL'lik balon jöjeye aktarılarak hacim 100 mL'ye deiyonize su ile tamamlanmıştır.
- **%4 Sodyum hidroksit ( $NaOH$ ) çözeltisi;** 50 mL'lik behere 4 gr  $NaOH$  tartılmış 50 mL'ye kadar deiyonize su eklenerek çözünmesi sağlanmıştır. Çözelti 100 mL'lik balon jöjeye



aktarılarak hacim 100 mL'ye deiyonize su ile tamamlanmıştır.

- **% 10 Alüminyum klorür ( $AlCl_3$ );** 50 mL'lik behere 100 gr  $AlCl_3$  tartılmış 50 mL'ye kadar deiyonize su eklenerek çözünmesi sağlanmıştır. Çözelti 100 mL'lik balon jojeye aktarılarak hacim 100 mL'ye deiyonize su ile tamamlanmıştır.

- **Fenolik Asit İçeriğinin HPLC ile Belirlenmesi için Kullanılan Çözeltiler**

- **Mobil Faz-A;** Mobil Faz A olarak % 0,02 Trifloroasetik asit (TFA) içeren su kullanılmıştır.
- **Mobil Faz-B;** Mobil Faz B olarak % 0,02 TFA içeren metanol kullanılmıştır.

- **Hidroksiapatit Nanopartiküllerin Oluşturulması için Kullanılan Çözeltiler**

- **0,1 M Hidroklorik asit (HCl) çözeltisi;** 2 L'ye iyonize su içerisine 1,6 mL HCl ilave edilerek hazırlanmıştır.
- **% 16,4 Kalsiyum Nitrat ( $Ca(NO_3)_2$ ) çözeltisi;** Behere 41 gr  $Ca(NO_3)_2$  tartılarak 50 mL'ye kadar etanol eklenerek çözünmesi sağlanmıştır. Çözelti 250 mL'lik balon jojeye aktarılarak hacim 250 mL'ye tamamlanmıştır.
- **% 4,72 Amonyum Fosfat ( $(NH_4)_3PO_4$ ) çözeltisi;** Behere 11,8 gr  $(NH_4)_3PO_4$  tartılarak 50 ml'ye kadar deiyonize su eklenerek çözünmesi sağlanmıştır. Çözelti daha sonra 250 mL'lik balona aktarılarak hacim 250 mL deiyonize su ile tamamlanmıştır.

-***In-vitro* Mide Ortamının Oluşturulması için Kullanılan Çözeltiler**

- **pH' ı 1,2 olan NaCl/HCl Çözeltisi;** Çözeltiyi hazırlamak için 400 mg NaCl den alıp 200 mL deiyonize su içerisinde çözüldürülmüştür. Bu çözeltiye HCl damlatarak pH 1,2'ye düşürülerek hazırlanmıştır.
- **pH'ı3 olan Asetik Asit ( $CH_3CO_2H$ )/ Sodyum Asetat ( $CH_3COONa$ ) Çözeltisi;** 0,1 M 982,3 mL  $CH_3CO_2H$  ve 0,1M 17,7 mL  $CH_3COONa$  çözeltisi karıştırılarak 200 mL pH'ı3 olan  $CH_3CO_2H$ /  $CH_3COONa$  çözeltisi hazırlanmıştır.

0,1 M CH<sub>3</sub>COONa çözeltisinin hazırlanması: 50mL'lik behere 0,8 gr CH<sub>3</sub>COONa tartılıp üzerine 30 mL deiyonize su ilave edilerek ultrasonik banyoda çözünmesi sağlanmıştır. 500 mL lik balon joje' ye aktarılarak hacim de iyonize su ile 500 mL ye tamamlanmıştır.

0,1M CH<sub>3</sub>CO<sub>2</sub>H çözeltisinin hazırlanması; 500 mL lik balon joje yarısına kadar de iyonize su ile doldurulup 2,86 mL glasiyel asetik asit ilave edilmiştir. Daha sonra hacim 500 mL'ye deiyonize su ile tamamlanmıştır.

- ***In-vitro* İnce Bağırsak Ortamının Oluşturulması için Kullanılan Çözeltiler**
- ***pH' ı 7,4 olan PBS ortamı***; *In-vitro* ince bağırsak ortamının oluşturulması için 10X PBS stok çözeltisi hazırlanmıştır. Çizelge 3.1.2.'deki tartılan maddeler 25 mL distile su içerisinde çözündürülmüştür. Çözelti daha sonra 50 mL'lik balon jojeye aktarılarak hacim 50 mL'ye distile su tamamlanmıştır. Çözeltinin pH sı 7,4'e ayarlanmıştır. Çalışmalarda 1X PBS kullanılmıştır. Her çalışmadan önce 10X PBS ten 1X'lik çözelti taze olarak hazırlanmıştır. (1 mL stok PBS + 9 mL dH<sub>2</sub>O)

Çizelge 3.1.2. 10X PBS stok çözeltisi

Kullanılan malzemeler	Miktar
NaCl (Sodyum klorit)	4 gr
KCl (Potasyum klorit)	0,1 gr
H <sub>2</sub> KPO <sub>4</sub> P (Potasyum fosfat monobazik)	0,1 gr
HNa <sub>2</sub> O <sub>4</sub> P (Disodyum hidrojen fosfat)	0,575 gr
C <sub>4</sub> H <sub>11</sub> NO <sub>3</sub> .HCl, MW= 157,6 (Trizma hidroklorit )	1,6 gr
Distile su	50 mL

- **Antimikrobiyal Etkinin Belirlenmesinde Kullanılan Besiyerleri**

Antimikrobiyal aktivite çalışmasında kullanılan besiyerleri;

- **Mueller Hinton agar (MHA) (Merck)**

Et infüzyonu	2,0 gr/L
Kazein hidrolizatı	17,5 gr/L
Nişasta	1,5 gr/L
Agar	13,0 gr/L
Distile su	1000 mL

Otoklavda 121 °C’de 15 dakika steril edildikten sonra antimikrobiyal aktivite analizi için kullanılmıştır.

- **Nutrient Broth (Merck)**

Peptone from meat	5,0 gr/L
Meat extract	3,0 gr/L
Distile su	1000 mL

Otoklavda 121 °C’de 15 dakika steril edildikten sonra antimikrobiyal aktivite analizi için kullanılmıştır.

- **Comet Deneyinde Kullanılan Çözeltiler**

- **Slayt Hazırlama:** % 1 NMA (Normal Melting Agarose) ;0,02 gr NMA ile 2 mL 1X lik PBS bir cam tüp içerisinde berraklaşıncaya kadar kaynatılmış ve 50-60 °C’ye kadar soğuması beklendikten sonra lamlara yayılmıştır.

% 0.8 LMA (Low Melting Agarose); 0,016 gr LMA ile 2 mL 1X PBS bir cam tüp içerisinde berraklaşıncaya kadar kaynatılmıştır. Sıcaklık 37 °C’ye düştükten sonra lamlara yayılmıştır.

- **10X PBS (Fosfat Tampon Çözeltisi) (Stok) İv-vitro** ince bağırsak ortamının oluşturulması için 10X PBS stok çözeltisi Comet deneylerinde farklı aşamalarında kullanılmıştır.

- **Stok Lizis Çözeltisi;** Lizis çözeltisi Çizelge 3.1.3.'deki maddeler tartılarak 100 mL su içerisinde çözündürülmüştür. Çözelti 500 mL'lik balon jøjeye aktarılarak hacim distile su ile 500 mL'ye tamamlanmıştır. Hazırlanan lizis çözeltisi +4 °C'de saklanmıştır.

Çizelge 3.1.3. Lizis çözeltisi içeriği

Kullanılan malzemeler	Miktar
2.5 M NaCl	73,5 gr
100 mM EDTA C <sub>10</sub> H <sub>14</sub> N <sub>2</sub> Na <sub>2</sub> O <sub>8</sub> .2 H <sub>2</sub> O MW= 372.24 (Etilendiamin tetraasetik asit disodyum tuzu dihidrat)	18,6 gr
10 mM NH <sub>2</sub> C(CH <sub>2</sub> OH) <sub>3</sub> MW= 121,14 (Trizma base)	0,6 gr
Distile su	500 mL

- **Elektroforez Tamponu;** Çizelge 3.1.4.'de maddeler tartılarak 1000 mL distile su içerisinde çözündürülerek hazırlanmıştır. Elektroforez tampon çözeltisi daha sonra (pH >13) +4 °C'de saklanmıştır.

Çizelge 3.1.4. Elektroforez de kullanılan tampon çözelti içeriği

Kullanılan malzemeler	Miktar
300 mM NaOH (Sodyum hidroksit)	12 gr
1 mM EDTA C <sub>10</sub> H <sub>14</sub> N <sub>2</sub> Na <sub>2</sub> O <sub>8</sub> .2H <sub>2</sub> O, MW= 372.24 (Etilendiamin tetraasetik asit disodyum tuzu dihidrat)	0.36 gr
Distile su	1000

- **Nötralizasyon Tamponu (0,4 M Tris pH 7,5);** Nötralizasyon tampon çözeltisi içeriği Çizelge 3.1.5.'deki maddeler tartılarak 500 mL distile su içerisinde çözündürülmüştür. Çözelti 1000 mL'lik balon jøjeye aktarılarak hacim 1000 mL'ye tamamlanmıştır.

Çizelge 3.1.5. Nötralizasyon çözeltisi içeriği

Kullanılan maddeler	Miktar
Distile su	1000 mL
$\text{NH}_2\text{C}(\text{CH}_2\text{OH})_3$ M W= 121,14 (Trizma base)	48,5 gr

- **Boyama Çözeltisi;** 10 mg EtBr + 50 mL  $\text{dH}_2\text{O}$  stok çözelti olarak hazırlandıktan sonra alüminyum folyo ile kapatılarak +4 °C’de saklanmıştır. Çalışmada 1mL stok EtBr + 9 mL  $\text{dH}_2\text{O}$  olacak şekilde hazırlanıp alüminyum folyo ile sarılmıştır.

## 3.2 Metot

### 3.2.1 Ultrasonik Destekli Metanol Ekstraksiyonu

Kurutulmuş ve öğütülmüş morfince zengin haşhaş kapsülü (MHK) ve noskapince zengin haşhaş kapsüllerinden (NHK) erlenmayerlere 1'er gr tartılarak üzerlerine 30 mL %70'lik metanol ilave edilmiştir.

Metanol ilavesinden sonra erlenmayerler ultrasonik banyoda oda sıcaklığında 30 dk ekstrakte edilmiştir. 30 dk sonunda ekstraktlar beyaz bant süzgeç kâğıdı (MN 617 Ø 110 mm) ile filtre edilmiştir (Resim3.2.1.). Ekstraktlar antioksidan aktivite analizleri için kullanılmıştır.



**Resim 3.2.1.** Ekstraktların filtrasyonu

### 3.2.2 Haşhaş Kapsüllerindeki Antioksidan Madde İçeriği ile İlgili Çalışmalar

#### 3.2.2.1 Toplam Fenolik Madde Miktarı Tayini

Metanol ekstraktları içerisindeki toplam fenolik madde miktarını belirlemek için Folin–Ciocalteu yöntemi kullanılmıştır. 10 mL'lik deney tüplerine 1000 µL metanolik bitki ekstraktı, 500 µL folin ciocalteu regant çözeltisi, 4,5 mL deiyonize su, 4 mL sodyum

karbonat (75 gr/L) çözeltisi eklendikten sonra 30 dk 40 °C sıcaklıkta inkübe edilmiştir. İnkübasyon sonrası absorbansları UV-Spektrofotometre cihazında 765 nm’de okunmuştur.

Gallik asit kalibrasyon çizelgesini oluşturmak için 100 mg gallik asit tartılmış, bir miktar metanol içinde çözülerek hacim 100 mL’ye metanol ile tamamlanmıştır. Böylelikle 1000 ppm’lik gallik asit stok standart çözeltisi elde edilmiştir. Bu stok standart çözeltisi kullanılarak 50, 100, 150, 200, 250 ppm’lik gallik asit standart çözeltileri hazırlanmıştır. UV-Spektrofotometre cihazında 765 nm’de standartların absorbans değerleri belirlenmiştir. Bu kalibrasyon eğrisinden yararlanılarak toplam fenolik madde miktarları mg gallik aside eşdeğer olacak şekilde hesaplanmıştır [89].

### **3.2.2.2 Toplam Flavonoid Madde Miktarı Tayini**

Metanol ekstralarındaki toplam flavonoid içeriği alüminyum klorür kolorimetrik yöntemi ile belirlenmiştir. 0,5 mL ekstrakt metanol ile 1 mL’ye seyreltildikten sonra 4 mL saf su ve daha sonra 0,3 mL % 5 NaNO<sub>2</sub> çözeltisi ile karıştırılmıştır. 6 dakika oda sıcaklığında bekletilmiştir. İnkübasyondan sonra 0,3 mL % 10 AlCl<sub>3</sub> çözeltisi ilave edilerek 4 mL 1 mol/L NaOH çözeltisi ilave edilmiş ve karışımın nihai hacmi, saf su ile 10 mL’ye getirilmiştir. 15 dk inkübasyonu takiben absorbans değerleri UV-Spektrofotometre cihazında 510 nm’de ölçülmüştür. Toplam flavonoid miktarının belirlenmesi için metanol içerisinde 50, 100, 150, 200, 250 ppm’lik kuersetin standart çözeltileri hazırlanmıştır. UV-Spektrofotometre cihazında 510 nm dalga boyunda standart çözeltilerin absorbans değerleri belirlendikten sonra kuersetin konsantrasyonuna karşı absorbans değerleri grafiği çizilmiştir. Toplam flavonoid içeriği kuersetin kalibrasyon eğrisinden hesaplanarak sonuçlar kuru ağırlık başına mg kuersetin eşdeğeri olarak ifade edilmiştir [90].

### **3.2.2.3 Serbest Radikal Giderim Aktivitesi**

Metanol ekstraktlarının serbest radikal giderme aktivitesini belirlemek için Difenil-1-pikrihidrazil (DPPH) yöntemi kullanılmıştır. Yönteme göre, DPPH’ in metanol içerisinde 10<sup>-4</sup> M konsantrasyonda taze çözeltisi hazırlanmıştır. Bu çözeltilerden 1 mL alınarak alüminyum folyo kaplı cam tüplere alınarak Çizelge’de belirtilen miktarlarda bitki

ekstraktlarından ve metanol ilave edilmiştir (Çizelge 3.2.1.). Hacim 4 mL'ye tamamlandıktan sonra 30 dk karanlık ortamda ve oda sıcaklığında bekletilmiştir. İnkübasyon sonrasında Uv-Spektrofotometre cihazında 517 nm dalga boyunda metanole karşı absorbans değeri belirlenmiştir.

DPPH Radikalinin Süpürme Aktivitesi reaksiyonu inhibe etme yüzdesi aşağıdaki formül kullanılarak hesaplanmıştır.

$$\% \text{ Inhibisyon} = [ (AK - A\ddot{O}) / AK ] \times 100$$

AK: Kontrolün Absorbansı; AÖ: Örneğin Absorbansı

Antioksidanların farklı konsantrasyonlarına karşı hesaplanan % inhibisyon değeri ile çizilen grafikten linear regrasyon ile % 50 inhibisyona neden olan antioksidan derişimleri elde edilmiştir. Sonuçlar EC<sub>50</sub> (µg/ml) olarak ifade edilmiştir [84].

Çizelge 3.2.1. DPPH radikali söndürücü kapasite yönteminde kullanılan ekstrakt miktarları

Ekstrakt	Metanol	10 <sup>-4</sup> M DPPH
Kontrol	3 mL	1 mL
10 µL	2,990 mL	1 mL
20 µL	2,980 mL	1 mL
30 µL	2,970 mL	1 mL
40 µL	2,960 mL	1 mL
50 µL	2,950 mL	1 mL
60 µL	2,940 mL	1 mL
70 µL	2,930 mL	1 mL
80 µL	2,920 mL	1 mL
90 µL	2,910 mL	1 mL
100 µL	2,900 mL	1 mL

#### 3.2.2.4 Fenolik Asitlerin HPLC ile Analizi

Metanol ekstraktları enjektör ucu filtre kâğıdı ile tekrardan süzülerek 1,5 mL'lik HPLC viallerine alınmış ve cihaza yerleştirilmiştir. Ekstraktlarındaki fenolik asitlerin miktarı HPLC cihazı ile belirlenmiştir. Çizelge 3.2.2.'de belirtilen koşullara göre analiz gerçekleştirilmiştir [91].



Çizelge 3.2.2. Fenolik asitlerin HPLC analiz koşulları

<b>HPLC Koşulları</b>			
	<b>Gradient koşullar</b>		
	Zaman	Mobil Faz-A	Mobil Faz-B
<b>Kolon:</b> ACE-C18 (5 $\mu$ m, 4,6 mm X 250 mm, ACE) kolon			
<b>Mobil Faz A:</b> % 0,02 TFA (Trifloroasetik asit) içeren su	0	%75	%25
<b>Mobil Faz B:</b> olarak % 0,02 TFA (Trifloroasetik asit) içeren metanol	5	%75	%20
	10	%70	%30
	16	%45	%55
<b>Kolon termostat sıcaklığı</b> 25 °C	18	%45	%55
<b>Enjeksiyon hacmi</b> 10 $\mu$ L	25	%20	%80
<b>Dedeksiyon:</b> 254 nm; vanillik asit 275 nm; gallik ve 320 nm 320 nm kafeik asit, <i>p</i> -kumarik asit ve rosmarinik asit	30	%20	%80
	40	%25	%75

### 3.2.3 Metal Analizi

Öğütülmüş ve kurutulmuş MHK ve NHK erlenmeyerlere 0,5 gr tartılarak üzerine 5 mL nitrik asit eklenmiştir. Hafif çalkalayarak örneklerin ıslanması sağlanmıştır. Çeker ocaktaki manyetik karıştırıcı üzerine erlenmeyerler yerleştirilmiştir. Erlenmeyerlerin üzerine küçük huni yerleştirilmiştir. 90 dk manyetik karıştırıcı üzerinde 5 dk'da bir çalkalayarak belirli bir sıcaklıkta bekleterek nitrik asidin uzaklaştırılması sağlanmıştır. Ortamdan nitrik asidin uzaklaştırılması sağlandıktan sonra bitki içeriği açık sarı renk halini almıştır. Kalan materyalin parçalanması için üzerine 2 mL perklorik asit ilave edilerek tekrardan çeker ocaktaki manyetik karıştırıcı üzerine yerleştirilmiştir. Perklorik asidin beyaz dumanları erlenmeyer içini tamamen doldurduktan sonra en az 30 dk daha yakmaya devam edilmiştir. Yakma sonucunda en az 1 mL perklorik asit kalmıştır ve bitki içeriği de beyaz renk olmuştur. Yakma işleminden sonra soğumaya bırakılmıştır. Soğuma işlemi olduktan sonra erlenmayer 5 mL saf su ilave edilmiş ve çalkalanmıştır. Erlenmayerdeki çözelti beyaz süzgeç kâğıdı ile süzülerek hacim 10 mL'ye tamamlanmıştır. Elde edilen ekstrakt içerisindeki metal içeriği ICP-MS cihazı ile analiz edilmiştir [92].

### 3.2.4 Morfin ve Noskapin Yüklü Hidroksiapatit Nanopartiküllerin Sentezlenmesi

#### 3.2.4.1 Haşhaş Kapsüllerinden Morfin ve Noskapin Ekstraksiyonu, Saflaştırılması

Kurutulmuş ve öğütülmüş MHK ve NHK 250'şer gr cam şişelere tartılmış ve üzerlerine 0,1 M HCl çözeltisi ilave edilerek bir gün bekletilmiştir. Bir gün sonrasında HCl çözeltisi ile ıslatılan MHK ve NHK'ne 500 mL etanol eklenerek 10-15 dk mekanik karıştırıcıda katı-sıvı ekstraksiyon gerçekleştirilmiştir. Karışım beyaz bant filtre kâğıdı ile süzülmüştür. Geriye kalan küspeye 500 mL etanol eklenerek 10-15 dk mekanik karıştırıcıda karıştırılıp, tekrar süzülmüştür. Bu işlem üç kez tekrarlanmıştır. İşlemler sonucunda elde edilen süzüntüler birleştirilmiştir. Birleştirilen süzüntü içerisindeki etanol döner buharlaştırıcıda 40 °C'de vakum altında uçurularak konsantre morfin ve noskapin ekstraktları elde edilmiştir.

Ekstraktların saflaştırılması üç aşamada gerçekleştirilmiştir (Resim 3.2.2.). İlk aşamada bitkisel kaynaklı renk pigmentlerini gidermek amacıyla konsantre ekstrakta aktif karbon eklenmiştir. Konsantre ekstraktlar behere alınmış ve üzerine 10 gr aktif karbon eklenmiştir (Resim 3.2.2. (a)). Aktif karbon eklendikten sonra manyetik karıştırıcıda 60 °C sıcaklıkta 30 dk karıştırılmış ve beyaz bant süzgeç kâğıdı ile süzme işlemi gerçekleştirilmiştir. İkinci aşamada bitki kaynaklı bulanıklık veren maddelerin giderilmesi ve daha berrak bir çözelti elde etmek amacıyla diatome toprak eklenmiştir. Konsantre ekstrakta 10 gr diatome toprak eklenerek manyetik karıştırıcıda 60 °C sıcaklıkta 30 dk karıştırılması sağlanmıştır (Resim 3.2.2. (b)) ve beyaz bant süzgeç kâğıdı ile süzme işlemi gerçekleştirilmiştir. Son aşamada ise bitki kaynaklı yağ, vaks ve tanen gibi maddelerin uzaklaştırılması amacıyla petrol eteri ile sıvı-sıvı ekstraksiyonu yapılmıştır. Bu amaçla konsantre ekstrakta 1:1 oranında petrol eteri ilave edilmiş, 15 dk süreyle karıştırılmış ve ayırma hunisi ile fazların ayrılması sağlanmıştır. İşlem iki kez tekrarlanmıştır (Resim 3.2.2. (c)). İşlemler sonucunda nanopartiküller içerisine hapsedilecek konsantre ekstrakt elde edilmiştir [94].



( a )

( b )

( c )

Resim 3.2.2. Ekstraktların ayrılması ve saflaştırılması (a) aktif karbon, (b) diatometoprak, (c) sıvı-sıvı ekstraksiyon

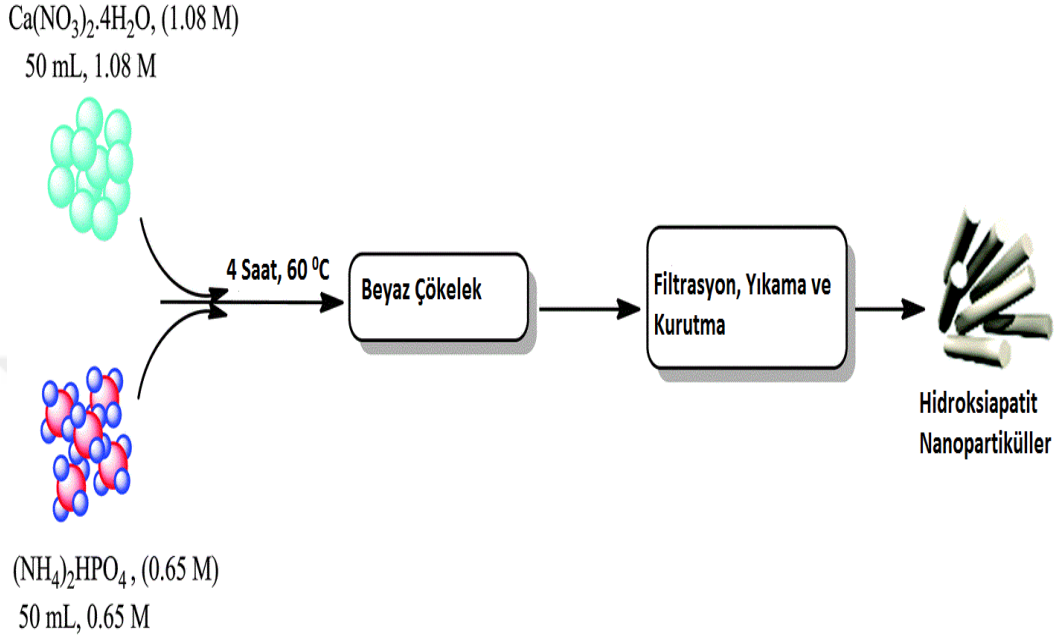
### 3.2.4.2 Boş, Morfin ve Noskapin Yüklü Hidroksiapatit Nanopartiküllerinin Sentezlenmesi

41 gr  $\text{Ca}(\text{NO}_3)_2$  tartılarak bir miktar etanol içerisinde çözülmüştür. Çözelti 250 mL'lik balon jojeye aktarılarak hacim etanol ile 250 mL'ye tamamlanmıştır. Diğer taraftan 11,8 gr  $(\text{NH}_4)_3\text{PO}_4$  tartılarak bir miktar su ile çözünmesi sağlanmıştır. Çözelti 250 mL'lik balon jojeye aktarılarak hacim suyla 250 mL'ye tamamlanmıştır. Hazırlanan bu çözeltiler 4 saat süreyle 60 °C'de manyetik karıştırıcıda karıştırılmış ve bir gün yaşlanmaya bırakılmıştır.

#### - *Boş hidroksiapatit nanopartikülün oluşturulması;*

Bir gün bekleddikten sonra boş hidroksiapatit nanopartikülü oluşturmak için 100 mL  $(\text{NH}_4)_3\text{PO}_4$  çözeltisi behere alınarak manyetik karıştırıcı üzerine yerleştirilmiştir. Sıcaklık 60 °C'ye, karıştırıcı hızı 250 rpm'e ayarlanmıştır. Üzerine damla damla  $\text{Ca}(\text{NO}_3)_2$  çözeltisinden 100 mL 1 saat süre içerisinde eklenmiştir. Ekleme tamamlandıktan sonra 4 saat 60 °C'de manyetik karıştırıcıda karıştırılmaya devam edilmiştir. Oluşan beyaz renkli

nanopartiküller beyaz bant süzgeç kâğıdı kullanılarak filtre edilmiştir. Üç kez distile su ile yıkanmış ve 105 °C sıcaklıkta etüvde 4 saat süreyle kurutulmuştur (Şekil 3.2.1).



Şekil 3.2.1. Hidroksiapatit nanopartikülün oluşturulması

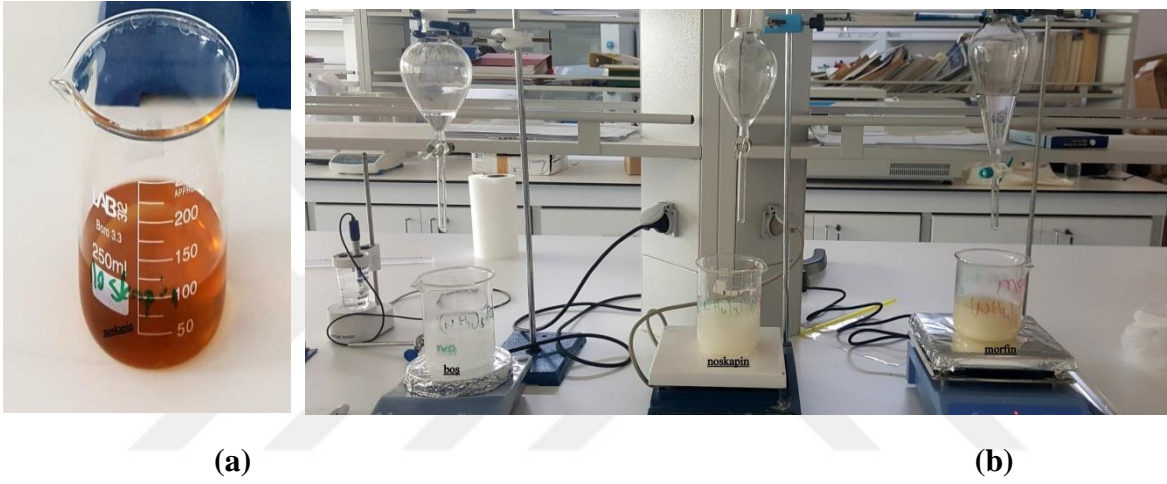
- **Morfin yüklü hidroksiapatit nanopartikülün oluşturulması;**

Morfin yüklü hidroksiapatit (HA+M) nanopartikülün oluşturmak için 100 mL (NH<sub>4</sub>)<sub>3</sub>PO<sub>4</sub> çözeltisi behere alınarak manyetik karıştırıcı üzerine yerleştirilmiştir. Sıcaklık 60 °C'ye, karıştırıcı hızı 250 rpm'e ayarlanmış ve üzerine 50 mL konsantre morfin ekstraktından eklenmiştir. Karışıma damla damla Ca(NO<sub>3</sub>)<sub>2</sub> çözeltisinden 100 mL 1 saat süre içerisinde eklenmiştir (Resim 3.2.3). Ekleme tamamlandıktan sonra 4 saat 60 °C'de manyetik karıştırıcıda karıştırılmaya devam edilmiştir. Oluşan beyaz renkli nanopartiküller beyaz bant süzgeç kâğıdı kullanılarak filtre edilmiş, üç kez distile su ile yıkanmış ve 105 °C'de etüvde 4 saat kurutulmuştur [94].

- **Noskapin yüklü hidroksiapatit nanopartikülün oluşturulması;**

Noskapin yüklü hidroksiapatit (HA+N) nanopartikülün oluşturmak için 100 mL (NH<sub>4</sub>)<sub>3</sub>PO<sub>4</sub> çözeltisi behere alınarak manyetik karıştırıcı üzerine yerleştirilmiştir. Sıcaklık

60 °C'ye, karıştırıcı hızı 250 rpm'e ayarlanmıştır Karışımın üzerine 40 mL konsantre noskabin ekstraktından eklenmiştir (Resim 3.2.3. (a)). Karışıma damla damla  $\text{Ca}(\text{NO}_3)_2$  çözeltisinden 100 mL 1 saat süre içerisinde eklenmiştir (Resim 3.2.3. (b)). Ekleme tamamlandıktan sonra 4 saat süreyle 60 °C'de manyetik karıştırıcıda karıştırılmaya devam edilmiştir. Oluşan beyaz renkli nanopartiküller beyaz bant süzgeç kâğıdı kullanılarak filtre edilmiş, üç kez deiyonize su ile yıkanmış ve 105 °C sıcaklıkta etüvde 4 saat süreyle kurutulmuştur [94].



Resim 3.2.3. Yüklü hidroksiapatit nanopartiküllerinin oluşturulması (a) konsantre ekstrakt (b)  $\text{Ca}(\text{NO}_3)_2$  çözeltisinin damla damla eklenmesi

### 3.2.5 Nanopartiküllerin Karakterizasyon Analizleri

#### 3.2.5.1 HPLC Analizleri ile Morfin ve Noskabin İçeriklerinin Belirlenmesi

HPLC analizleri bitki ekstratından başlamak üzere üretilen nanopartiküle kadar etken maddenin varlığı ve miktarını belirlemek için tüm aşamalarda HPLC analizleri yapılmıştır. Sistem gradiyent pompa vakum degazer, otomatik numune örnekleyici, programlanabilir kolon termostatı ve UV/VS dedektör ile donatılmıştır. Chemtation yazılım verileri değerlendirmek ve toplamak için kullanılmıştır. Analiz Çizelge 3.2.3.'de verilen koşullarda gerçekleştirilmiştir [95].

**Çizelge 3.2.3** Alkaloid ayrımı için gradiyent koşulları

<b>Kolon:</b> ACE marka (5 µm, 150 mm X 4,6 mm I.D.)	<b>Gradient koşulları</b>			
	Zaman	Mobil faz-A(%)	Mobil faz-B(%)	Mobil faz-B(%)
<b>Mobil Faz-A:</b> % 5'lik asetonitril su çözeltisi				
<b>Mobil Faz-B:</b> % 97,9 asetonitril, % 2,0 glasiyel asetik asit, % 0,1 TEA	0	90		10
	5	85		15
<b>Akış hızı:</b> 1 mL/dk	10	80		20
<b>Kolon sıcaklığı</b> 30 °C	20	65		35
<b>Enjeksiyon hacmi</b> 50 µL	30	90		10
<b>Dedeksiyon dalga boyu</b> 284 nm				
<b>Analiz süresi</b> 30 dk				

### 3.2.5.2 Kızılötesi Spektrum (FTIR) Analizi

Sentezlediğimiz boş HA, HA+M ve HA+N nanopartiküllerindeki çeşitli fosfat ve karbonat fonksiyonel gruplarını belirlemek amacıyla kızılötesi spektrumları (FTIR) analizi yapılmıştır. FTIR spektrumları frekans bölgeleri 500-3500 cm<sup>-1</sup> olarak alınmıştır. FTIR analizi için 105 °C'de kurutulmuş olan boş ve yüklü nanopartiküller kullanılmıştır (Resim 3.2.4.).



Resim 3.2.4. FTIR cihazı

### 3.2.5.3 Taramalı Elektron Mikroskobu (SEM) Analizi

Sentezlenen boş HA, HA+M ve HA+N nanopartiküllerin, morfolojik özelliklerinin ve parçacık boyutlarının belirlenmesi amacıyla taramalı elektron mikroskobu (SEM) incelemesi yapılmıştır (Resim 3.2.5.).



Resim 3.2.5. SEM Mikroskobu

### 3.2.5.4 Transmisyon Elektron Mikroskop (TEM) Analizi

TEM analizi Selçuk üniversitesi ileri teknoloji araştırma ve uygulama merkezi laboratuvarlarında yapılmıştır (Resim 3.2.6.). TEM analizi için nanopartikül örnekleri metanol içerisinde homojenize edilerek ultrasonik banyoda bir saat süreyle tutulmuştur.

Hazırlanan solüsyondan alüminyum plaka üzerine damlatılarak TEM cihazında görüntüleme işlemi yapılmıştır.



Resim 3.2.6. TEM mikroskobu

### 3.2.6 İlaç Salım Çalışmaları

#### 3.2.6.1 *In vitro* Mide Ortamında Salımın Belirlenmesi

Mide ortamını *in vitro* olarak taklit etmek pH'ı 1,2 olan NaCl/HCl çözeltisi ve pH'ı 3 olan CH<sub>3</sub>CO<sub>2</sub>H/CH<sub>3</sub>COONa çözeltileri hazırlanmıştır. İki farklı erlene 200 mg HA+M ve 200 mg HA+N nanopartikülleri tartılıp üzerlerine 20 mL pH'ı 1,2 olan çözeltiden eklenmiştir. Erlenmayerler alüminyum folyo ile kapatılmıştır. 70 rpm 37 °C'de çalkamalı inkübatöre konulmuştur ve her beş saatte bir olmak üzere 2 mL numune alınmıştır. Alınan numune kadar yani 2 mL taze pH'ı 1,2 olan çözelti eklenmiştir. Alınan numuneler enjektör



ucu filtre ile süzülerek HPLC ile analiz edilmiştir Nanopartikül içerisindeki etken maddeden ne kadar çözeltiye geçtiği belirlenmiştir. Tüm bu çalışmalar pH 3 ortamında yinelenmiştir [96].

### **3.2.6.2 *In vitro* İnce Bağırsak Ortamında Salımının Belirlenmesi**

Bağırsak ortamını *in vitro* olarak taklit etmek pH'ı 7,4 PBS çözeltisi hazırlanmıştır. İki farklı erlene 200 mg HA+M ve HA+N hidroksiapatit nanopartikülleri tartılıp üzerlerine 20 mL pH'ı 7,4 olan tampon çözelti eklenmiştir. Erlenmayerler alüminyum folyo ile kapatılmıştır. 70 rpm 37 °C'de çalkamalı inkübatöre yerleştirilmiş ve her beş saatte bir olmak üzere 2 mL numune alınmıştır. Alınan numune kadar yani 2 mL taze pH'ı 7,4 olan PBS çözeltisi eklenmiştir. Alınan numuneler enjektör ucu filtre ile süzülerek HPLC ile analiz edilmiştir. Nanopartikül içerisindeki etken maddeden ne kadar çözeltiye geçtiği belirlenmiştir [96].

### **3.2.7 Nanopartiküllerinin Biyoaktivite Çalışmaları**

#### **3.2.7.1 Antimikrobiyal Aktivitesinin Belirlenmesi**

Antimikrobiyal aktivite testleri Berghe ve Vlietinck tarafından açıklanan metoduna göre yapılmıştır. Oluşturduğumuz boş HA, HA+M ve HA+N nanopartiküllerinden 0,1 gr tartıp 2 mL metanol içerisinde çözünmesi sağlanmıştır. Testte kullanılacak mikroorganizmaların kültür süspansiyonundan 200 µL (yaklaşık olarak Mf 0,5 eşitliğine göre 106 koloni içerir) Mueller Hinton agara yaydıktan sonrası 3 mm kalınlık ve 6 mm çapa sahip disklerle metanolde çözdürülmüş hidroksiapatit nanopartikülleri 20 µL emdirilmiştir. Negatif kontrol olarak 20 µL metanol emdirilmiş diskler kullanılmıştır. Pozitif kontrol olarak da Streptomisin, penicilin, tetramisin, antibiyotik diskleri kullanılmıştır. Ekim yapılan petri kapları 37 °C'de 24 saat süreyle inkübe edilmiştir. Antimikrobiyal aktivitenin belirlenmesi disklerle emdirilmiş örneklerin etrafındaki zonların ölçülmesi ile belirlenmiştir [97].

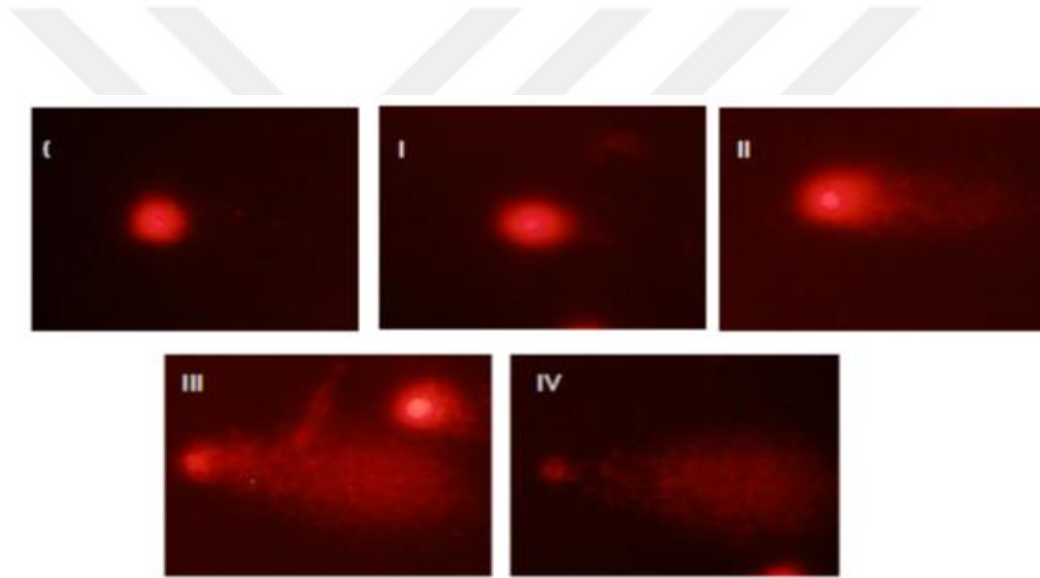
### 3.2.7.2 DNA Hasarına Etkisinin Belirlenmesi (Comet)

Boş HA, HA+M ve HA+N'nın DNA hasarına etkisinin belirlenmesinde insan periferal lökosit hücrelerinin kullanılması için Uşak Üniversitesi'nin Sağlık Bilimleri Araştırma ve Yayın Etiği Kurulundan 2017-34 uygunluk kararı alınmıştır (Ek 5). İnsan periferal lökosit kültürünün hazırlanması için, sağlıklı, sigara içmeyen ve ilaç kullanmayan bireyden heparinize edilmiş tüplere kan örneği alınmıştır. Çalışma başlayana kadar +4 °C'de bekletilmiştir. Boş HA, HA+M ve HA+N'nın DNA hasarına etkisini belirlemek amacıyla comet deneyi yapılmıştır. HA, HA+M ve HA+N 'nın 25 mg/mL, 10 mg/mL ve 5 mg/mL olmak üzere üç farklı konsantrasyonu 1X PBS'de hazırlanmıştır. Negatif kontrol grubu olarak 1X PBS, pozitif kontrol grubu olarak 30 µM H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> kullanılmıştır. Tüm uygulama grupları 30 dk ultrasonik su banyosunda bekletilmiştir.

Ependorf tüplerine histopak ilave edilmiş ve kan örneği 1:1 (500 µL ) oranında olacak şekilde ilave edilmiştir. 2100 rpm'de 20 dk 25 °C'de santrifüj işlemi sonunda histopak üzerindeki interfaz da ince bir tabaka halinde yer alan lökositler pipet yardımıyla yeni ependorf tüplere aktarılmıştır. Daha sonra üzerlerine yıkama amaçlı 100 µL 100 1X PBS eklenerek 15 °C'de 16000 rpm'de 10 dk tekrar santrifüj edilerek süpernatant kısım atılmıştır. Dipte kalan hücreler yoğunluğuna göre pipet yardımıyla karıştırılarak homojen bir çözelti elde edilmiştir. Pellete 100 µL 1X PBS eklenerek üzerine 100'er µL test maddelerinin değişik konsantrasyonları eklenmiştir (5 mg/mL, 10 mg/mL ve 25 mg/mL). Pozitif kontrol olarak 30 µM H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> negatif kontrol grubu olarak 1X PBS süspanse edildikten sonra 37 °C'de 1 saat inkübasyona bırakılmıştır.

DNA hasarını belirlemek amacıyla 100 µL lökosit üzerine 900 µL test maddelerinin değişik konsantrasyonları (5 mg/mL, 10 mg/mL ve 25 mg/mL), negatif kontrol için 900 µL 1X PBS, pozitif kontrol grubu için ise 30 µM ilave edilmiştir. 37 °C'de 60 dakika inkübasyona bırakılmıştır. İnkübasyon süresi sona erdiğinde ependorflar 25 °C'de 1600 rpm'de 10 dk santrifüj edilmiştir. Pelet comet assay deneyi için süpernatant ise TAS-TOS deneyi için kullanılmıştır. Daha sonra her bir pelet 100'er µL PBS ile resüspanse edilmiştir. 37±0,5 °C'de eritilmiş 80 µL % 0,8'lik LMA, 20 µL hücre süspansiyonu ile karıştırdıktan sonra önceden % 1,5'lik NMA çözeltisine daldırılıp agar ile kaplanmış lamalara yayılmış ve üzerine lamel kapatılmıştır. Buzlu yüzey üzerinde 5 dk bekletilerek agarın polimerleşmesi sağlanmıştır. Agar üzerindeki lamel dikkatli bir şekilde alınmıştır. Lamalar daha önceden

hazırlanıp buzdolabında bekletilen soğuk lizis çözeltisine daldırılarak en az 1 saat süreyle buzdolabında bekletilmiştir. Daha sonra elektroforez işlemi için, elektroforez tankı soğuk elektroforez çözeltisi ile doldurulmuş ve lamlar elektroforez tankının içine yerleştirilmiş ve 20 dk akım uygulanmadan bekletilmiştir. 25 V ve 300 mA akım uygulayarak 20 dk elektroforez uygulanmıştır. Elektroforez işlemi bittikten sonra alınan lamlar 5 dk. distile suda bekletilmiştir. Devamında lamlar 15 dk nötralizasyon tampon çözeltisinde bekletilmiştir. Lamaların üzerine 60 µL 20 µg/mL konsantrasyonda olan etidyum bromür çözeltisi ilave edilerek boyanması sağlanmıştır. Her lamda 100 hücre olacak şekilde floresan mikroskopunda değerlendirilmiştir. DNA hasar derecesi Şekil 3.2.2.'de gösterildiği gibi değerlendirilmiştir. Sonuçlar istatistiksel analizi Duncan testi kullanılarak yapılmıştır .



Şekil 3.2.2. Tek hücre jel elektroforez yöntemi ile jel üzerinde elektroforetik ortamda negatif kutuptan pozitif kutuba (soldan sağa) doru göç eden arklı seviyelerde hasara uğramış DNA'ların görüntüleri 0-Hasarsız DNA; I-Çok az hasarlanmış DNA; II-Az hasarlanmış DNA; III-Hasarlanmış DNA; IV- Tümüyle hasarlanmış DNA [98].

### 3.2.7.3 Total Antioksidan Seviye (TAS)- Total Oksidatif Seviye (TOS)- Oksidatif Stres İndeksi (OSİ)

TAS-TOS deneylerinde kullanılmak üzere comet deneyindeki süpernatantlar kullanılmıştır. Çalışma Rel Assay Diagnostic, RL0024 kiti ile yapılmıştır. Kalibrasyon eğrisini çizebilmek için standartlar hazırlanmıştır. 10 µm'lik standarttan 100 µL alınarak 100

$\mu\text{L}$  distile su ile seyreltilmiştir. Seyreltme işlemi  $0,0625 \mu\text{m}$  konsantrasyona kadar yapılmıştır.  $96$ 'lık mikrolatelere  $37,5 \mu\text{L}$  standart çözeltileri ve örnekler eklenmiştir. Üzerlerine  $250 \mu\text{L}$  R1 (reagent 1) çözeltilisinden eklenmiştir. İlk absorbans okuması  $530 \text{ nm}$ 'de Elisa cihazı yapılmıştır. İlk okumadan sonra  $12,5 \mu\text{L}$  R2 (reagent 2) çözeltilisi eklenerek  $37 \text{ }^\circ\text{C}$ 'de  $5 \text{ dk}$  etüvde bekletilmiştir. Süre sonunda  $660 \text{ nm}$ 'de ikinci okuma yapılmıştır. TOS hesaplanması aşağıdaki gibi yapılmıştır.

Örneklerin  $\Delta \text{ abs.} = 2. \text{ okuma} - 1. \text{ okuma}$ ; Standartın  $\Delta \text{ abs.} = 2. \text{ okuma} - 1. \text{ okuma}$

$\text{TOS} = (\text{örneklerin } \Delta \text{ abs} / \text{standart } \Delta \text{ abs}) * 10 \mu\text{mol} / \text{L}$

Total antioksidan kapasitenin belirlenmesi içinde aynı şekilde kalibrasyon eğrisini oluşturmak için standartlar hazırlanmıştır.  $10 \mu\text{m}$ 'lik standarttan  $100 \mu\text{L}$  alınarak  $100 \mu\text{L}$  distile su ile seyreltilmiştir.  $1,25 \mu\text{m}$  konsantrasyona kadar seyreltilmiştir.  $96$ 'lık mikrolatte  $15 \mu\text{L}$  standart çözeltili ve örnekler eklenmiştir. Üzerlerine  $250 \mu\text{L}$  R1 (reagent 1) çözeltilisi eklenerek ilk absorbans okuması  $530 \text{ nm}$ 'de Elisa cihazında yapılmıştır. Birinci okumadan sonra  $38 \mu\text{L}$  R2 (reagent 2) çözeltilisi eklenerek  $37 \text{ }^\circ\text{C}$ 'de  $5 \text{ dk}$  etüvde bekletilmiştir. Süre sonunda  $660 \text{ nm}$ 'de ikinci okuma yapılmıştır. TAS hesaplanması aşağıdaki gibi yapılmıştır [100 ].

Örneklerin  $\Delta \text{ abs.} = 2. \text{ okuma} - 1. \text{ okuma}$ ; Standartın  $\Delta \text{ abs.} = 2. \text{ okuma} - 1. \text{ okuma}$

$\text{TAS} = (\text{örneklerin } \Delta \text{ abs} / \text{standartın } \Delta \text{ abs}) \text{ mmol} / \text{L}$

Osi değerinin hesaplanması ise  $\text{TOS} / \text{TAS} * 100$  şeklinde hesaplanmıştır.

## 4. BULGULAR

### 4.1 Toplam Fenolik Madde Miktarı Tayini

#### *Gallik Asit Kalibrasyon Eğrisi*

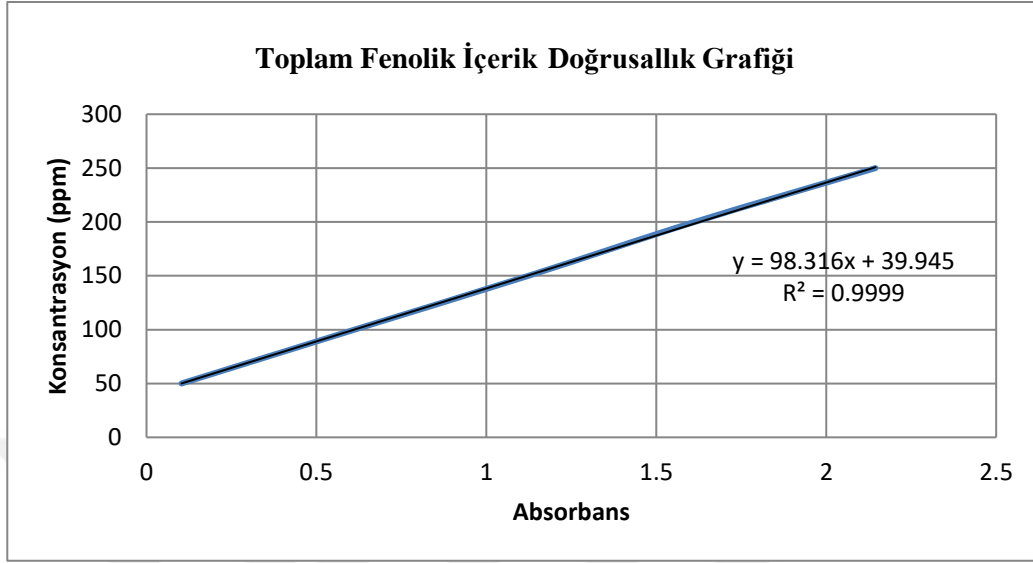
Ekstrakt örneklerindeki toplam fenolik madde miktarı gallik asit eşdeğeri (GAE) olarak verilmiştir. Gallik asidin metanolik çözeltisi hazırlanmış ve kalibrasyon eğrisinin çizilmesinde gallik asit çözeltisi kullanılmıştır. 50, 100, 150, 200 ve 250 ppm konsantrasyonlarda gallik asit çözeltisi standart olarak kullanılmıştır. Bu standart çözeltilerin absorbens değerleri aşağıdaki Çizelge 4.1.'de verilmiştir. Ölçümler üç tekrarlı yapılmıştır.

Çizelge 4.1. Gallik asit konsantrasyonuna karşılık absorbens değerleri

Gallik asit konsantrasyonu ppm	Absorbans Değeri
50	0,103±0,012
100	0,612±0,008
150	1,124±0,006
200	1,613±0,003
250	2,145±0,002

Toplam fenolik madde içeriğinin doğrusallık grafiği Şekil 4.1.'de verilmiştir. Standart grafikten elde edilen eşitlik çalışmada kullanılan ekstraktlardaki fenolik madde miktarının saptanmasında kullanılmıştır. Gallik asit konsantrasyonuna karşılık gelen

absorbans değerleri grafiğe geçirilmiştir. Doğrusallığı ( $y = 98,316x + 39,945$ ) ve regresyon kat sayısı ( $R^2 = 0,9999$ ) olarak belirlenmiştir.



şekil 4.1. Gallik asit kalibrasyon eğrisi

#### *NHK ve MHK'deki Toplam Fenolik Madde Miktarı*

Örnek konsantrasyonlarının absorbansı bu kalibrasyon eğrisinin içinde okunacak şekilde belirlenmiştir. Toplam fenolik madde analizi gallik asit kalibrasyon denkleminde yararlanılarak hesaplanmıştır (izelge 4.2.). Analiz sonucunda MHK için 1 gr numunede  $10,19 \pm 0,86$  mg GAE/gr ve NHK için  $6,9 \pm 0,91$  mg GAE/gr olarak toplam fenolik içerik belirlenmiştir. MHK 'nün fenolik madde miktarı NHK 'ye göre daha yüksek olduğu gözlenmiştir.

Çizelge 4.2. MHK ve NHK örneklerindeki fenolik madde miktarı

Örnek	Absorbans	mg GAE/1 gr Numune
MHK	3,050	$10,19 \pm 0,86$
NHK	1,932	$6,90 \pm 0,91$

## 4.2 Toplam Flavonoid Madde Miktarı Tayini

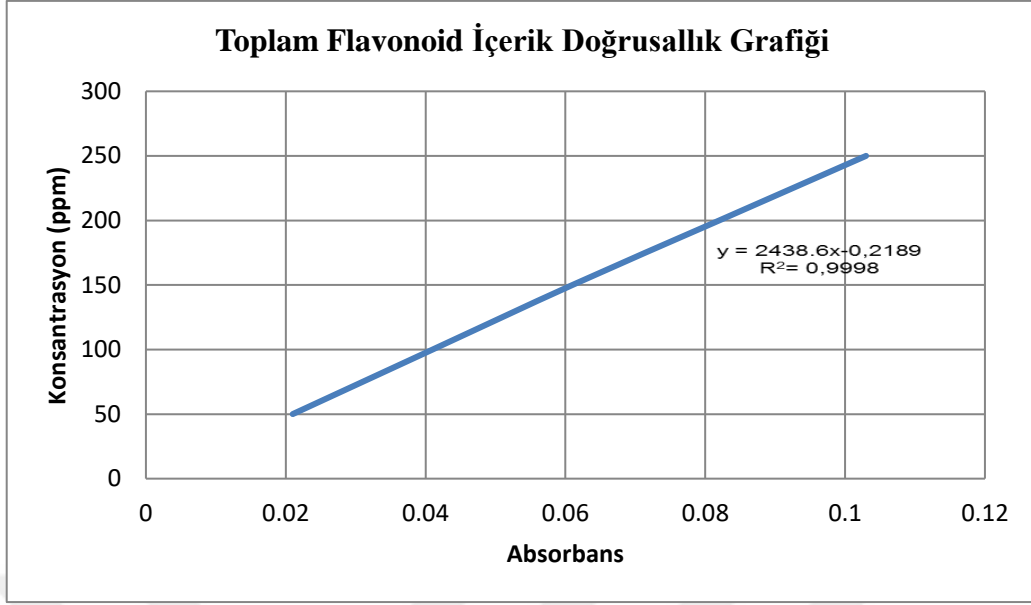
### *Kuersetin Standart Eğrisi*

Ekstrakt örneklerindeki toplam flavonoid madde miktarı Kuersetin eşdeğeri (QE) olarak verilmiştir. Kuersetinin metanolik çözeltileri hazırlanmış ve kalibrasyon eğrisinin çizilmesinde 50, 100, 150, 200 ve 250 ppm konsantrasyonlarda kuersetin çözeltisi standart olarak kullanılmıştır. Bu standart çözeltilerin absorbans değerleri Çizelge 4.3.'de verilmiştir. Ölçümler üç tekrarlı yapılmıştır.

Çizelge 4.3. Kuersetin konsantrasyonuna karşılık absorbans değerleri

<b>Kuersetin konsantrasyonu</b>	<b>Absorbans</b>
<b>ppm</b>	<b>Değeri</b>
50	0.021±0,006
100	0.041±0,008
150	0.061±0,009
200	0.082±0,010
250	0.103±0,014

Toplam flavonoid madde içeriğinin doğrusallık grafiği Şekil 4.2.'de verilmiştir. Standart grafikten elde edilen eşitlik çalışmada kullanılan ekstraktlardaki flavonoid madde miktarının saptanmasında kullanılmıştır. Kuersetin kalibrasyon eğrisi oluşturulduktan sonra örnek konsantrasyonların absorbansı bu kalibrasyon eğrisinin içinde okunacak şekilde belirlenmiştir. Doğrusallığı ( $y = 2438.6x - 0,2189$ ) ve regresyon kat.sayısı ( $R^2 = 0,9998$ ) olarak belirlenmiştir



Şekil 4.2. Kuersetin kalibrasyon eğrisi

#### *NHK ve MHK'deki Toplam Flavonoid Madde Miktarı*

Toplam flavonoid madde içeriği kuersetin kalibrasyon denkleminde yararlanılarak hesaplanmıştır. MHK ve NHK da belirlenen toplam flavonoid madde içerikleri 1 gr numune içerisinde mg QE olarak aşağıdaki Çizelge 4.4.'de verilmiştir. Yapılan flavonoid madde analizinde değerler MHK için  $19,16 \pm 1,105$  mg QE/1 gr ekstrakt ve NHK için  $29,77 \pm 1,225$  mg QE/1gr ekstrakt hesaplanmıştır. NHK'nın flavonoid içeriği MHK'nın flavonoid içeriğinden daha yüksek bulunmuştur.

Çizelge 4.4. MHK ve NHK içerisindeki toplam flavonoid madde içeriği mg/QE

Örnek	Absorbans	mg QE/ 1 gr Numune
MHK	0,262	$19,16 \pm 1,105$
NHK	0,407	$29,77 \pm 1,225$



### 4.3 Serbest Radikal Giderme Aktivitesi

UV Spektrofotometre de 517 nm dalga boyunda okunana örneklerden elde edilen verilerle grafikler oluşturulmuş ve EC<sub>50</sub> değeri hesaplanmıştır. Bazı antioksidanların EC<sub>50</sub> değerleri Çizelge 4.5.'de gösterilmiştir. Bu değerlere göre karşılaştırma yapılmıştır Ölçümler üç tekrarlı yapılmıştır. [101].

Çizelge 4.5. Bazı antioksidan bileşiklerin EC<sub>50</sub> değerleri.

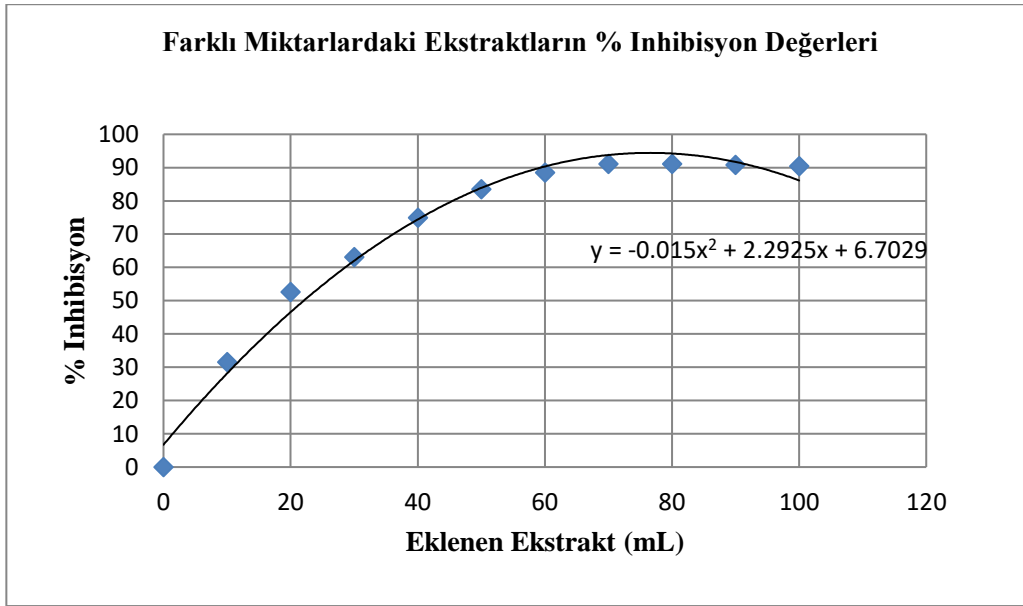
Antioksidan	EC <sub>50</sub> (µg/ml)
Vitamin C (standart)	1,697
Trolox (standart)	1,729
Ellagik asit	1,881
Kuarsetin	1,722
Kurkumin	2,800
Resveratrol	3,970
Silimarin	7,812
Vitamin E	3,123

MHK ekstraktı miktarına karşı % inhibisyon değerleri aşağıdaki Çizelge 4.6.'da verilmiştir.

Antioksidanların farklı konsantrasyonlarına karşı hesaplanan % inhibisyon değeri ile çizilen grafikten lineer regresyon ile % 50 inhibisyona neden olan antioksidan derişimleri elde edilmiştir (Şekil 4.3.). Sonuçlar EC<sub>50</sub> (µg/ml) ifade edilmiştir. MHK için % 50 inhibisyona neden olan ekstrakt miktarı= EC<sub>50</sub>=19 µl olarak belirlenmiştir.

Çizelge 4.6. MHK karşı % inhibisyon değerleri

İlave Edilen Ekstrakt mL	Absorbans	% İnhibisyon
0	0,304	0
10	0,208	31,58±1.021
20	0,144	52,63±1.034
30	0,112	63,16±1.052
40	0,076	75,00±1.070
50	0,05	83,55±1.090
60	0,035	88,49±1.105
70	0,027	91,12±1.120
80	0,027	91,12±1.125
90	0,028	90,79±1.115
100	0,029	90,46±1.112



Şekil 4.3. MHK'nın farklı miktarlardaki ekstraktların % inhibisyon değerleri

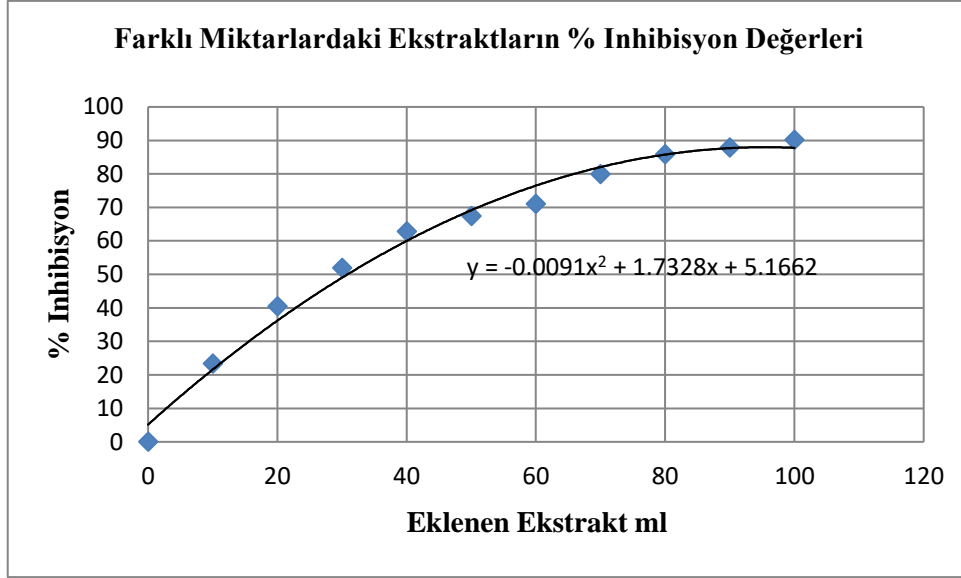
EC<sub>50</sub> değerine karşılık gelen MHK ekstrakt değeri 19 µL olarak belirlenmiştir. 19 µL ekstrakt içerisindeki MHK miktarı 0,63 µg'dır. EC<sub>50</sub> değerine karşılık gelen MHK konsantrasyonuda 0,16±0,03 µg/mL olarak belirlenmiştir.

NHK ekstraktı miktarına karşı % inhibisyon değerleri aşağıdaki izelge 4.7.'de verilmiştir.

Çizelge 4.7. NHK karşı % inhibisyon değerleri

İlave Edilen Ekstrakt mL	Absorbans	% İnhibisyon
0	0,304	0
10	0,233	23,36±1.063
20	0,181	40,46±1.074
30	0,146	51,97±1.088
40	0,113	62,83±1.101
50	0,099	67,43±1.108
60	0,088	71,05±1.112
70	0,061	79,93±1.125
80	0,043	85,86±1.128
90	0,037	87,83±1.132
100	0,030	90,13±1.138

NHK için % 50 inhibisyona neden olan ekstrakt miktarı= EC<sub>50</sub>=28 µL olarak belirlenmiştir.



Şekil 4.4. NHK ‘nın farklı miktarlardaki ekstraktların % inhibisyon değerleri

EC<sub>50</sub> değerine karşılık gelen NHK ekstrakt değeri 28 µL’ olarak belirlenmiştir. 28 µL ekstrakt içerisindeki NHK miktarı 0,93 µg’dır. EC<sub>50</sub> değerine karşılık gelen MHK konsantrasyonunda 0,23±0,023 µg/mL olarak belirlenmiştir.

Çizelge 4.8. MHK ve NHK ‘nin EC<sub>50</sub> değerleri

Örnekler	EC <sub>50</sub> (µg/ml)
MHK	0,16±0,030
NHK	0,23±0,023

Grafiklerden hesaplanan EC<sub>50</sub> değerleri ne kadar düşükse DPPH radikalini süpürme aktivitesi o kadar yüksek olmaktadır. Sonuç olarak DPPH radikalini süpürme aktivitesi MHK’de NHK’ya göre daha yüksek bulunmuştur. Çizelge 4.5.’de verilen antioksidanlara göre karşılaştırıldığında ise yüksek oranda düşük olduğu görülmüştür.

#### 4.4 Fenolik Asitlerin HPLC ile Analizi

MHK ve NHK ekstraktları HPLC ile analiz edilmiş, tesbit edilen fenolik asitler ve miktarları Çizelge 4.9.'da sunulmuştur. Çizelgede görüldüğü gibi her iki kapsülde de gallik asit belirlenmiş ve NHK'da 63,51 ppm, MHK'da 104,06 ppm bulunmuştur. Vanilik asit ile kafeik asit sadece NHK'da belirlenmiş ve vanilik asit 16,08 ppm, kafeik asit 17,78 ppm olarak bulunmuştur. Kumarik asit ile rosmarinik asit MHK'da belirlenmiş olup kumarik asit 17,24 ppm ve rosmarinik asit 9,65 ppm bulunmuştur. (MHK ve NHK'nın HPLC kromatogramları Ek1'de verilmiştir.)

Çizelge 4.9. MHK ve NHK'nın HPLC ile fenolik asit sonuçları (ppm)

Örnek	Gallik Asit	Vanilik Asit	Kafeik Asit	Kumarik Asit	Rosmarinik Asit
NHK	63,51	16,08	17,78	-	-
MHK	104,06	-	-	17,24	9,65

#### 4.5 Metal Analizi

MHK ve NHK örneklerinin metal içerikleri Çizelge 4.10.'da verilmiştir. MHK'da 35,66 ppm ve NHK'da 41,01 ppm olarak en yüksek oranda Mg belirlenmiştir.

Çizelge 4.10. MHK ve NHK'nın metal analizi sonuçları (ppm)

	<sup>11</sup> B	<sup>24</sup> Mg	<sup>55</sup> Mn	<sup>59</sup> Co	<sup>60</sup> Ni	<sup>63</sup> Cu	<sup>64</sup> Zn	<sup>66</sup> Zn	<sup>77</sup> Se	<sup>80</sup> Se	<sup>82</sup> Se	<sup>83</sup> Kr
MHK	0,779	35,661	1,681	0,116	51,354*	0,280	0,354	0,373	0,766	0,786	0,001	N/A
NHK	0,733	44,013	0,822	0,009	55,564*	0,227	0,436	0,460	0,573	0,879	0,003	N/A

\*ppb, N/A Tesbit Edilemedi

## 4.6 Nanopartiküllerin Karakterizasyon Çalışmaları

### 4.6.1 HPLC Analizleri ile Morfin ve Noskapin İçeriklerinin Belirlenmesi

Morfin ve noskapin kaynağı olarak kullanılarak kullanılan haşhaş kapsüllerinden bu alkaloidlerin ekstraksiyonu ve izolasyonu materyal metot bölümünde belirtilen teknikle gerçekleştirilmiştir. İlk önce kurutulmuş öğütülmüş kapsüller asidik etanol ile ekstrakte edilmiş, ekstrakt süzülüp ayrıldıktan sonra etanolü uçurulduktan sonra konsantre hale getirilmiştir. Konsantre ekstrakt renk giderme ve bulanıklık giderme işlemlerine tabi tutulmuştur. Haşhaş kapsülü, seyreltik ekstrakt, konsantre ekstrakt ve nanopartikül aşamalarından numune alınarak HPLC de alkaloid analizi yapılmış ve analiz sonuçları aşağıda Çizelge 4.11.'da sunulmuştur. (Örneklerin HPLC kromatogramları Ek 2'de verilmiştir).

Çizelge 4.11. Her bir aşamadaki morfin ve noskapin miktarı (ppm)

	<b>Morfin</b>	<b>Noskapin</b>
	<b>ppm</b>	<b>ppm</b>
<b>Kapsül</b>	281,6	176,0
<b>Ekstrakt</b>	490,5	147,1
<b>Kons. Ekstrakt</b>	2872,8	2749,9
<b>HA nanopartikülü</b>	14,2	12,7

### 4.6.2 FTIR Analizi

HA,  $(\text{NH}_4)_3\text{PO}_4$  ve  $\text{Ca}(\text{NO}_3)_2$  kimyasallarının senteziyle üretilmiştir. Boş, HA+M ve HA+N nanopartiküllerinin FTIR spektrumları sırayla Şekil 4.5., 4.6. ve 4.7. 'de gösterilmiştir.

Sentezlediğimiz yüksüz ve yüklü HA örneklerine ait fonksiyonel grupların dalga boyları ve HA'ya ait fonksiyonel grupların dalga boyları referans olarak seçilen ticari HA ve süreli yayınlarla [102] karşılaştırmalı olarak Çizelge 4.12.'de verilmiştir.

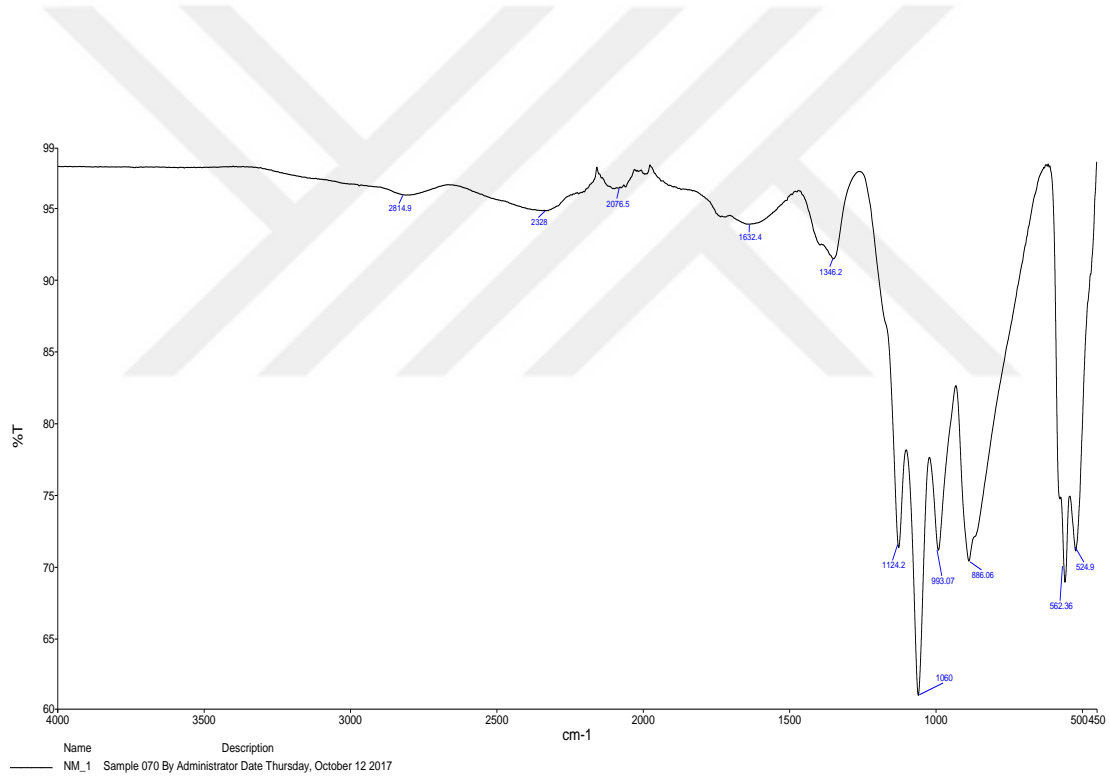
Boş hidroksiapatit için  $(PO_4)_3^-$  bantları 524, 562, 886, 993, 1060 ve 1124  $cm^{-1}$ 'de tespit edilmiştir. Su ile ilişkili grup da ise 1632  $cm^{-1}$  bantı gözlenmiştir.  $OH^-$  gerilmesinde ise bant gözlenmemiştir. 1346  $cm^{-1}$  pikleri, hidroksiapatit partiküllerinin yüzeyinde atmosferik  $CO_2$ 'nin emiliminin sonucu olabilecek  $CO_3^{2-}$  iyonlarına karşılık gelmektedir. Bu pikler, şekillerde görüldüğü gibi çok zayıftır. Bu, hidroksiapatit örneklerinin çok az miktarda karbonat içerdiğini göstermektedir [103].

Morfin yüklü hidroksiapatit  $(PO_4)_3^-$  bantları 516, 578, 653, 985, 1054 ve 1124  $cm^{-1}$ 'de tespit edilmiştir. Su ile ilişkili grup da ise 3473 ve 1653  $cm^{-1}$  bantları gözlenmiştir.  $OH^-$  gerilmesinde 3539 bandı gözlenmiştir. 1204  $cm^{-1}$  pikleri, hidroksiapatit partiküllerinin yüzeyinde atmosferik  $CO_2$ 'nin emiliminin sonucu olabilecek  $CO_3^{2-}$  iyonlarına karşılık gelmektedir. Bu pikler, şekillerde görüldüğü gibi çok zayıftır. Bu, hidroksiapatit örneklerinin çok az miktarda karbonat içerdiğini göstermektedir [103].

Noskapin yüklü hidroksiapatit  $(PO_4)_3^-$  bantları 519, 575, 658, 987, 1054 ve 1118  $cm^{-1}$ 'de tespit edilmiştir. Su ile ilişkili grup da ise 3473 ve 1645  $cm^{-1}$  bantları gözlenmiştir.  $OH^-$  gerilmesinde 3539 bandı gözlenmiştir. 1201  $cm^{-1}$  pikleri, hidroksiapatit partiküllerinin yüzeyinde atmosferik  $CO_2$ 'nin emiliminin sonucu olabilecek  $CO_3^{2-}$  iyonlarına karşılık gelmektedir. Bu pikler, şekillerde görüldüğü gibi çok zayıftır. Bu, hidroksiapatit örneklerinin çok az miktarda karbonat içerdiğini göstermektedir [103].

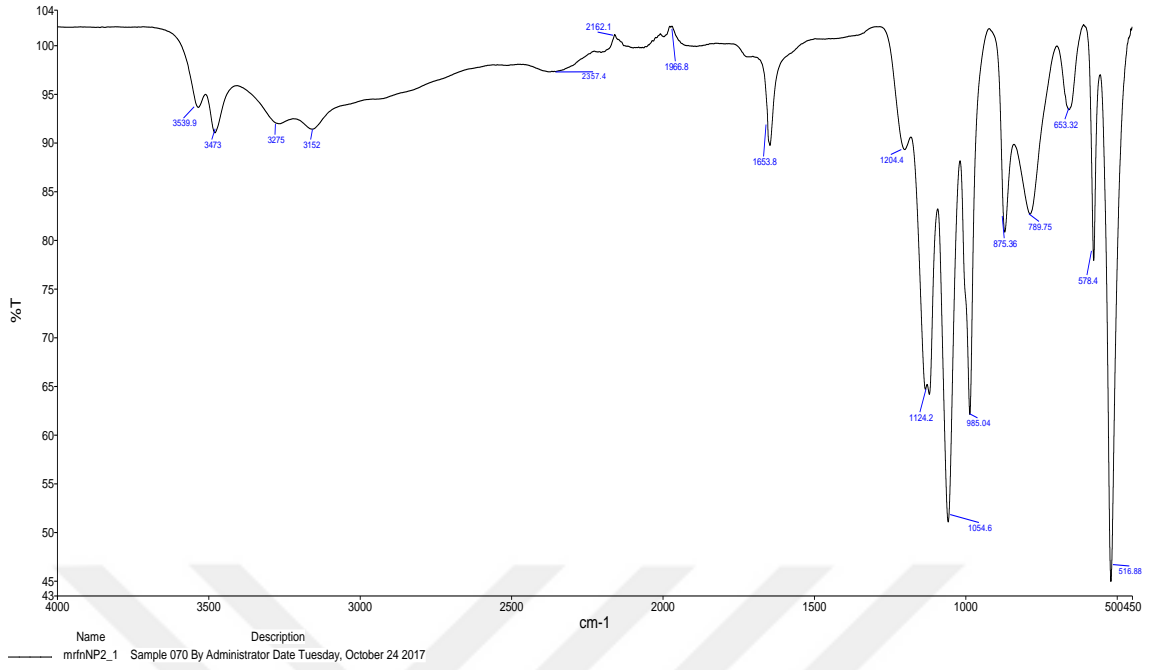
Çizelge 4.12. Boş, HA+M ve HA+N'nin FTIR spektrumlarının karşılaştırılması

Örnek	OH	Su bağı grup	CO <sub>3</sub>	PO <sub>4</sub>								
Feng et al 2006	3571	3430	1632	1547	1457	1415	1087	1032	961	602	566	471
Referans HAP	3564	3410	1638	-	-	-	1120	1096	1030	617	579	477
HA+N	3539	3473	1645	-	-	-	1118	1054	987	658	575	519
HA+M	3539	3473	1653	-	-	-	1124	1054	985	653	578	516
Boş HA	-	-	1632	-	-	-	1124	1060	993	886	562	524

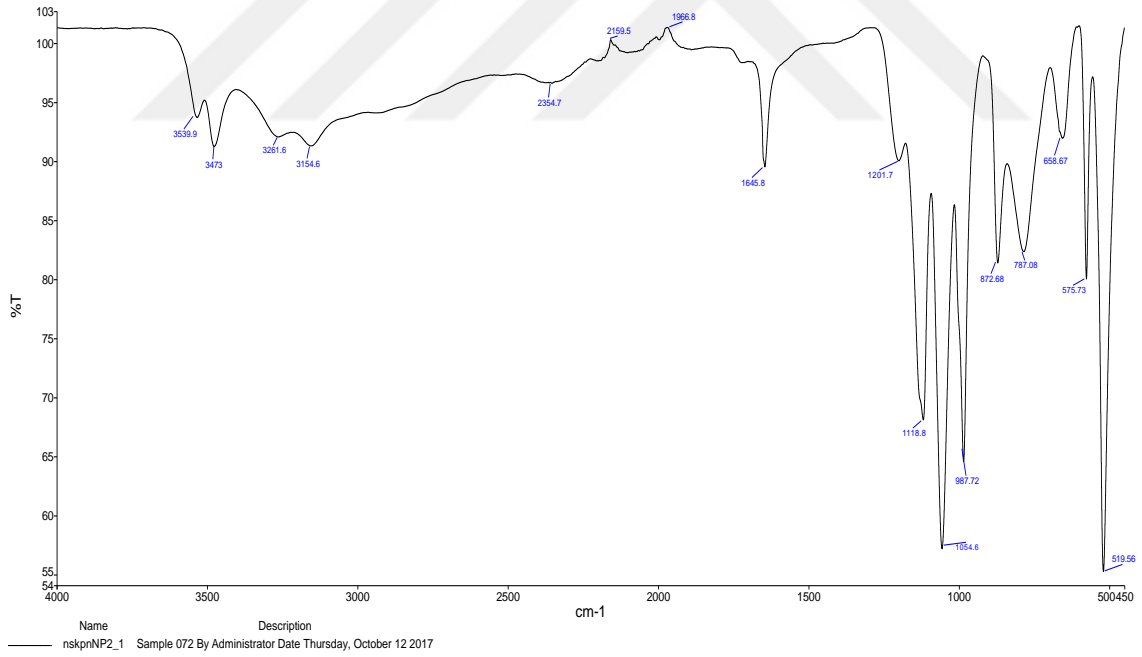


Şekil 4.5. Boş HA'nın FTIR Spektrumu





Şekil 4.6. HA+M'nin FTIR Spekturumu

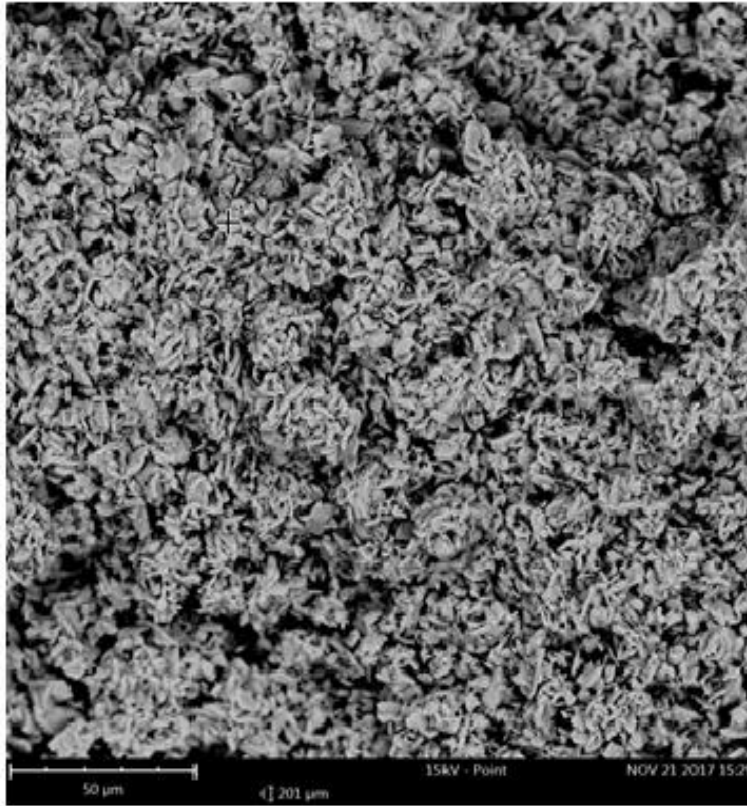


Şekil4.7. HA+N'nin FTIR Spekturumu

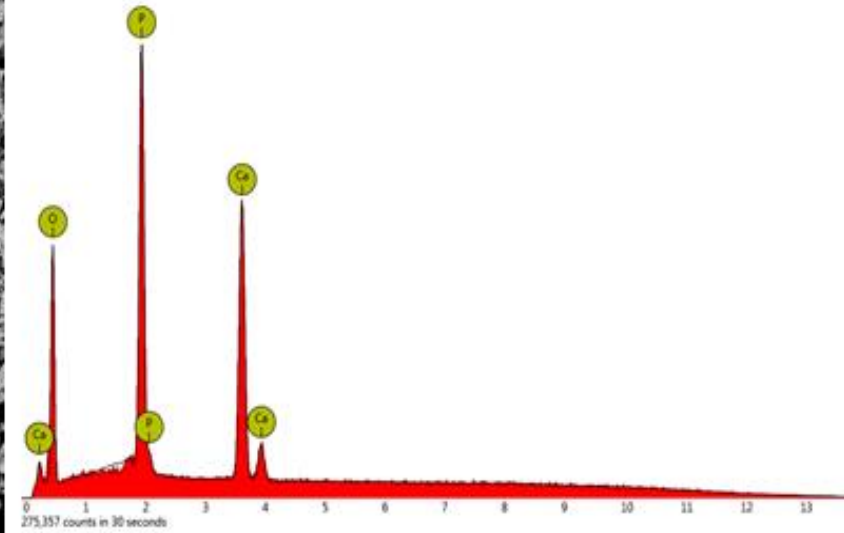
### 4.6.3 SEM Analizi

SEM tekniği ile elde edilen görüntüler ve nokta analizleri Şekil 4.8., 4.9. ve 4.10.'da gösterilmiştir. Sentezlenen hem yüksüz hem yüklü nanopartiküllerin SEM mikrografilerinin incelenmesi sonucunda genel olarak 150  $\mu\text{m}$  tane boyutundan daha küçük boyutta nanopartiküller olduğu gözlenmiştir. Nokta analizi sonuçları karşılaştırıldığında ise morfin ve noskapinin yapısında bulunan N atomunun boş nanopartikül de olmadığı yüklü partiküllerde ise az miktarda da olsa varlığı tespit edilmiştir. Buda HA+M ve HA+N nanopartiküllerinde morfin ve noskapinin yüklü olduğunu göstermektedir.

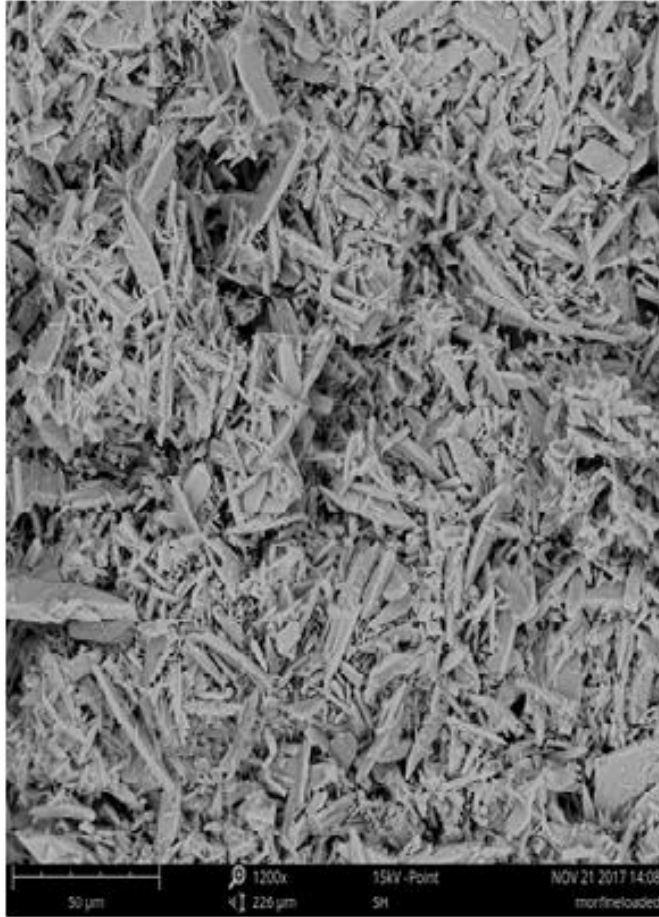




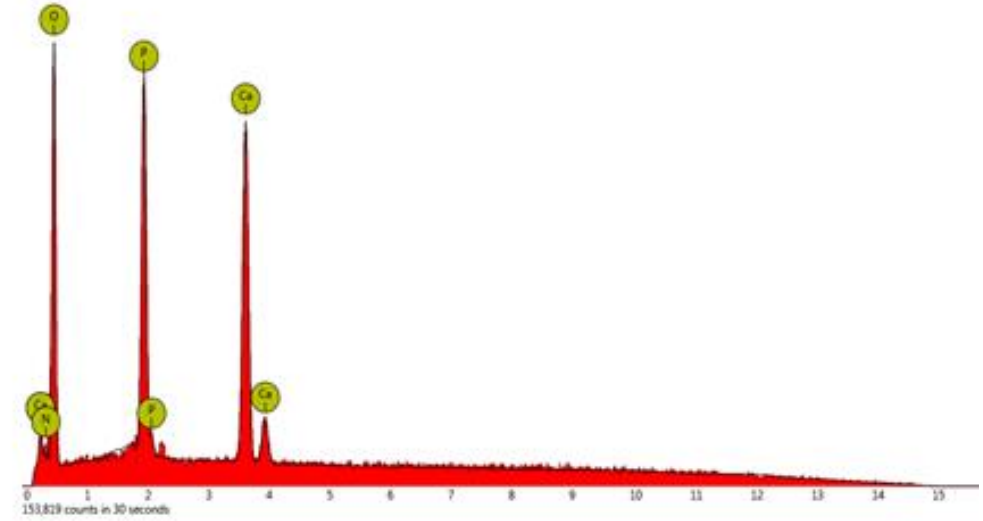
Element Numarası	Element Sembol	Element Adı	Atomik Kont.	Ağırlık Kont.
8	O	Oksijen	73.84	56.21
15	P	Fosfor	14.10	20.78
20	Ca	Kalsiyum	12.06	23.01



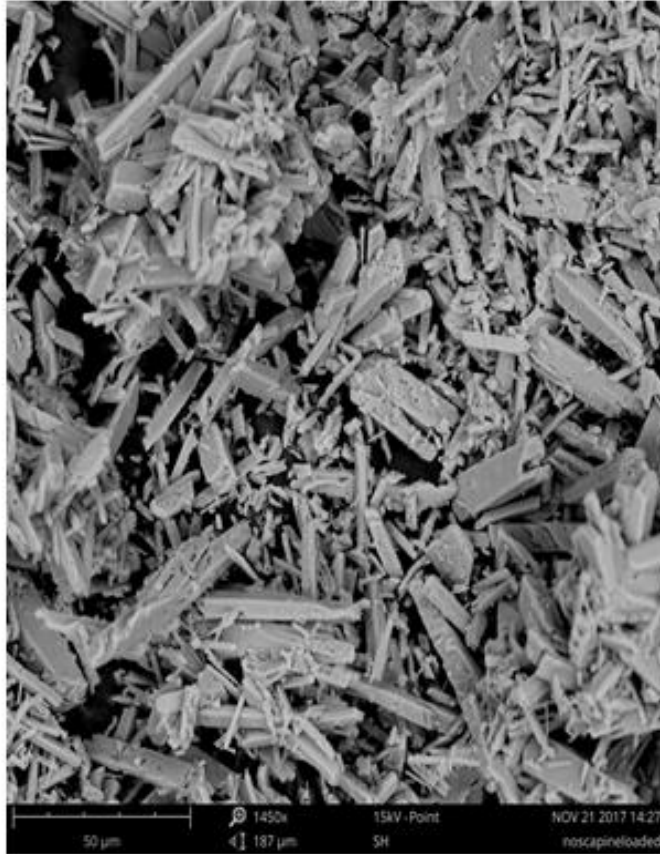
Şekil 4.8. Boş Hidroksiapatit nanopartikülün SEM analizi



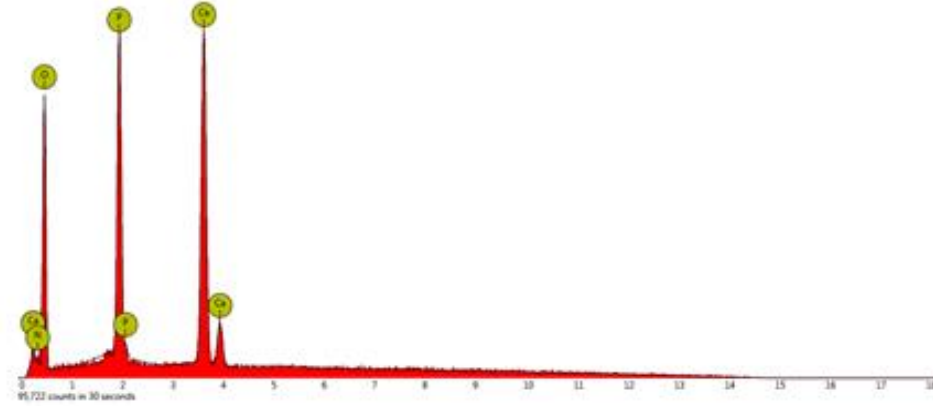
Element Numarası	Element Sembol	Element Adı	Atomik Kont.	Ağırlık Kont.
8	O	Oksijen	78.22	64.15
20	Ca	Kalsiyum	9.68	19.90
15	P	Fosfor	8.36	13.27
7	N	Nitrojen	3.74	2.69



Şekil 4.9. HA+M nanopartikülünün SEM analizi



Element Numarası	Element Sembol	Element Adı	Atomik Kont.	Ağırlık Kont.
8	O	Oksijen	74.74	58.95
20	Ca	Kalsiyum	12.31	24.32
15	P	Fosfor	9.31	14.21
7	N	Nitrojen	3.64	2.52

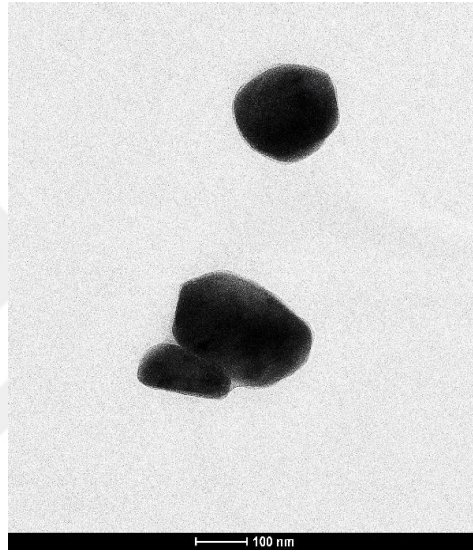


Şekil 4.10. HA+N nanopartikülünün SEM analizi

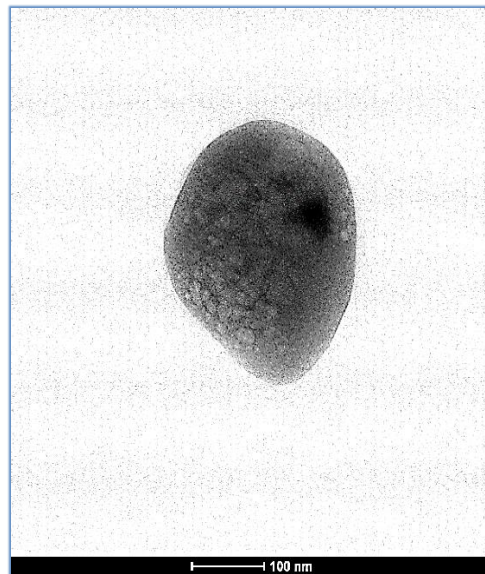


#### 4.6.4 TEM Analizi

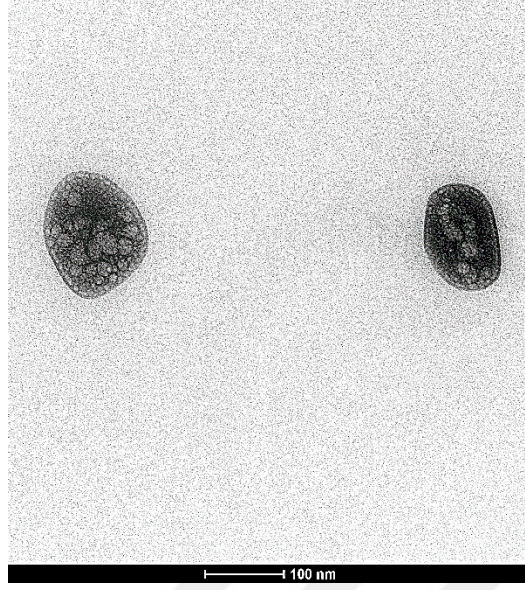
Boş, HA+M ve HA+N nanopartiküllerinin TEM görüntüleri Resim 4.1, 4.2. ve 4.3.'de gösterilmiştir. Şekiller incelendiğinde TEM'de elde edilen görüntülerine göre partiküller hiç agglomerate oluşturmamış ve yapıların boyutlarının 100 nm'den küçük oldukları gözlenmiştir. Şekillerde HA nanopartikülü içerisinde etkin maddenin olmadığı, HA+N ve HA+M nanopartiküllerinde etkin maddelerin hapsoldüğü gözlenmiştir.



Resim 4.1. Boş HA TEM görüntüsü



Resim4.2. HA+M TEM görüntüsü

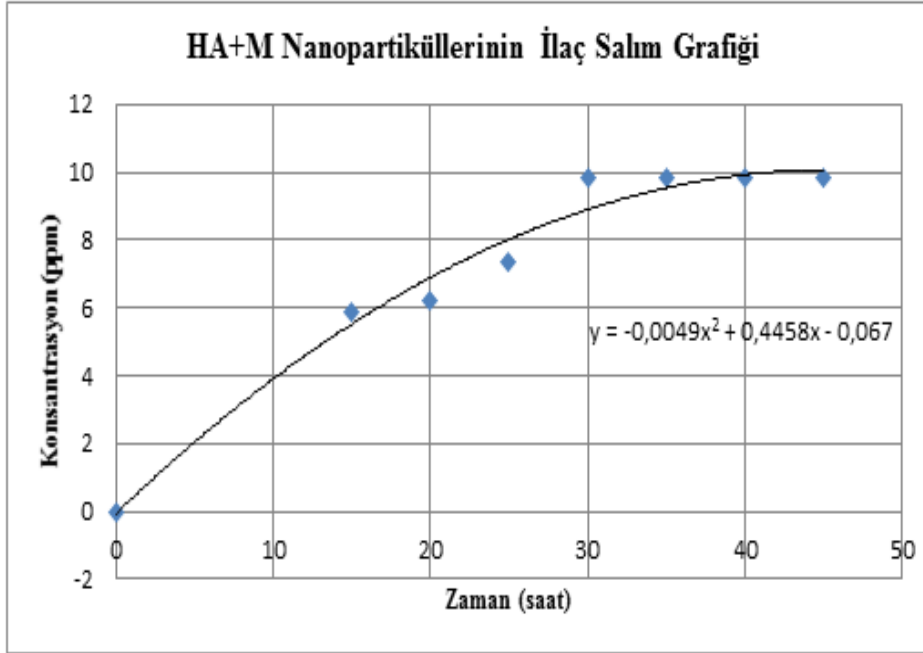


Resim 4.3. HA+N TEM Görüntüsü

## 4.7 İlaç Salım Çalışmaları

### 4.7.1 İn-vitro Mide Ortamı

HA+M nanopartiküllerinin pH 1,2 ve pH 3 ortamlarında zamana karşı morfin salım konsantrasyonlarının (ppm) ve oluşturulan grafikler sırayla gösteren Şekil 4.11. ve 4.12.'de gösterilmiştir. HA+N nanopartiküllerinin pH 1,2 ve pH 3 ortamlarında zamana karşı noskapin salım konsantrasyonlarının (ppm) ve oluşturulan grafikler sırayla gösteren Şekil 4.13.'de ve 4.14.'de gösterilmiştir. Morfin yüklü nanopartiküllerin ilaç salım testlerinde pH'ı 1,2 ortamında 30 saatte tam bir çözünme sağlanmışken pH 3 olan salım ortamında 96 saatte tamamen çözünme sağlanamamıştır. (Örneklerin HPLC kromatogramları Ek 3'de verilmiştir).



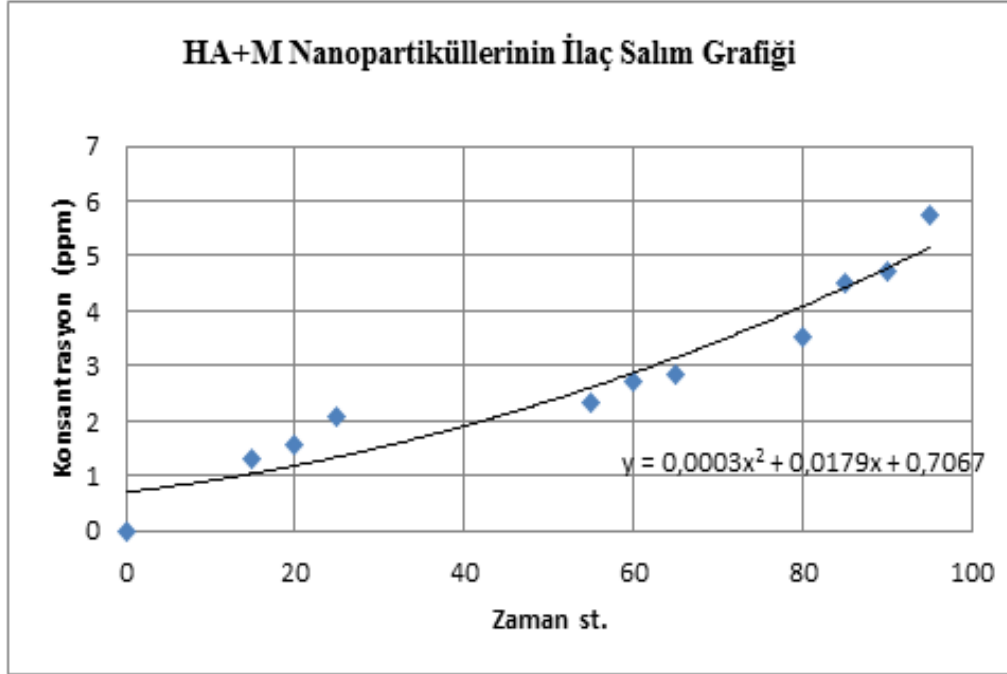
Çizelge pH 1,2 ortam da morfin konsantrasyonu (ppm)

İlaç Salımı Saati	Morfin Kons. (ppm)
0	-
5	-
10	-
15	5,86
20	6,21
25	7,36
30	9,83
35	9,83
40	9,83
45	9,83

Şekil HA+M Nanopartiküllerin pH 1,2 Ortamında Salım Grafiği

Şekil 4.11 M+HA nanopartikülünün pH 1,2 ortamında morfin konsantrasyonu ve salım grafiği



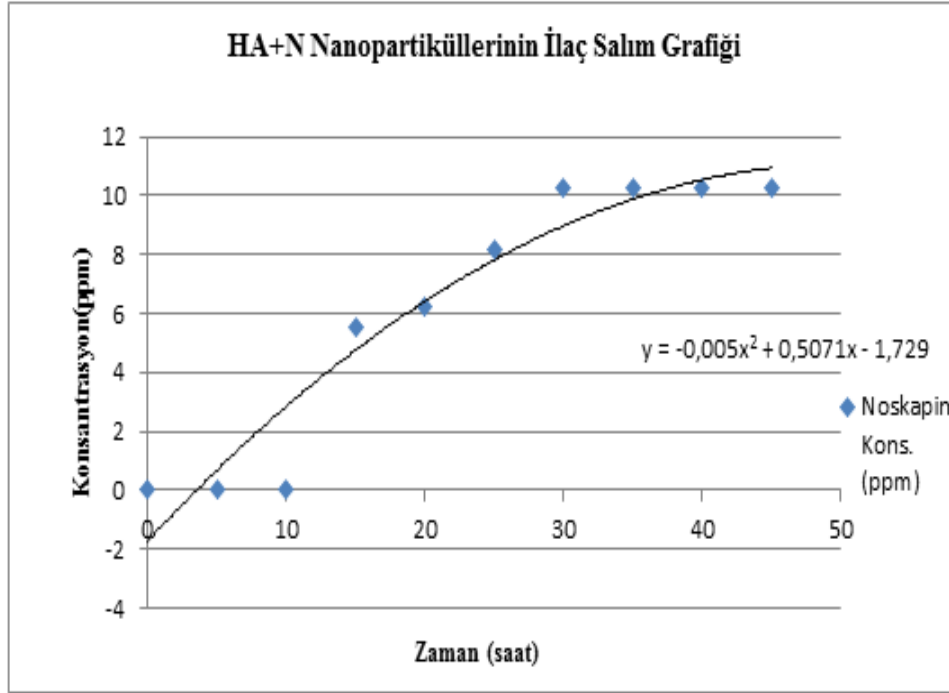


Çizelge pH 3 ortamında morfin konsantrasyonu (ppm)

İlaç Salımı Saati	Morfin Kons. (ppm)
0	0
5	-
10	-
15	1,31
20	1,56
25	2,08
55	2,33
60	2,70
65	2,86
80	3,54
85	4,50
90	4,71
95	5,76

Şekil HA+M Nanopartiküllerin pH 3 Ortamında Salım Grafiği

Şekil 4.12.HA+M nanopartikülünün pH 3 ortamında morfin konsantrasyonu ve salım grafiği

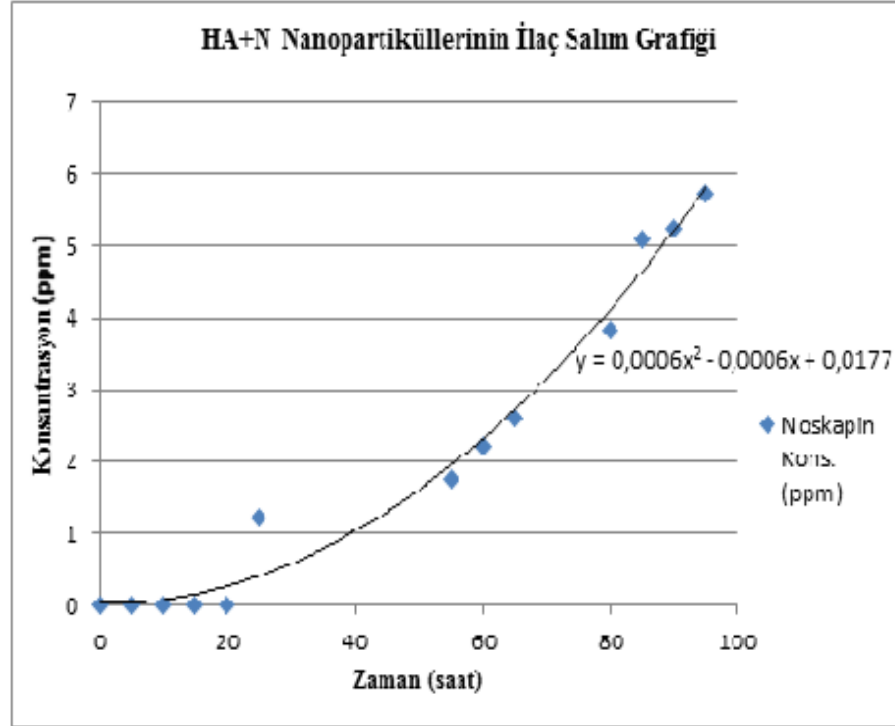


Çizelge pH 1,2 ortamında noskapin konsantrasyonu

İlaç Salınımı Saati	Noskapin Kons. (ppm)
0	0
5	0
10	0
15	5,53
20	6,22
25	8,19
30	10,28
35	10,28
40	10,28
45	10,28

Şekil HA+N nanopartiküllerin pH 1,2 ortamında salım grafiği

Şekil 4.13. N+HA nanopartikülünün pH 1,2 ortamında noskapin konsantrasyonu ve salım



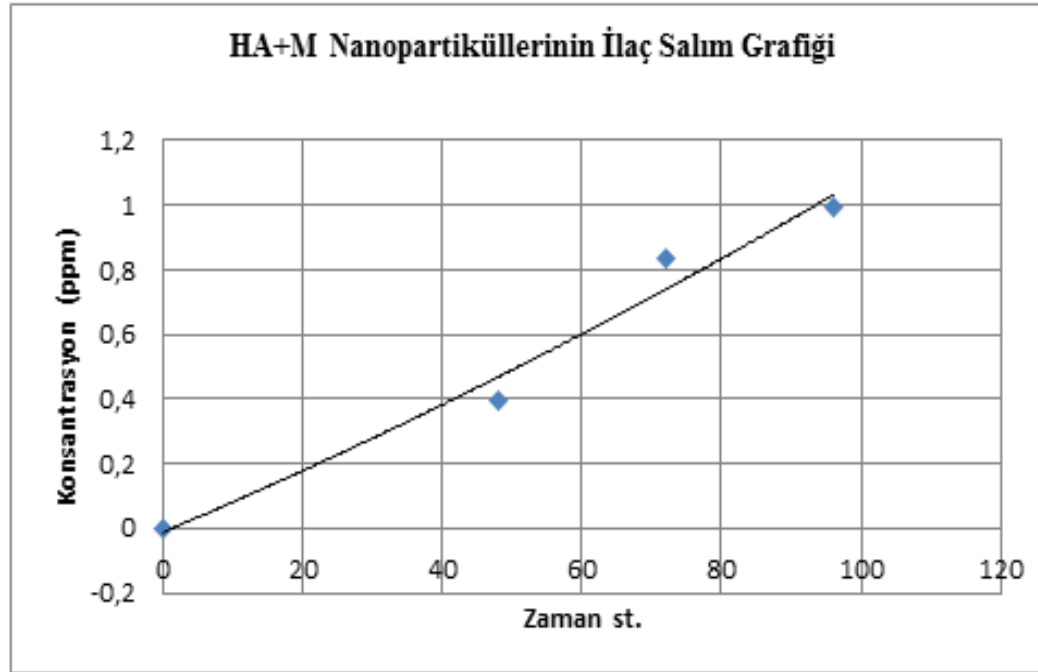
Şekil HA+N Nanopartiküllerin pH 3 ortamda salınım grafiği

Çizelge pH 3 olan ortamda Noskapin konsantrasyonu (ppm)

İlaç Salım Saati	Noskapin Kons. (ppm)
0	0
5	0
10	0
15	0
20	0
25	1,22
55	1,76
60	2,23
65	2,62
80	3,84
85	5,1
90	5,25
95	5,75

Şekil 4.14. N+HA nanopartikülünün pH 3 ortamında noskapin konsantrasyonu ve salım grafiği

#### 4.7.2. *In-vitro* İnce Bağırsak Ortamı



Çizelge pH 7,4 ortamında morfin konsantrasyonu

İlaç Salınımı Saati	Morfin Kons. (ppm)
0	0
48	0,393
72	0,839
96	0,994

Şekil HA+M Nanopartiküllerin pH 7,4 ortamda salınım grafiği

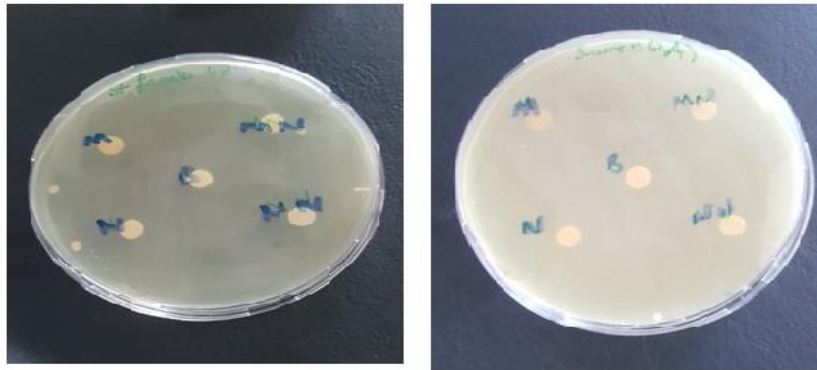
Şekil 4.15. HA+M nanopartikülünün pH 7,4 ortamında morfin konsantrasyonu ve salım grafiği

Yüklü hidroksiapatit nanopartiküllerinin pH 7,4 ortamında zamana karşı morfin konsantrasyonu grafiği Şekil 4.15' de gösterilmiştir. pH'17,4 olan *in vitro* ince bağırsak ortamında morfin tam olarak bir çözünme gerçekleşmemiş 96 saat süre sonunda bile çok az miktarda kısmi çözünme gözlenmiştir. Noskapin ise pH 7,4 ortamında salımı gözlemlenmemiştir. (Örneklerin HPLC kromatogramları Ek 4'de verilmiştir.)

## 4.8 Hidroksiapatit Nanopartiküllerinin Biyolojik Aktivite Çalışmaları

### 4.8.1 Antimikrobiyal Aktivitenin Belirlenmesi

Antimikrobiyal aktivitenin belirlenmesi için disklere emdirilmiş örneklerin etrafındaki zonlar Şekil 4.4.'de görüldüğü gibi gözlemlenmemiştir. Bu boş, HA+M ve HA+N nanopartiküllerinin antimikrobiyal aktivitesinin olmasını göstermektedir. Aynı zamanda bitki ekstraktlarında antimikrobiyal aktiviteside araştırılmış ve antimikrobiyal aktiviteye rastlanmamıştır.



Resim 4.4. Bitki ekstraktlarının, boş, HA+M ve HA+N nanopartiküllerinin antimikrobiyal aktivitesinin araştırılması

#### 4.8.2 DNA hasarının Belirlenmesi

5 mg/mL, 10 mg/mL ve 25mg/mL konsantrasyonlarda boş ve yüklü hidroksiapatit nanopartiküllerinin kan lökosit hücrelerinde oluşturduğu DNA hasarına ilişkin 3 ayrı deneyin sonuçları Çizelge 4.13’de gösterilmiştir. HA en yüksek DNA hasarına 30 µM H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> de (271,67±4.37) rastlanılmıştır. 5 mg/mL HA+M’de ise hasar gözlenmemiştir. Konsantrasyon artıka DNA hasarı artmış ve bu hasarlar HA’ nın 10 ve 25 mg/L, HA+N ve HA+M ‘nın 25 mg/mL uygulamalarında istatistiksel açıdan anlamlı bulunmuştur. HA+N ve HA+M ‘nın 25 ve 10 mg/mL uygulamaları HA uygulamalarındaki hasarı istatistiksel olarak anlamlı bir şekilde azaltmıştır.

Çizelge 4.13. Boş, HA+N ve HA+M’nin mononükleer lökositlerde comet testi ile DNA hasarının tespiti

Uygulama grupları	DNA Hasarı (Arbitrary Unit)*
	Ortalama ± Standart hata
<b>Kontrol</b>	0.33±0.33a
<b>30 µM H<sub>2</sub>O<sub>2</sub></b>	271.67±4.37b
<b>25 mg/mL HA</b>	110.67±2.33c
<b>10 mg/mL HA</b>	8.33±0.67d
<b>5 mg/mL HA</b>	1.67±0.33ae
<b>25 mg/mL HA+N</b>	7.67±0.67d
<b>10 mg/mL HA+N</b>	2.33±0.58ae
<b>5 mg/mL HA+N</b>	1.33±0.33ae
<b>25 mg/mL HA+M</b>	6±0.67de
<b>10 mg/mL HA+M</b>	1±0.58ae
<b>5 mg/mL HA+M</b>	-

\* Sütunlardaki farklı harfler p< 0.05 düzeyinde önemli (Duncan çoklu karşılaştırma testi)

### 4.8.3 TAS- TOS- OSİ

50 µg/ml, 100 µg/mL ve 200 µg/mL, konsantrasyonlarda boş ve yüklü hidroksiapatit nanopartiküllerinin kan lökosit hücrelerinde oluşturduğu total antioksidan ve total oksidan durum ile ilgili 3 ayrı deneyin sonuçları Çizelge 4.14.' de gösterilmiştir. En yüksek total oksidan duruma 30 µM H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>'de (271,67±4.37) rastlanılmıştır. 5 mg/mL HA+M' de ise kontrol grubuna göre anlamlı bir fark gözlemlenmemiştir. Konsantrasyon arttıkça total oksidan kapasite artmış total antioksidan kapasite azalmıştır, bu artışlar ve azalmalar HA'nın 10 ve 25 mg/mL, HA+N ve HA+M'nin 25 mg/mL uygulamalarında istatistiksel açıdan anlamlı bulunmuştur. HA+N ve HA+M'nin 25 ve 10 mg/mL uygulamaları HA uygulamalarındaki antioksidan kapasiteyi istatistiksel olarak anlamlı bir şekilde artırmıştır.

Sonuçlar oluşan DNA hasarı ile uyumludur DNA hasarı olan gruplarda oksidan kapasitede anlamlı artışlar antioksidan kapasitede ise anlamlı azalmalar gözlemlenmiştir. H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> hücrelerde oksidan kapasiteyi arttırıp antioksidan kapasiteyi azaltarak oksidatif strese oluşturarak DNA hasarına neden olduğu sonuçlarımızda gözlemlenmektedir, Aynı zamanda HA verilen gruplarında doza bağımlı olarak hücrelerde oksidatif stres kaynaklı DNA hasarı meydana getirebileceği düşünülmektedir. HA yüklü hücrelere noskapin ve morfin bağlanması ile oluşan oksidatif stresin azaldığında sonuçlarımızda gözlemlenmiştir.

Çizelge 4.14. Boş, HA+M ve HA+N' nin TAS-TOS-OSİ sonuçları

Uygulama grupları	TAS (mmol Trolox equiv./lt)	TOS ( $\mu$ mol H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> equiv./lt)	OSI (AU)
<b>Kontrol</b>	19.14 $\pm$ 3.15 <sup>a</sup>	5.54 $\pm$ 0.17 <sup>a</sup>	3.54 $\pm$ 0.17 <sup>a</sup>
<b>30 <math>\mu</math>M H<sub>2</sub>O<sub>2</sub></b>	5,21 $\pm$ 0,25 <sup>b</sup>	19 $\pm$ 4,25 <sup>b</sup>	10.54 $\pm$ 0.15 <sup>b</sup>
<b>25 mg/ mL HA</b>	8,12 $\pm$ 0,21 <sup>e</sup>	14 $\pm$ 1,23 <sup>e</sup>	8.21 $\pm$ 0.49 <sup>e</sup>
<b>10 mg/mL HA</b>	12 $\pm$ 1,71 <sup>d</sup>	10 $\pm$ 1,51 <sup>d</sup>	5.95 $\pm$ 0.18 <sup>d</sup>
<b>5 mg/mL HA</b>	16,57 $\pm$ 0,41 <sup>a,c</sup>	7,01 $\pm$ 1,11 <sup>a,c</sup>	4.52 $\pm$ 0.6 <sup>a,c</sup>
<b>25 mg/mL HA+N</b>	14,11 $\pm$ 1,63 <sup>c</sup>	9,33 $\pm$ 1,33 <sup>d</sup>	6.52 $\pm$ 0.4 <sup>d</sup>
<b>10 mg/mL HA+N</b>	16,25 $\pm$ 3,10 <sup>a,c</sup>	6,15 $\pm$ 4,12 <sup>a,c</sup>	5.32 $\pm$ 0.4 <sup>a,c</sup>
<b>5 mg/mL HA+N</b>	17,78 $\pm$ 3,16 <sup>a,c</sup>	5,78 $\pm$ 2,12 <sup>a,c</sup>	4.41 $\pm$ 0.1 <sup>a,c</sup>
<b>25 mg/mL HA+M</b>	15,90 $\pm$ 1,11 <sup>c,d</sup>	8,10 $\pm$ 1,11 <sup>c,d</sup>	6.04 $\pm$ 0.78 <sup>d</sup>
<b>10 mg/mL HA+M</b>	18,11 $\pm$ 1,47 <sup>a,c</sup>	5,11 $\pm$ 0,47 <sup>a,c</sup>	5.4 $\pm$ 2.11 <sup>c</sup>
<b>5 mg/mL HA+M</b>	20,13 $\pm$ 1,05 <sup>a</sup>	4,15 $\pm$ 0,15 <sup>a</sup>	3.65 $\pm$ 0.73 <sup>a</sup>



## 5. TARTIŞMA VE SONUÇ

Alkaloidler özellikle çiçekli bitkilerin belirli gruplarında yaygın olarak bulunurlar. Bazı bitki aileleri özellikle Haşhaş (Papaveraceae) alkaloidler bakımından zengindir. Genel olarak, bir tür sadece birkaç çeşit alkaloid içerir, ancak *Papaver somniferum* yaklaşık 30 farklı tip alkaloid içerir. Alkaloidlerin insanlar ve diğer hayvanlar üzerinde çeşitli ve önemli fizyolojik etkileri vardır. İyi bilinen alkaloidler arasında morfin, striknin, kinin, efedrin ve nikotin bulunur [10].

Morfin analjezik bir ilaç olup haşhaş kapsülünün ana psikoaktif kimyasalıdır. Haşhaş kapsülü birçok farklı türde elliden fazla alkaloid içerir. Haşhaş kapsüllerinde bu alkaloidler den oran olarak en çok morfin bulunmaktadır. Haşhaş kapsüllerinden kimyasal olarak ekstrakte edilir, saflaştırılır ve ilaç etken maddesi olarak kullanılmak üzere tuzları veya türevleri sentezlenir. Morfin tıpta yoğun ağrıyı gidermek için kullanılan standart analjezik olarak kabul edilir. Ağrı tedavisi, önemli tıbbi sorunlardan biridir. Morfin ve diğer opioid ilaçlar yaygın olarak orta ve şiddetli ağrıları gidermek için kullanılır. Kanser hastalarının ağrı tedavisinde olduğu gibi, uzun süreli analjezi elde etmek için, morfin tedavisi hala kronik ağrıların hafifletilmesi için standart tedavi olmaya devam etmektedir. Oksikodon, hidromorfin, diasetilmorfin (eroïn) ve diğer opioidler gibi ağrıyı hafifletmek için doğrudan merkezi sinir sistemi üzerine etki ederek, akut ve kronik ağrıların her ikisini, miyokard enfarktüsünü, nefes darlığını vb. tedavi etmek için kullanılır [104].

Morfin aşırı veya uygun olmayan dozlarda alınırsa kabızlık, bağımlılık (hem psikolojik hem fiziksel), hipogonadizm, hormon dengesizliği, asfiksi, akut solunum depresyonu, böbrek yetmezliği (böbreklerde metabolitlerin birikmesinden dolayı), kimyasal toksisite, kafa içi basınç artışı, biliyer kolik, gen ekspresyonunda değişiklik, bağışıklık hücreleri üzerinde ters etki vb. gibi yan etkiler gösterir [104]. Bu nedenle herhangi bir sitotoksisite tehdidi olmayan morfin yüklü nanopartikül bazlı bir ilaç salım sistemi

geliştirmeye ihtiyaç vardır. Ayrıca morfin yüklü ilacın yavaşça ve kontrollü bir şekilde eylem bölgesine salınması için nanoparçacık ilaç salım sistemine ve morfin yüklü organik biyomolekül bazlı nanopartikül ilaç salım sisteminin sentezlenmesi için bir yöntemin geliştirilmesine ihtiyaç duyulmaktadır.

Çalışmamızda toplam fenolik madde miktarı morfin içeriği yüksek haşhaş kapsülünde  $10,19 \pm 0,86$  mg GAE/gr, toplam flavonoid madde miktarı ise  $19,16 \pm 1,105$  mg QE/ 1 gr ekstrakt olarak hesaplanmıştır. DPPH giderim aktivitesinde  $EC_{50}$  değeri belirlenmiş ve  $0,16 \pm 0,3$   $\mu$ g/mL olarak bulunmuştur. HPLC ile fenolik asit analizinde kumarik asit ve rosmarinik asite rastlanmıştır. Metal analizinde en yüksek  $35,66$  ppm Mg' ye rastlanmıştır. Antimikrobiyal aktiviteye ise rastlanmamıştır.

Haşhaştan türetilmiş bir izokinolin alkaloid olan noskapin öksürük baskılayıcı bir madde olarak kullanılmaktadır ve insanlarda çok az toksik etki göstermiştir. Doğal olarak oluşan tübülün-bağlama ajanıdır ve anti-kanser terapi için klinik denemeler yapılmaktadır. Kanser tedavisinde, noskapinin taksanlara benzer şekilde kanserli hücrelerin bölünmesini engellediği gözlenmiştir. Prostat kanserinin tedavisinde hayvanlar üzerinde yapılan çalışmalar ümit vermektedir. Diğer afyon türevi ürünlerin aksine, noskapin herhangi bir analjezik, sedatif veya heyecan verici özelliklere sahip değildir ve bağımlılık yapıcı özelliği yoktur. Alkaloidlerin acı tadı oral uygulama için uygun değilken noskapin kolayca ağızdan tatbik edilebilmektedir. Noskapin, tümör baskılayıcı dozlarda böbrek, karaciğer, kalp, kemik iliği, dalak ve ince bağırsak ile ilgili çok az veya hiç toksisite göstermemiştir. Noskapinin ayrıca mitoz sırasında tümör hücrelerinin büyümesinin durmasına ve apoptoza neden olduğu gösterilmiştir. Noskapin bu nedenle mevcut kemoterapi ilaçlarına bir alternatif olarak kullanılabilir. Son zamanlarda, noskapinin lenfoma büyümesini azalttığı ve içme suyuna uygulandığında tümör taşıyan farelerin hayatta kalma olasılığını arttırmada etkili olduğu bildirilmiştir. Bununla birlikte, noskapinin yüksek konsantrasyonda mevcut ilaç salım sistemleri yetersizdir. Tümör mahallinde noskapin konsantrasyonunu artırmak için, noskapin ilaç taşıyıcıları içerisine hapsederek noskapin yüklü nanopartikül oluşturulmalıdır. Özel hedeflenmiş salınım alanı olasılığına izin verdikleri için minimum yan etki ile ilaç metabolizmasının etkinliğini minimum boyutlu nanopartiküller iyileştirebilir [105].

Çalışmamızda toplam fenolik madde miktarı noskapin içeriği yüksek haşhaş kapsülünde  $6,9 \pm 0,91$  mg GAE/gr, toplam flavonoid madde miktarı ise  $29,77 \pm 1,225$  mg QE/

1 gr ekstrakt olarak hesaplanmıştır. DPPH giderim aktivitesinde EC<sub>50</sub> değeri belirlenmiş ve 0,23±0,023 µg/mL olarak bulunmuştur. HPLC ile fenolik asit analizinde galik asit, kafeik asit ve vanilik asite rastlanmıştır. Metal analizinde en yüksek 44,013 ppm Mg'ye rastlanmıştır. Antimikrobiyal aktiviteye ise rastlanmamıştır.

Son otuz yılda nanopartiküller ve nanokapsüller kullanılarak polimerik bazda oluşturulan uzun süreli etki gösteren ilaç formülasyonları üzerine birçok yayın bulunmaktadır. İlaç etkinliğinin uzaması hedeflenen organda ilacın sabit konsantrasyonunda uzun süre tutulması ile gerçekleştirilir. Bu durum aynı zamanda tedavi amaçla kullanılan ilacın dozunu önemli ölçüde azaltma fırsatını da verir. Uzun süreli etki gösteren ilaç formülasyonlarının kullanmanın bir yararı da geleneksel ilaç dozaj formülasyonlarından daha az yan etki göstermeleri ve toksik/alerjik reaksiyonlarda azalmadır [106]. Hidroksiapatit kemik ve diş gibi biyolojik dokuların ana bileşenidir. Hidroksiapatit mükemmel biyoyumluluk, biyo-bozunabilirlik ve biyo-çözünürlüğe sahip oluşu osteogenesis, osteokondüktivite ve osteoindüktivite gibi doğal biyomateryalin karakteristik özelliklerini göstermektedirler [107-109]. Hidroksiapatit nanopartiküller, ortopedik implant kaplama gibi uygulamalarda kullanılmaktadır. Aynı zamanda Hidroksiapatit nanopartikülleri kontrollü ilaç salımında taşıyıcı olarak kullanılmaktadır [110]. İlaçların Hidroksiapatit matrisi içinde kapsüllemesi veya hidroksiapatit nanopartiküllere bağlanması hedeflenen ilaç dağıtımını mümkün kılmaktadır. Hidroksiapatit nanopartikül taşıyıcılar, özellikle *in vivo* çözünürlükleri ve hücre zarlarına nüfuz etme kapasiteleri nedeniyle hem sistemik hem de lokalize ilaç uygulamalarında kullanılmaktadırlar [111]. Hidroksiapatit nanopartiküller önemli anti-kanser aktivitesi de sergilemektedir. Yapılan çalışmalar Hidroksiapatit birçok kanser hücresi türünün büyümesini inhibe edebileceğini göstermiştir [112,113].

Sentezlenen nanopartiküllerin FTIR analizi yapılmış ve hidroksiapatit nanopartiküllerin oluştuğu tesbit edilmiştir. Feng 2006, yapmış oldukları çalışmada hidroksiapatitin fonksiyonel gruplarından (PO<sub>4</sub>)<sub>3</sub><sup>-</sup>, CO<sub>3</sub><sup>2-</sup>, OH ve suya bağlı gruplara rantlanırken bizim çalışmamızda CO<sub>3</sub><sup>2-</sup> fonksiyonel grubuna rastlanmamıştır. Bunun sebebi hidroksiapatitin yüzeyinde atmosferik CO<sub>2</sub>'nin emiliminin sonucu piklerin, çok zayıf olmasıdır. Bu da bize hidroksiapatit örneklerinin çok az miktarda karbonat içerdiğini göstermektedir. SEM (Taramalı Elektron Mikroskobu) tekniği ile elde edilen görüntüler ve

nokta analizleri ile elde edilen sonuçlar hidroksiapatit nanopartikülün 150 µm tane boyutundan daha küçük boyutta olduğu tesbit edilmiştir. Nokta analizleri ile de boş nanopartiküllerde N atomunun olmaması HA+N ve HA+M nanopartiküllerine morfin ve noskapin hapsoldüğünü göstermektedir.

Genotoksisite testleri, ilaç endüstrisi için vazgeçilmez testlerden olmuştur. Yaygın olarak kullanılan birçok ilacın genotoksisite testleri pozitif bulunduğundan, yeni ilaçların mutajenik ve karsinojenik potansiyellerinin taranması zorunlu bir hale gelmiştir. Laksman ve Patil 2007 yılında morfin ile yaptıkları hem akut hem de subakut çalışmalarda mikronükleus sayısında ve DNA hasarında belirgin bir artış gözlemlemişlerdir. Bu bulgu, morfinin doza bağlı bir tarzda mikronükleus oluşumuna neden olduğu kanıtlanmıştır. Morfin, opioidler gibi oksidatif stres ürettiği bilinmektedir. [114, 115]. Morfinin diğer opioidler gibi DNA hasarına neden olduğu bilinmekte ve reaktif oksijen türleri (ROS) üretmesi beklenmektedir [116]. Bu nedenle, morfin genotoksisitesi ROS aracılığı ile gerçekleşebilmektedir. Morfinin aynı zamanda hücrenin sitoplazmasında bulunan ve oksidatif strese karşı hücreyi koruyan glutatyon peroksidaz (GSH) ı inhibe ettiği bildirilmiştir. Morfin GSH, SOD gibi oksidatif stresi engelleyen enzimleri inhibe ederek DNA hasarına neden olmaktadır [117]. Noskapin tübülüne bağlanır ve mikrotübül düzenliğini etkiler, böylece mitozu durdurur ve bu onun genotoksisitesine aracılık edebilir [118]. Noskapinin comet çalışmasında 15 mg / kg dozun kromozom hasarında önemli bir artışa yol açtığı bildirilmiştir. Ayrıca noskapinin güçlü bir aneugen olduğu belirlenmiştir [119, 120] 1990'ların başlarında noskapinin genotoksisitesi nedeniyle çocuklarda ve kadınlarda tedavi amaçlı kullanılmaması gerektiği önerilmiş [121]. Fakat daha sonra bu karar tartışmalara yol açmış ve hayvan deneylerinden elde edilen bulgular doğrultusunda uygun dozun tedavi amacıyla kullanılabileceğini bildirilerek noskapinin kullanımında terapötik doz kullanımı uygun bulunmuştur [122]. Ancak tümör baskılamada kullanılmasında önerilen doz (EC<sub>50</sub>) (300 mg/kg) yüksek olması nedeniyle nano-kapsilasyon şeklinde kullanılması gerektiği ön görülmüştür. Etki mekanizmasından bağımsız olarak, mevcut çalışmadan, morfin ve noskapinin genotoksik olduğu ve günlük klinik uygulamada dikkatlice kullanılması veya mümkün olduğunca kaçınılması gerektiği açıktır [118]. Bu güne kadar yapılan çalışmalar, morfin ve noskapinin önemli genotoksisiteye sahip olduğunu göstermektedir [123].

5 mg/mL, 10 mg/mL ve 25 mg/mL konsantrasyonlarda yapılan comet deneyinde HA'nın 200 µg/L konsantrasyonunda en yüksek DNA hasarına neden olduğu ve azalan konsantrasyonlar da azaldığı gözlemlenmiştir. Morfin ve noskapinin hidroksiapatit içerisine hapsedilmesi DNA hasarını daha azalttığı sonucuna varılmıştır.

Yaptığımız TAS-TOS deneylerinde konsantrasyon artıkça total oksidan kapasite artmış total antioksidan kapasite azalmıştır, bu artışlar ve azalmalar HA'nın 10 ve 25 mg/mL, HA+N ve HA+M'nin 25 mg/mL uygulamalarında istatistiksel açıdan anlamlı bulunmuştur. HA+N ve HA+M'nin 25 ve 10 mg/mL uygulamaları HA uygulamalarındaki antioksidan kapasiteyi istatistiksel olarak anlamlı bir şekilde artırmıştır. Sonuçlar oluşan DNA hasarı ile uyumlunmuştur. DNA hasarı olan gruplarda oksidan kapasitede anlamlı artışlar antioksidan kapasitede ise anlamlı azalmalar gözlemlenmiştir. Aynı zamanda HA verilen gruplarında doza bağımlı olarak hücrelerde oksidatif stres kaynaklı DNA hasarı meydana getirebileceği düşünülmektedir. HA yüklü hücrelere noskapin ve morfin bağlanması ile oluşan oksidatif stresin azaldığında sonucuna varılmıştır.

Sonuç olarak bu çalışma ile; Haşhaş kapsülü konsantre ekstraktlarından morfin ve noskapin yüklü hidroksiapatit nanopartiküller sentezlenmiş elde edilen ürünlerin karakterizasyon çalışmaları yapılmıştır. Karakterizasyon çalışmalarının FTIR, HPLC, SEM ve TEM analizleri göstermiştir ki morfin ve noskapin yüklü hidroksiapatit nanopartiküller oluşturulmuş salım süreleri uzatılarak uzun süre etkinlik gösteren yüklü nanopartiküller elde edilmiştir. Böylece morfin ve noskapinin uzun süre ve yüksek dozlarda alımının oluşturacağı toksik etkiler ortadan kaldırılmıştır.

## KAYNAKLAR

- [1] <http://www.acikbilim.com/2014/11/dosyalar/bir-mikrocipim-olsa-kontrollu-ilac-salimi.html>
- [ 2] Yetiz, E., 2009, Gözenekli Hidroksiapatitten İlaç Salımının İncelenmesi, Yüksek Lisans, *Yıldız Teknik Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü*.
- [ 3] Kundu, B., Soundrapandian, C., Nandi, S. K., Mukherjee, P., Dandapat, N., Roy S., Datta, B. K., Mandal, T. K., Basu D. and Bhattacharya R. N., 2010, Development of New Localized Drug Delivery System Based on Ceftriaxone- Sulbactam Composite Drug Impregnated Porous Hydroxyapatite: A Systematic Approach for In Vitro and In Vivo Animal Trial, *Pharm Res*, 27:1659–1676.
- [4] Chai, F., Hornez, J. C., Blancemain, N., Neut, C., Descamps, M., Hildebrand, H. F., 2007, Antibacterial Activation of Hydroxyapatite (HA) with Controlled Porosity by Different, *Science Direct Biomolecular Engineering*, 24.
- [ 5] Haşhaş sektör raporu, 2014, *Toprak Mahsulleri Ofisi Genel Müdürlüğü*
- [6] Bozan, B., Temelli, F., 2008, Chemical Composition and Oxidative Stability of Flax. Safflower and Poppy Seed and Seed Oils. *Bioresource Technology*, 99: 6354-6359.
- [7] İncekara, F., 1979, Endüstri Bitkileri ve Islahı – Cilt II, *Ege Üniversitesi Ziraat Fakültesi Yayınları*, 68.
- [8] Parmaksız, İ., 2004, *Papaver* cinsi *Oxytona* seksiyonunun Türkiye’de Yetişen Türlerinde Genetik Çeşitliliğin RAPD Markörleri ile Analizi, Yüksek Lisans, Tarla Bitkileri Anabilim Dalı, *Ankara Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü*.
- [9] İncekara, F., 1964, Yağ bitkileri, *Ege Üniversitesi. Ziraat Fakültesi Yayınları*, 83.
- [10] Önmez, H., 2007, *Papaver somniferum* Bitkisinden Elde Edilen Alkaloitlerin Ekstraksiyonunda Kullanılan Cozucu ve Metodların Karşılaştırılması, Yüksek Lisans, Kimya Anabilim Dalı, *Selçuk Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü*.
- [11] Zulak, K. G., Liscombe, D. K., Ashihara, H., Facchini, P. J. Alkaloids (Crozier, A., Clifford, N., Ashihara, H.), 2006, Plant Secondary Metabolites In: Alkaloids, *Blackwell Publishing*.
- [12] Gürkök, T., Parmaksız İ., Boztepe G., ve Kaymak E., 2010, “Haşhaş (*Papaver somniferum* L.) Bitkisinde Alkaloid Biyosentez Mekanizması” *BiyoTeknoloji Elektronik Dergisi*, 1(2) 31-45.
- [13] İlaç ve zehir, gen bilim.com.
- [14] Tanker, N., Koyuncu, M., Coşkun, M., 2007, Farmasötik Botanik II (III. Baskı). *Ankara Ünv. Ecz. Fak. Yay.*, 93, 397.

- [15] Facchini, P. J. and Bird D. A., 1997, Developmental Regulation Of Benzylisoquinoline Alkaloid Biosynthesis In Opium Poppy Plants And Tissue Cultures, *In vitro Cellular & Developmental Biology-Plant*, 34, 1.69-79.
- [16] Neler narkotiktir, *gen bilim.com*, İstanbul Narkotik Polisi İstanbul Emniyet Müdürlüğü.
- [17] Aniszewski T., 2007, Alkaloids-Secrets of Life:: Alkaloid Chemistry, Biological Significance, Applications and Ecological Role, *Elsevier*.
- [18] Hagel, J.M., Facchini, P.J., 2013, Benzylisoquinoline alkaloid metabolism—a century of discovery and a brave new World, *Plant and Cell Physiology*, 020.
- [19] Facchini P. J., 2001, Alkaloid biosynthesis in plants: biochemistry, cell biology, molecular regulation, and metabolic engineering applications, *Annual review of plant biology*, 52(1):29-66.
- [20] Küçük Y. N., 1996, ‘ Türkiye’nin çeşitli yörelerinde yetiştirilen haşhaş bitkilerinde alkaloidlerin ekstraksiyonu ve ekstraksiyonların susuz ortamlarda özelliklerinin incelenmesi’, Doktora Tezi, *Ankara Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü*.
- [21] Merc Index, 1976.
- [22] Tanker, M., Tanker, N., 2003, Farmakognozi Cilt.1. *Ankara Üniv. Eczacılık Fak. Yayınları*, 66, Ankara.
- [23] Abdalla, M. O., Karna, P., Sajja, H. K., Mao H., Yates C., Turner T., 2011, *Journal of Controlled Release* 149(3), 314-322.
- [24] Landen, J. W., Hau, V., Wang, M., Davis, T., Ciliax, B., Wainer, B. H., Van Meir, E. G., Glass, J. D., Joshi, H. C., Archer, D. R., 2004, Noscapine crosses the blood brain barrier and inhibits glioblastoma growth, *Clinical Cancer Research*, 10;5187-5201.
- [25] Ye, K., Ke, Y., Keshava, N., Shanks, J., Kapp, J. A., Tekmal, R. R., Petros, J., Joshi, H. C., 1998, Opium alkaloid noscapine is an antitumor agent that arrests metaphase and induces apoptosis in dividing cells, *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 95(4) 1601-1606.
- [26] Sioka, C., Kyritsis A. P., 2009, Central and peripheral nervous system toxicity of common chemotherapeutic agents, *Cancer Chemotherapy and Pharmacology*, 63, 761-767.
- [27] Park, S. B., Krishnan, A. V., Lin C. S., Goldstein D., Friedlander M., 2008, Kiernan M. C., Mechanisms underlying chemotherapy-induced neurotoxicity and the potential for neuroprotective strategies, *Kiernan Current medicinal chemistry*, 15(29)3081-3094.
- [28] Ke Y., Ye K., Grossniklaus H. E., Archer D. R., Joshi H. C., Kapp J. A., 2000, Noscapine inhibits tumor growth with little toxicity to normal tissues or inhibition of immune responses *Cancer Immunology, Immunotherapy*, 49-45; 217-225.
- [29] Jackson, T., Chougule, M. B., Ichite, N., Patlolla, R. R., Singh, M., 2008, Antitumor activity of noscapine in human non-small cell lung cancer xenograft model, *Cancer Chemother Pharmacol*, 63:117-126.

- [30] Bitoun, E, Micheloni, A, Lamant L, Bonnart C, Tartaglia-Polcini A, Cobbold C, Al Saati, T., Mariotti, F., Mazereeuw-Hautier, J., Boralevi, F., Hohl, D., Harper, J., Bodemer, C., D'Alessio, M., Hovnanian, A., 2003, Lekti proteolytic processing in human primary keratinocytes, tissue distribution and defective expression in Netherton syndrome. *Hovnanian Human molecular genetics*,12;19, 2417-2430.
- [31] Dahlstrom, B., Mellstrand,T., Lofdahl, C. G., Johansson, M., 1982, Pharmacokinetic properties of noscaphine, *European journal of clinical pharmacology*, 22;6, 535-539.
- [32] Karlsson, M. O., Dahlstrom, B., Eckernas, S. A., Johansson, M., Tufvesson, A. T., 1990, Pharmacokinetics of oral noscaphine, *Alm European journal of clinical pharmacology* 39;3, 275–279.
- [33] Alaca, T., 2015, Farklı Haşhaş Tiplerinde Alkaloidler Yönünden Morfolojik ve Ontogenetik Varyabilite, Doktora, Tarla Bitkileri Anabilim Dalı, *Ankara Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü*.
- [34] Singh, H. , Singh, P., Kumari, K., Chandra, A., Dass S. K.,Chandra, R., 2013, A Review on Noscaphine, and its Impact on Heme Metabolism, *Current Drug Metabolism*, 14;351-360 351.
- [35] Gökçe, S., Bulduk, İ., Enginar, H., 2017, Sıvı Kromatografisi Sıralı Kütle Spektroskopisi (LC-MS/MS) Tekniği İle Noscaphin Ve İlgili Stres Bozunma Bileşiklerinin İncelenmesi Ve Tayini İçin Metot Optimizasyonu, *Düzce Üniversitesi Bilim ve Teknoloji Dergisi*, 5; 231-241
- [36] Dökmeci, İ., 1992, İlaç Uygulamalarında Temel Kavramlar, *Nobel Tıp Kitabevi*, İstanbul.
- [37] İlaç bilgisi, <http://www.acilveilkyardim.com/acilbakim/ilacbilgisi.htm#top>.
- [38] Reyhan, A., 2007, Kontrollü İlaç Salımı ve Uygulama Alanları, Yüksek Lisans, *Yıldız Teknik Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü*.
- [39] Başar, H. M., 2006, Organik Kökenli Doğal Adsorbanlarla Kontrollü İlaç Salınımı, Yüksek Lisans, *İstanbul Teknik Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü*.
- [40] Ağabeyoğlu, D., 2002, Kontrollü Salımın Farmakokinetik Temelleri, Ed: A. Gürsoy, *Kontrollü Salım Sistemleri Derneği Yayınları*, 1.
- [41] Gürsoy, A., 2002, “Kontrollü Salım Sistemleri”, *Kontrollü Salım Sistemleri Derneği*.
- [42] Kocaman, S., Koç F., 2002, “ Kontrollü Salım Sistemleri ve Bu Sistemlerde Kullanılan Polimerler”, Lisans Bitirme, *Osmangazi Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü*.
- [43] Dikensoy, Ö., 2010, NanoPartiküller ve Plevra, *Plevra Bülteni*, 4: 7-9. 15.
- [44] Ay, E., 2010, Katkı Maddeleri Yardımıyla Gözenekli Hidroksiapatit Üretimi Ve İlaç Salım Özelliğinin İncelenmesi, Yüksek Lisans Tezi, *Yıldız Teknik Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü*.



- [45] Tunca, E. Ü. 2015, Nanoteknolojinin Temeli Nanopartiküller ve Nanopartiküllerin Fitoremediasyonu, *Ordu Üniversitesi Bilim ve Teknoloji Dergisi*, 5;2: 23-34;16.
- [46] Özcan, İ., 2008 Kemige Hedeflemek İçin Sentezlenen Biyolojik Parçalanabilen Polimerler Kullanılarak Hazırlanan Nanopartiküler İlaç Taşıyıcı sistemlerin Tasarımı Ve İn Vitro – İn Vivo Değerlendirilmesi, Doktora, Farmasötik Teknoloji Anabilim Dalı *Ege Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü*.
- [47] Ai, J., Biazar, E., Montazeri, M., Majdi, A., Aminifard, S., Safari, M., Akbari, H. R., 2011, Nanotoxicology and nanoparticle safety in biomedical designs. *International Journal of Nanomedicine*, 6: 1117-1127.
- [48] Ratner, B. D., Hoffman, A. S., Schoen, F. J. and Lemons, J. E., 2004, “Biomaterials Science: An Introduction To Materials In Medicine, 2nd ed.”, *Elsevier, China*, 484.
- [49] Mutlu, B., Kurt, M., 2005, Kırık Kemik Tedavilerinde Kullanılan Fiksatorlerin Mekanik Özellikleri ve Üç Değişik Malzemeden Yapılmış Halka Tipi Fiksatorlerin Mekanik Testleri, *Mühendis ve Makine*, 46;543, 29-38.
- [50] Shackelford, J. F., 1999, Bioceramics-An Historical Perspective, *Materials Science Forum*, 293; 1-4.
- [51] Albayrak, O., 2008, “Hydroxyapatite Coating on Ti and Ti6Al4V Substrates by Using Electrophoretic Deposition Method”, Doktora Tezi, *Boğaziçi Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü*, 102.
- [52] Ipekoglu, M., 2004, “Effects of Calcination and Particle Size on The Sintering of Natural Hydroxyapatite”, Yüksek Lisans, *Boğaziçi Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü*, 167.
- [53] Albayrak, Ö., Uğurlu, M., 2016, Bor katkılı hidroksiapatit üretimi ve karakterizasyonu: Bor oranı ve sinterleme sıcaklığının yapı ve mekanik özellikler üzerindeki etkisi, *Journal of the Faculty of Engineering and Architecture of Gazi University*, 31;3; 749-761.
- [54] Özsağiroğlu, T.B., Nasün-Saygılı, G., 2015, The impact of gelatin weight ratio on hydroxyapatite-gelatin composites and their sbf behaviour, *Macromolecular Symposia*, 352, 8–15.
- [55] Vallet-Regi, M., Gonzalez-Calbet, J. M., 2004, “Calcium phosphates as substitution of bone tissues”, *Progress Solid State Chemistry*, 32;1-2; 1-31.
- [56] Santos, C., Rovath, C. F., Franke, R. P., Almeida, M. M., Costa, M. E. V., 2009, Spray-dried hydroxyapatite-5-Fluorouracil granules as a chemotherapeutic delivery system, *Ceramics International*, 35, 509–513.
- [57] Kim, H. W., Knowles, J. C., Kim, H. E., 2005, Porous scaffolds of gelatin–hydroxyapatite nanocomposites obtained by biomimetic approach: characterization and antibiotic drug release, *Biomed Mater Res B Appl Biomater*, 74(2):686-98.

- [58] Kaygılı, Ö., 2011, Sol Jel Metodu İle Üretilen Hidroksiapatit Esaslı Biyoseramik Malzemelerin Mikroyapı Ve Fiziksel Özelliklerinin İncelenmesi, Doktora, *Fırat Üniversitesi*.
- [59] Arslandağ, İ., 2006, “Hidroksiapatitin Kontrollü İlaç Salımında Kullanımı”, Lisans Tezi, *Yıldız Teknik Üniversitesi*.
- [60] Simon, V., Lazăr, D., Turcu, L. V. F., Mocuta, H., Magyari, K., Prinz, M., Neumann, M. and Simon, S., 2009, “ Atomic environment in sol-gel derived nanocrystalline hydroxyapatite”, *Mat. Sci. Eng. B*, 165, 247-251.
- [61] Murugan, R., Ramakrishna, S., 2005, Development of nanocomposites for bone grafting, *Composites Science and Technology*, 65;2385-2406.
- [62] Doğan, Ö., 2005, Nano Boyutlu Hidroksiapatit Kristalizasyonunun Polielektrolitlerle Kontrolü, Doktora, *Yıldız Teknik Üniversitesi*.
- [63] Öner M., Doğan Ö., 2005, Inhibitory Effect Of Polyelectrolytes On Crystallization Kinetics Of Hydroxyapatite, *Progress in Crystal Growth and Characterization of Materials*, 50, 1-3, 39-51.
- [64] Bakan, F., Biyomedikal Uygulamalar İçin Nano Boyutlu Hidroksiapatit Üretimi ve Karakterizasyonu, Doktora, Kimya Mühendisliği Anabilim, *Fen Bilimleri Enstitüsü*.
- [65] Barroug, A., Glimcher, M. J., 2002, “Hydroxyapatite Crystals as a Local Delivery System for Cisplatin: Adsorption and Release of Cisplatin in Vitro”, *Journal of Orthopaedic Research*, 20:274-280.
- [66] Ay, E., 2010, Katkı Maddeleri Yardımıyla Gözenekli Hidroksiapatit Üretimi Ve İlaç Salım Özelliğinin İncelenmesi, Yüksek Lisans, Kimya Mühendisliği Anabilim Dalı, *Yıldız Teknik Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü*.
- [67] Queiroz, A. C., Santos, J. D., Monteiro, F. J., Gibson, I. R. ve Knowles, J. C., 2001, Adsorption and Release Studies of Sodium Ampicillin from Hydroxyapatite and Glass-reinforced Hydroxyapatite Composites, *Biomaterials*, 22:1393-1400.
- [68] Kima, H., Knowles, J. C. ve Kimb, H., 2004, Hydroxyapatite/poly(e-caprolactone) Composite Coatings on Hydroxyapatite Porous Bone Scaffold for Drug Delivery, *Biomaterials*, 25:1279-1287.
- [69] Local, D., Locs, J., Dubnika, A., Zalite, V., Berzina L., Cimdina Porous hydroxyapatite for drug Delivery, 197.
- [70] Ersun, M., 2004, Hidroksiapatit Üretimi ve Kullanım Alanları, Lisans , *Yıldız Teknik Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü*.

- [71] Orlovskii, V. P., Komlev, V. S. Barinov, S. M., 2002, Hydroxyapatite and Hydroxyapatite-based ceramics, *Inorganic materials*, 38 ;10-973-984.
- [72] Ekmen, M., 2009, Hidroksiapatit Kristallerinin Kontrollü İlaç Salımında Kullanım, Yüksek Lisans Tezi, Kimya Mühendisliği Anabilim Dalı, *Yıldız Teknik Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü*.
- [73] Larena, A., Caceresa, D., Vicariob, C. ve Fuentes, A., 2004, Release of a Chitosan Hydroxyapatite Composite Loaded With Ibuprofen and Acetyl-salicylic Acid Submitted To Different Sterilization Treatments, *Applied Surface Science*, 238 :518–522.
- [74] Santos, C., Rovath, C. F. , Franke, R. P., Almeida, M. M. ve Costa, M. E. V. , 2009, Spray-dried hydroxyapatite-5-Fluorouracil granules as a chemotherapeutic delivery system, *Ceramics International*, 35, 509-513.
- [75] Hanks, C. T., Wataha, J. C. and Sun, Z., 1996, “*In-vitro* models of biocompatibility: A Review”, *Dent. Mater.*, 12-3: 186-193 .
- [76] Smith, D. C., Williams, D. F., 2001, Biocompatibility of dental materials: Biocompatibility of preventive dental materials and bonding agents, *CRC Press*, Florida.
- [77] Mohanraj, V. J. and Chen, Y., 2006, Nanoparticles-A Review, *Trop. J. Pharm. Res.*, 5-1: 561-573.
- [78] Yeğenoğlu, H., 2013, Nanopartiküllerin Biyolojik Aktivite Çalışmaları Ve Patojen Tanılamaya Yönelik Nano Boyutlu İmmünoşansör Tasarımı, Yüksek Lisans, *Gazi Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü*.
- [79] Saikia, J. P., Paul, S., Konwar, B. K., Samdarshi, S. K., 2010, Nickel oxide nanoparticles: A novel antioxidant, *Colloid. Surface. B.*, 78-1; 146-148.
- [80] Milbury, P. E., Richer, A. C., 2007, “Understanding the antioxidant controversy: scrutinizing the fountain of youth”, *Praeger Publishers*, 31-79.
- [81] Halliwell, B. and Gutteridge, J. M. C., 2006, Free Radicals in Biology and Medicine 4th ed.”, *Oxford University Press*, 84-96.
- [82] Mercan, U., 2004, Toksikolojide serbest radikallerin önemi, *YYU Vet Fak Derg*, 15-1-2;91-96.
- [83] Karabulut, H., Gülay, M.Ş., 2016, Antioksidanlar, *MAE Vet Fak Derg*, 1 (1).
- [84] Brand-Williams, W., Cuvelier, M.E., Berset C., 1995, Use of a free-radical method to evaluate antioxidant activity, *Food Science and Technology-Lebensmittel-Wissenschaft & Technologie*, 28; 25-30.
- [85] Ghiselli, A., Serafini M., Natella, F., Scaccini, C., 2000, Total antioxidant capacity as a tool to assess redox status: critical view and experimental data, *Free Radic Biol Med*, 29-11;1106-14.

- [86] Erel, O., 2005, A new automated colorimetric method for measuring total oxidant status. *Clin Biochem*, 38-2;1103-11. 20.
- [87] Güleş, A., Katılma Nöbeti Olan Hastalarda Oksidatif Durum ve DNA Hasarının Araştırılması, *Bezmialem Vakıf Üniversitesi Tıp Fakültesi*.
- [88] Toroğlu, S., Çenet, M., 2006, Tedavi Amaçlı Kullanılan Bazı Bitkilerin Kullanım Alanları ve Antimikrobiyal Aktivitelerinin Belirlenmesi İçin Kullanılan Metodlar, *KSÜ. Fen ve Mühendislik Dergisi*, 9-2; 12-20.
- [89] Gamez-Meza, N., Noriega-Oriega-Rodriguez, J. A., Medina-Juarez, L. A., Ortega-Garcia, J., Cazarez-Casanova, R., Angulo-Guerrero, O., 1999, Antioxidant activity in soybean oil of extracts from thompson grape bagasse, *Journal of the American Oil Chemists*, 76; 1445.
- [90] Chang, C., Yang, M., Wen, H., Chern, J., 2002, Estimation of total flavonoid content in propolis by two complementary colorimetric methods, *J. Food Drug Anal.*, 10 ; 178-182
- [91] Wen, D., Li, C., Di, H., Liao, Y., Liu, H., Agric, J., 2005, A universal HPLC method for the determination of phenolic acids in compound herbal medicines, *Food Chem.*, 53;6624–6629.
- [92] Kacar, B., 1972, Bitki ve Toprağın Kimyasal Analizleri: II. Bitki analizleri. *Ank. Üniv. Basımevi*, 646.
- [93] Raffa, R.B., Porreca, F., Cowan, A., Tallarida, R.J., 1982, Extraction and measurement of morphine: correlation of brain level and s.c. dose in drug-naive and morphine-tolerant rats, *Life sci.*, 15-22;31(20-21):2299-302.
- [94] Taş, C. A., Korkusuz, F, Timuçin, M., Akkaş, N., 1997, An investigation of the chemical synthesis and high-temperature sintering behaviour of calcium hydroxyapatite (HA) and tricalcium phosphate (TCP) bioceramics. *J Mater Sci Mater Med*, 8;91-6.
- [95] Endlová, L., Laryšová, A., Vrbovský, V., Navrátilová Z., 2015, Analysis of Alkaloids in Poppy Straw by High-Performance Liquid Chromatography, *IOSR Journal of Engineering*, 05, 06.
- [96] Gün, M., 2013, Aljinat-Kitosan Nanopartiküllerin Kolşisin Salımında Kullanılmasının Araştırılması, Yüksek Lisans, Kimya Anabilim Dalı Programı *Adnan Menderes Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü*.
- [97] Berghe, V. A, Vlietinck, A. J., 1991, Screening methods for antibacterial and antiviral agents higher plants, *Meth Plant Biochem.*, 6;47-68.
- [98] Dikilitaş, M., Koçyiğit, A., 2010, Canlılarda “Tek Hücre Jel Elektroferez” Yöntemi İle Dna Hasar Analizi (Teknik Not): Comet Analiz Yöntemi, *J.ASgric. Fac. HR.U.* , 14-2; 77-89.
- [100] Erel, O., 2005, A new automated colorimetric method for measuring total oxidant status. *Clin Biochem*, 38-12:1103-11.

- [101] Bardakçı, Ö., 2017, Bazı sentetik antioksidanların 2,2-difenil-1-pikrilhidrazil (DPPH) radikal süpürme kapasitesi yöntemi ile antioksidan aktivitelerinin araştırılması, Yüksek Lisans, *Adnan Menderes Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü*.
- [102] Feng, W., Li, M. S., Lu, Y. P. and Qi, Y. X., Liu, Y. X., 2006, Synthesis and microstructure of hydroxyapatite nanofibers synthesized at 37°C, *Materials Chemistry and Physics*, 95; 145-149.
- [103] Cengiz, B., 2007, Hidroksiapatit Nanoparçacıklarının Sentezi, Yüksek Lisans, Kimya Mühendisliği Anabilim Dalı, *Fen Bilimleri Enstitüsü*.
- [10] Charlotte, M. C., Baerdemaeker, A. D., Poelaert, J., Madder, A., Hoogenboom, R., Ballet S., 2016, Controlled-release of opioids for improved pain management, *Materials Today*, 19;9 .
- [105] Sebak, S., Mirzaei, M., Malhotra, M., Kulamarva, A., Prakash S., 2010, Human serum albumin nanoparticles as an efficient nescapine drug delivery system for potential use in breast cancer: preparation and *in vitro* analysis, *International Journal of Nanomedicine*, 5;525–532.
- [106] Zhaparova, L., 2012, Synthesis of nanoparticles and nanocapsules for controlled release of the antitumor drug"Arglabin" and antituberculosis drugs Eindhoven: *Technische Universiteit Eindhoven*, doi: 10.6100/IR731636
- [107] Hui, J., Wang, X., 2014, Hydroxyapatite nanocrystals: colloidal chemistry, assembly and their biological applications, *Inorg Chem Front*, 1;215–225.
- [108] Meyers, M. A., Chen, P. Y., Lin, A. Y. M, Seki, Y., 2008, Biological materials: structure and mechanical properties, *Prog Mater Sci*, 53;1–20.
- [109] Palmer, L. C., Newcomb, C. J., Kaltz, S. R., Spoerke, E. D., Stupp, S. I., 2008, Biomimetic systems for hydroxyapatite mineralization inspired by bone and enamel. *Chem Rev*, 108;4754–4783.
- [110] Liu, T. Y., Chen, S. Y., Liu, D. M., Liou, S. C., 2005, On the study of BSA-loaded calcium-deficient hydroxyapatite nano-carriers for controlled drug delivery, *J Control Release*, 107;112–121.
- [111] Uskovic, V., Uskovic, D. P., 2011, Nanosized hydroxyapatite and other calcium phosphates: chemistry of formation and application as drug and gene delivery agents. *J Biomed Mater Res*, 96B;152–191.
- [112] Lafisco, M., Delgado-Lopez, J. M., Varoni, E. M., Tampieri, A., Rimondini, L., Gomez-Morales, J., Prat, M, 2013, Cell surface receptor targeted biomimetic apatite nanocrystals for cancer therapy, *Small*, 25;3834–3844.
- [113] Hou, C. H., Hou, S. M., Hsueh, Y. S., Lin, J., Wu, H. C., Lin, F. H., The *in vivo* performance of biomagnetic hydroxyapatite nanoparticles in cancer hyperthermia therapy. *Biomaterials*, 30;3956–3960.

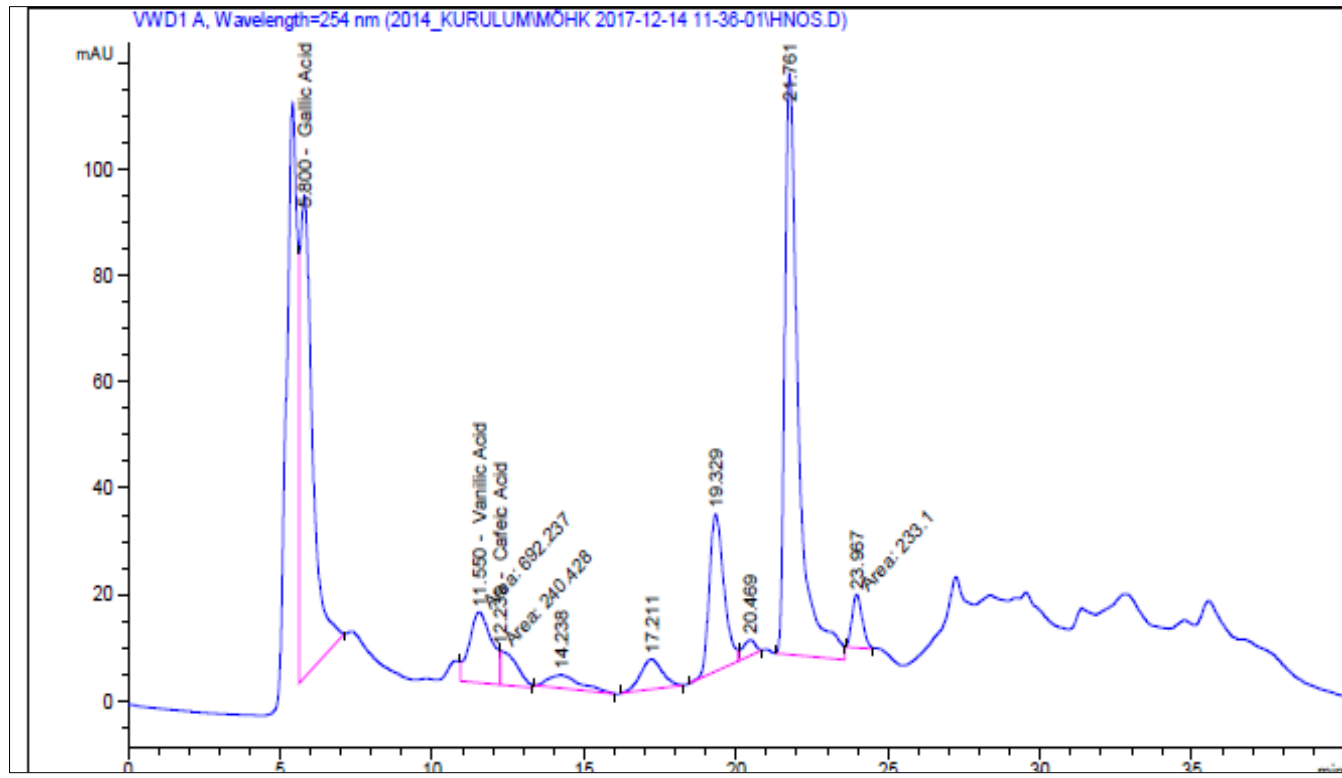
- [114] Zhang, Y. T., Zheng, Q. S., Pan, J., Zheng, R. L., 2004, Oxidative damage of biomolecules in mouse liver induced by morphine and protected by antioxidants. *Basic Clin Pharmacol Toxicol*, 95;53-8.
- [115] Sharp, B. M., Keane, W. F., Suh, H. J., Gekker, G., Tsukayama, D., Peterson, P. K., 1985, Opioid peptides rapidly stimulate superoxide production by human polymorphonuclear leukocytes and macrophages, *Endocrinology*, 117;793-5.
- [116] Slupphaug, G., Kavli, B., Krokan, H. E., 2003, The interacting pathways for prevention and repair of oxidative DNA damage, *Mutat Res*, 531;231-51.
- [117] Skoulis, N. P., James, R. C., Harbison, R. D., Roberts, S. M., 1989, Depression of hepatic glutathione by opioid analgesic drugs in mice. *Toxicol Appl Pharmacol*, 99;139-47.
- [118] Ye, K., Keshava, N., Shanks, J., Kapp, J.A., Tekmal, R.R., Petros, J., 1998, Opium alkaloid noscapine is an antitumor agent that arrests metaphase and induces apoptosis in dividing cells, *Proc Natl Acad Sci USA*, 95;1601-6
- [119] Schuler, M., Muehlbauer, P., Guzzie, P., Eastmond, D. A., 1999, Noscapine hydrochloride disrupts the mitotic spindle in mammalian cells and induces aneuploidy as well as polyploidy in cultured human lymphocytes, *Mutagenesis*, 14;51-6.
- [120] Gatehouse, D. G., Stemp, G., Pascoe, S., Wilcox, P., Hawker, J., Tweats, D. J., 1991, Investigations into the induction of aneuploidy and polyploidy in mammalian cells by the anti-tussive agent noscapine hydrochloride, *Mutagenesis*, 6;279-83
- [121] Sneyd, J. R., 1991, Papaveretum in women of childbearing potential, *BMJ*, 303; 852.
- [122] Tiveron, M.C., Hirsch, M. R., Brunet, J. F., 1996, The expression pattern of the transcription factor Phox2 delineates synaptic synaptic pathways of autonomous nervous, *J.Neurosci*, 16:7649-7660
- [123] Sawant, S. G., Couch, D. B., 1995, Induction of micronuclei in murine lymphocytes by morphine, *Environ Mol Mutagen*, 25;279-83.

## EKLER

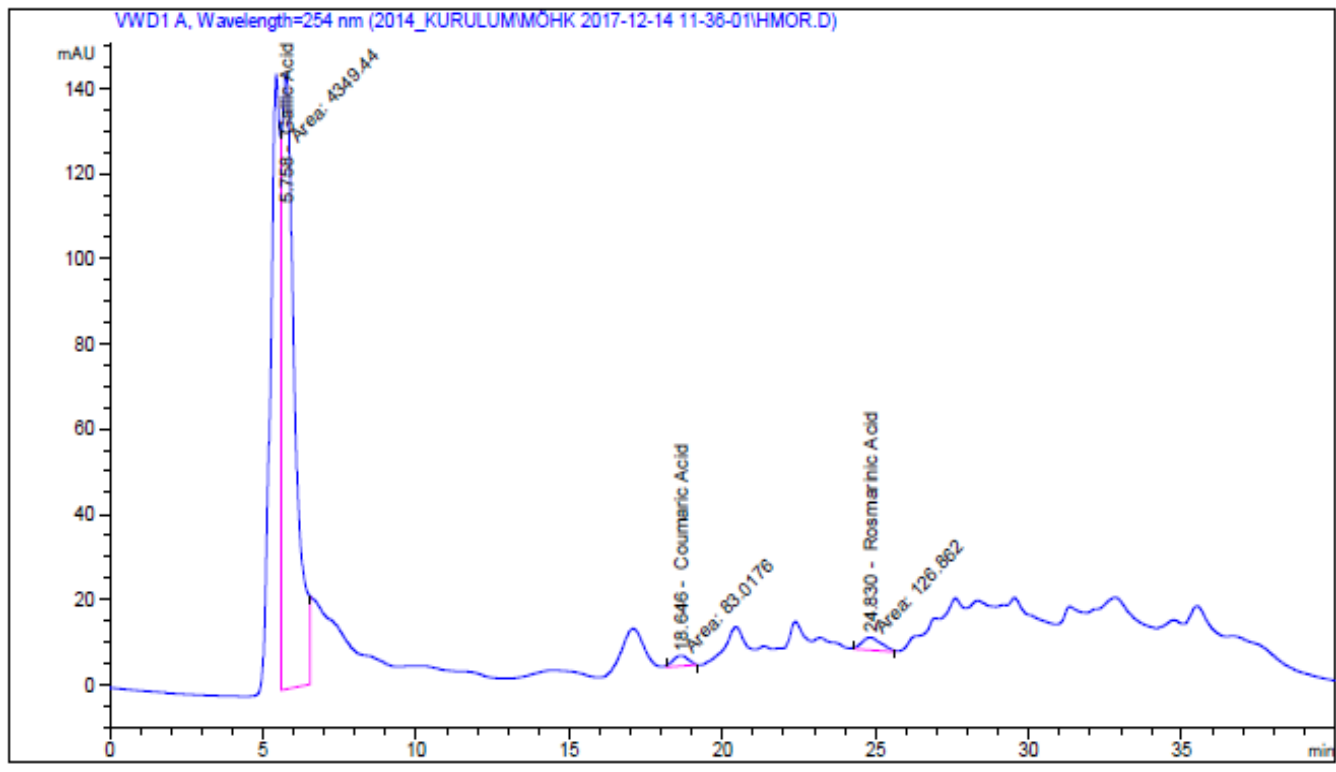
### Ek1

#### Fenolik asit HPLC Sonuçları

Noskapin HPLC kromatogramları



# Morfin HPLC kromatogramları

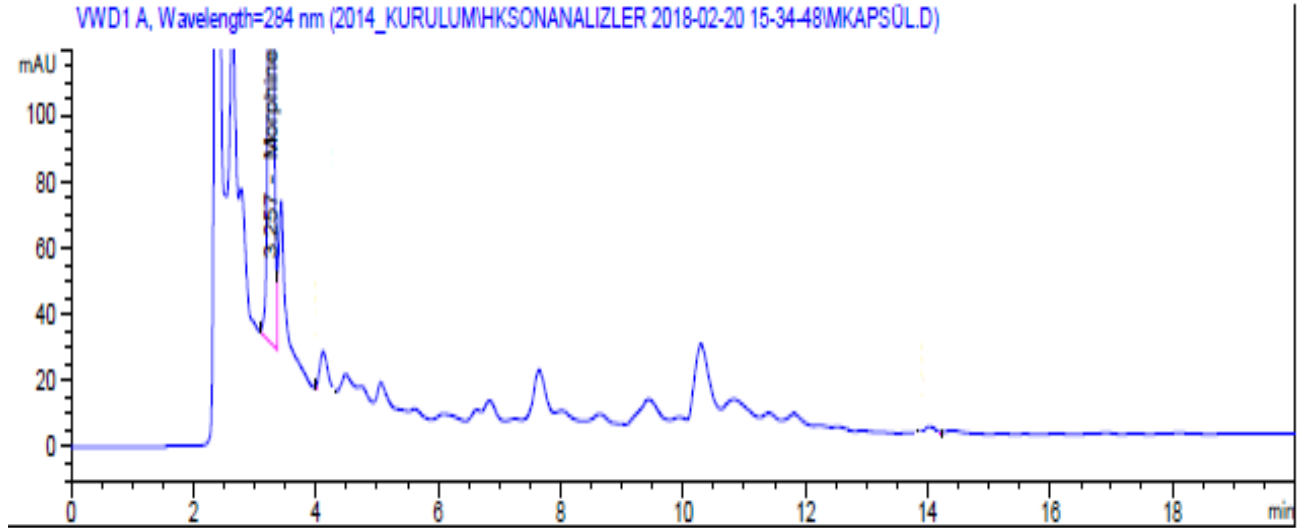
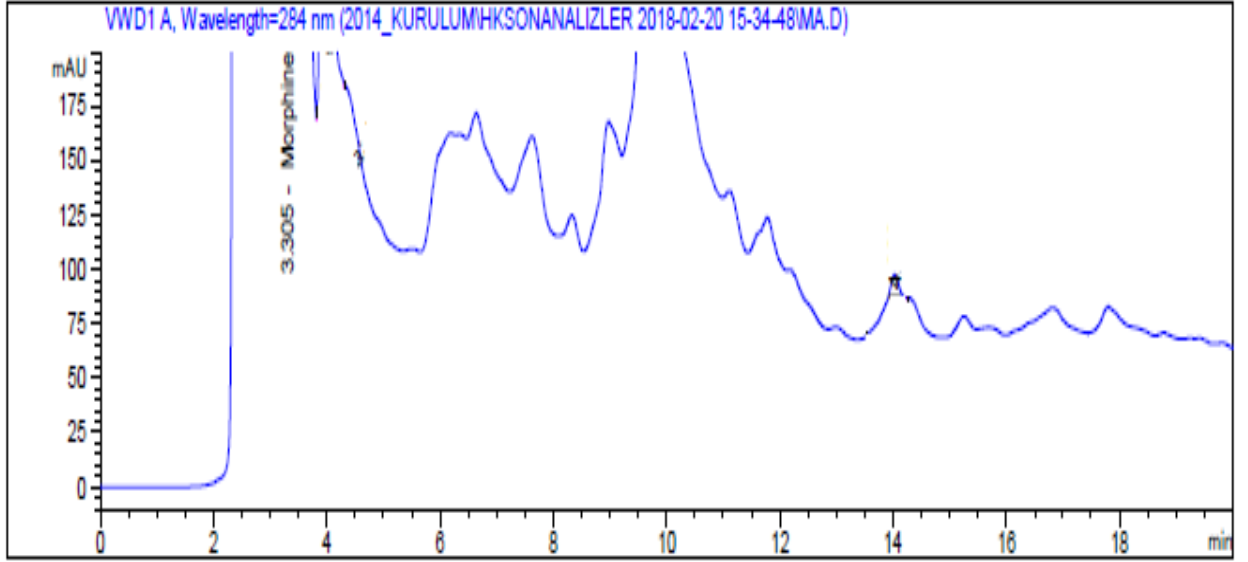


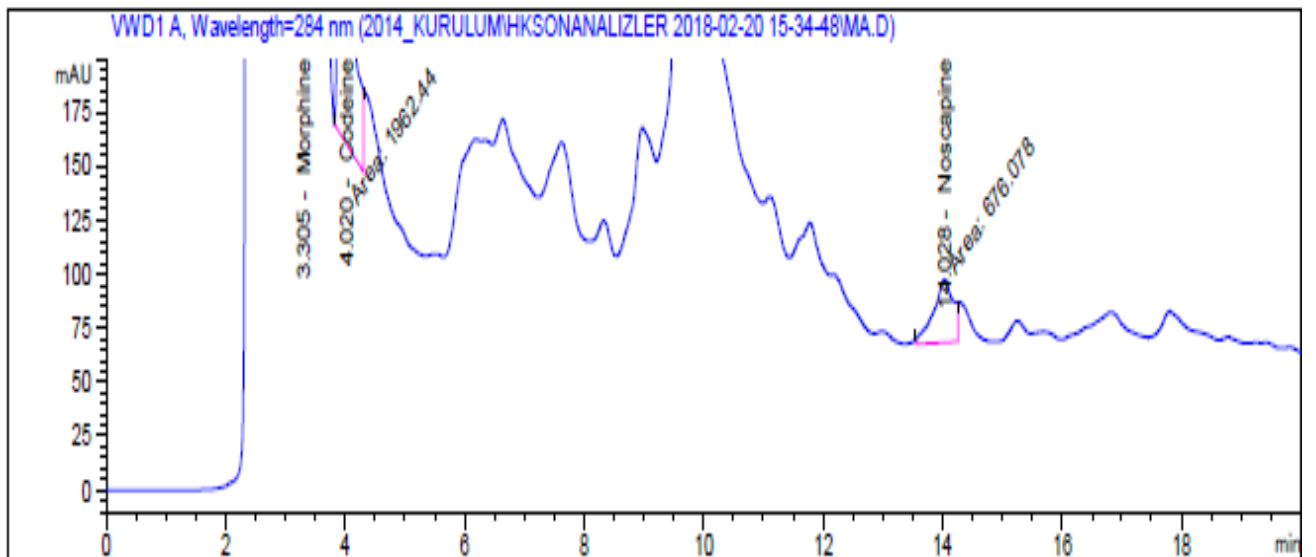
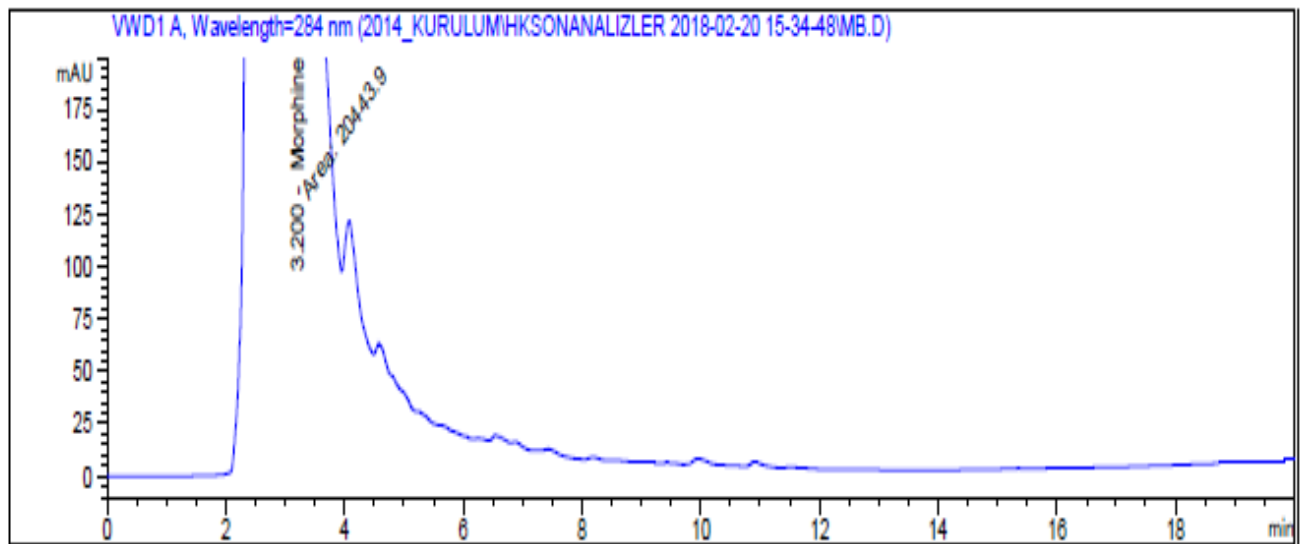


## Ek 2

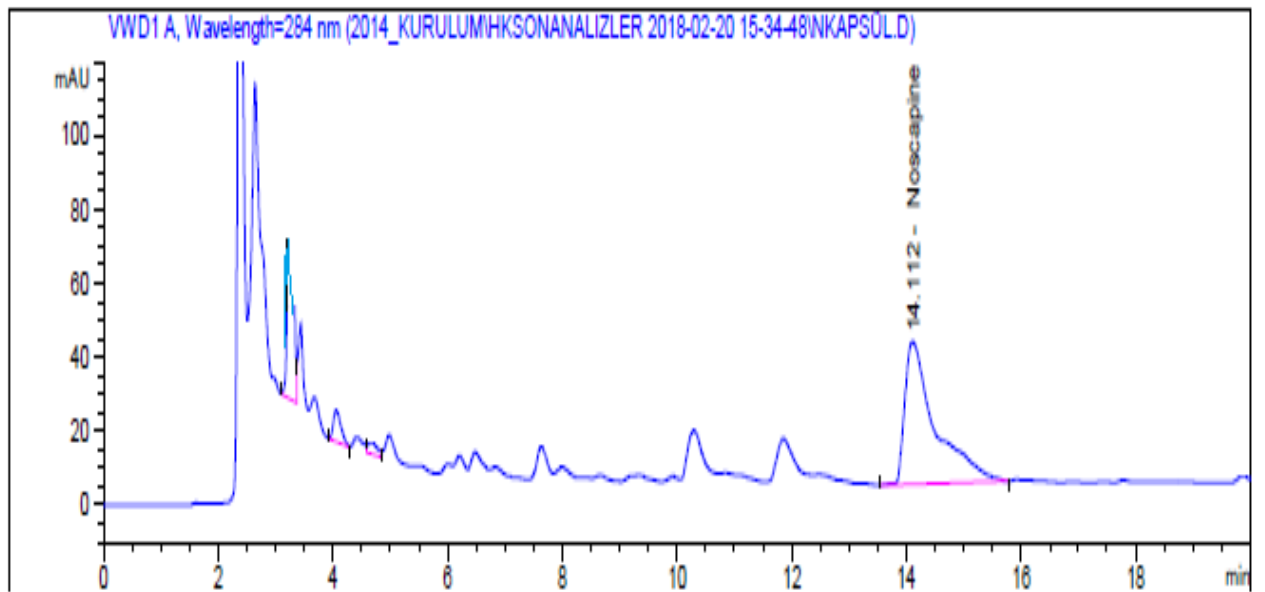
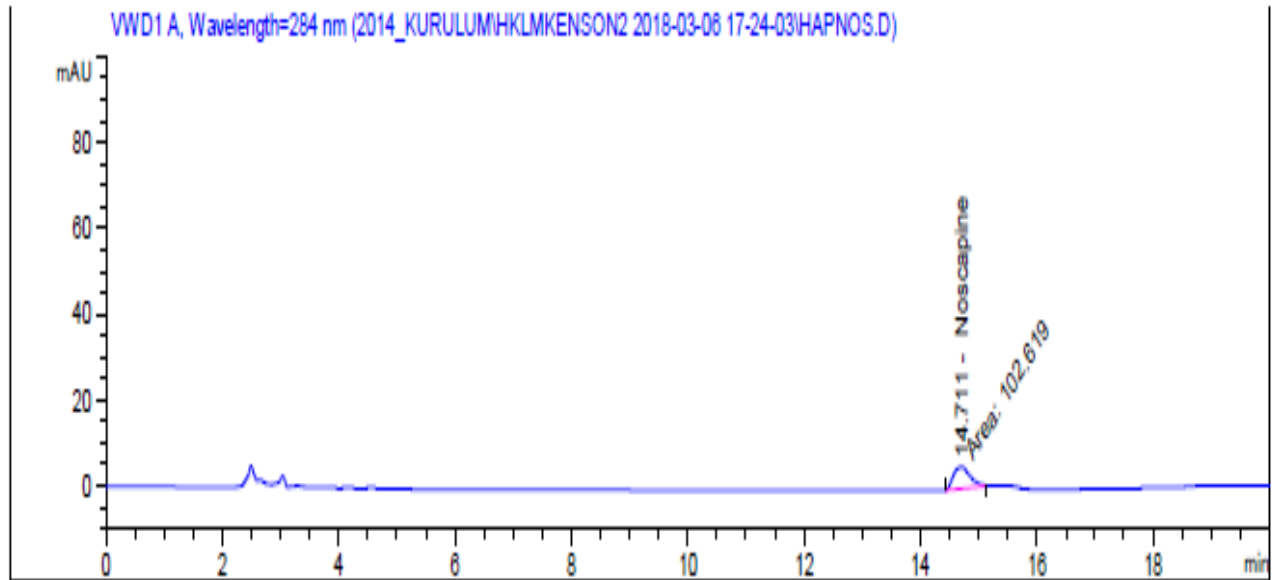
### HPLC ile Morfin ve Noskapin Miktarının Belirlenmesi

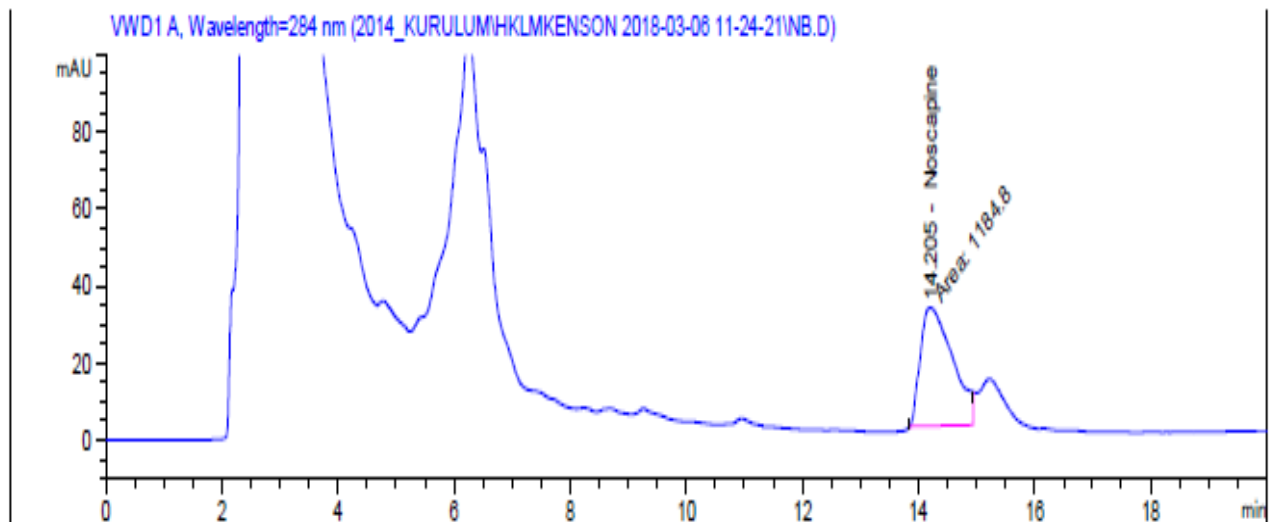
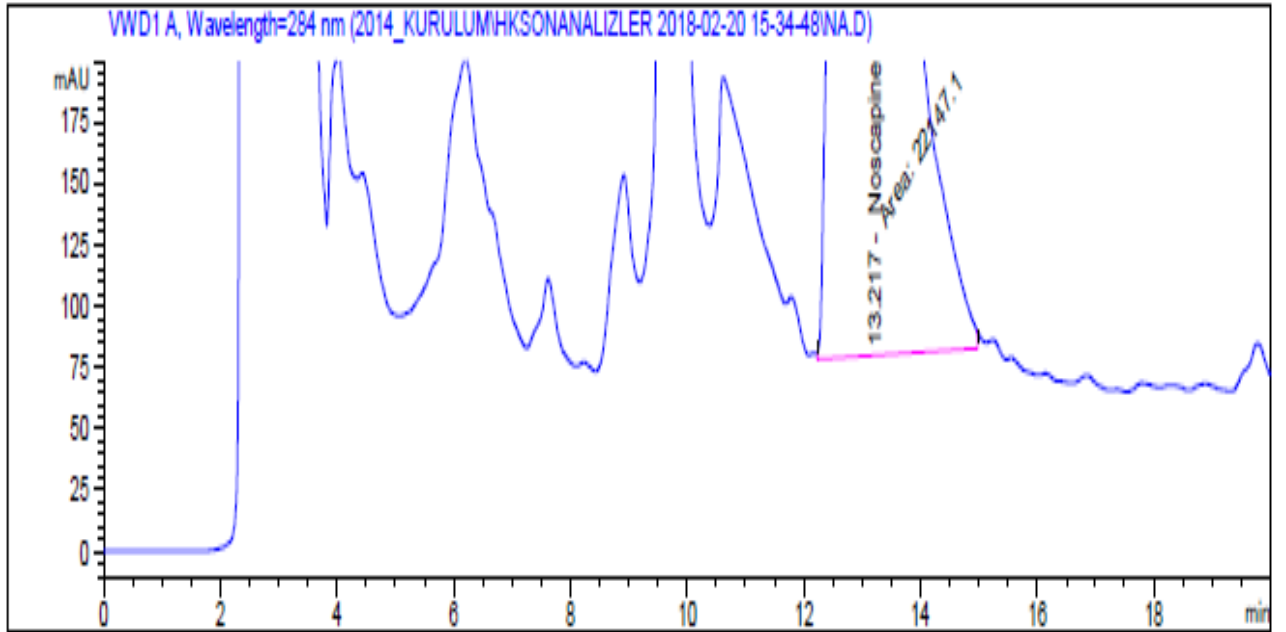
Morfin HPLC kromatogramları





## Noskapin HPLC kromatogramları

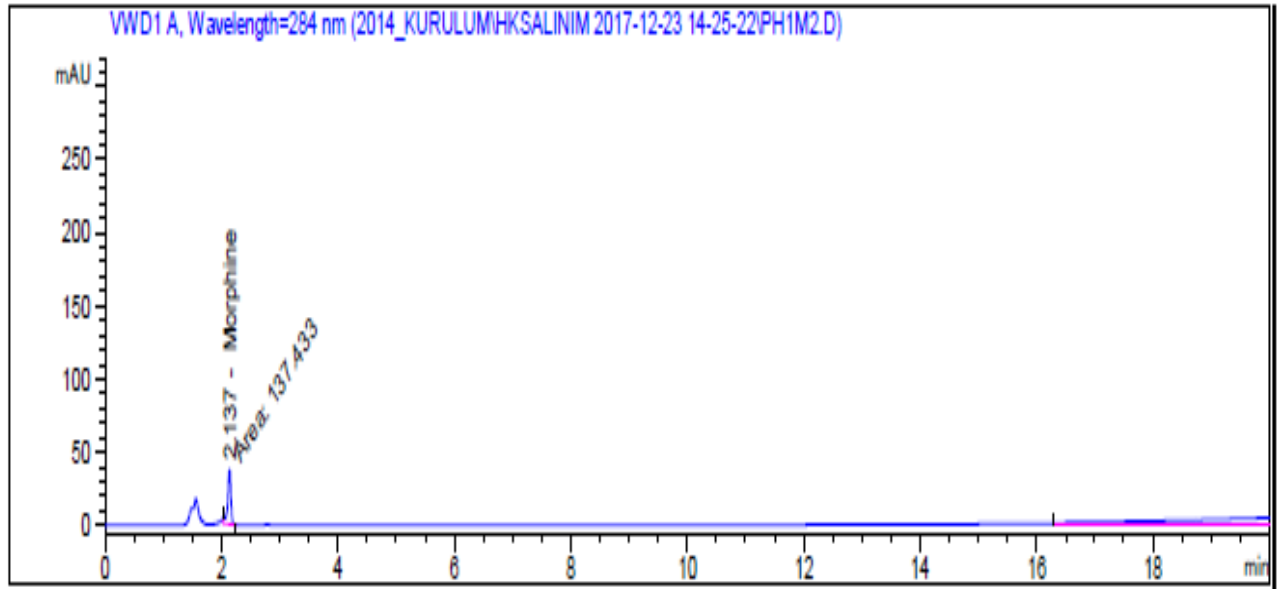
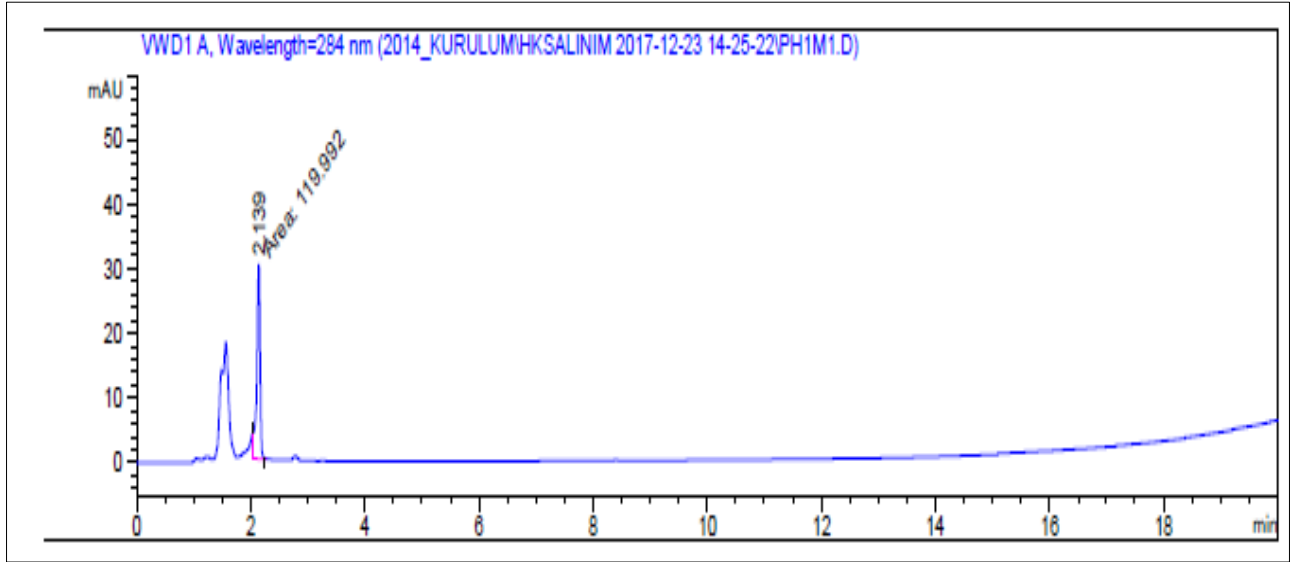


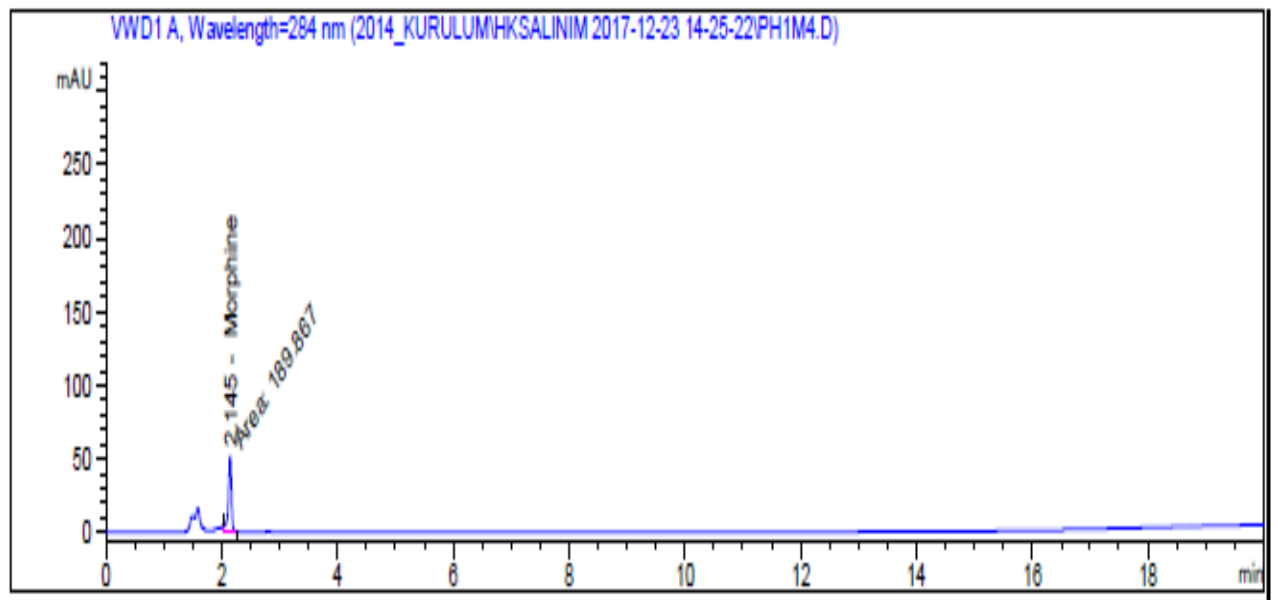
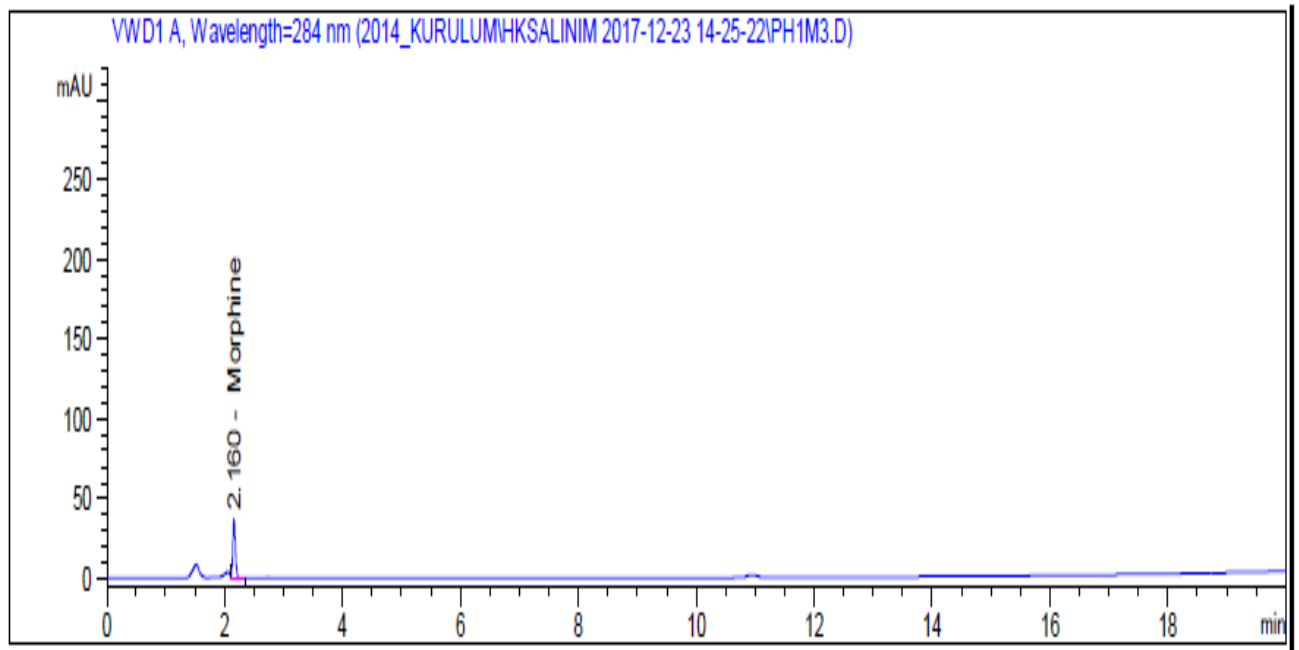


### Ek 3

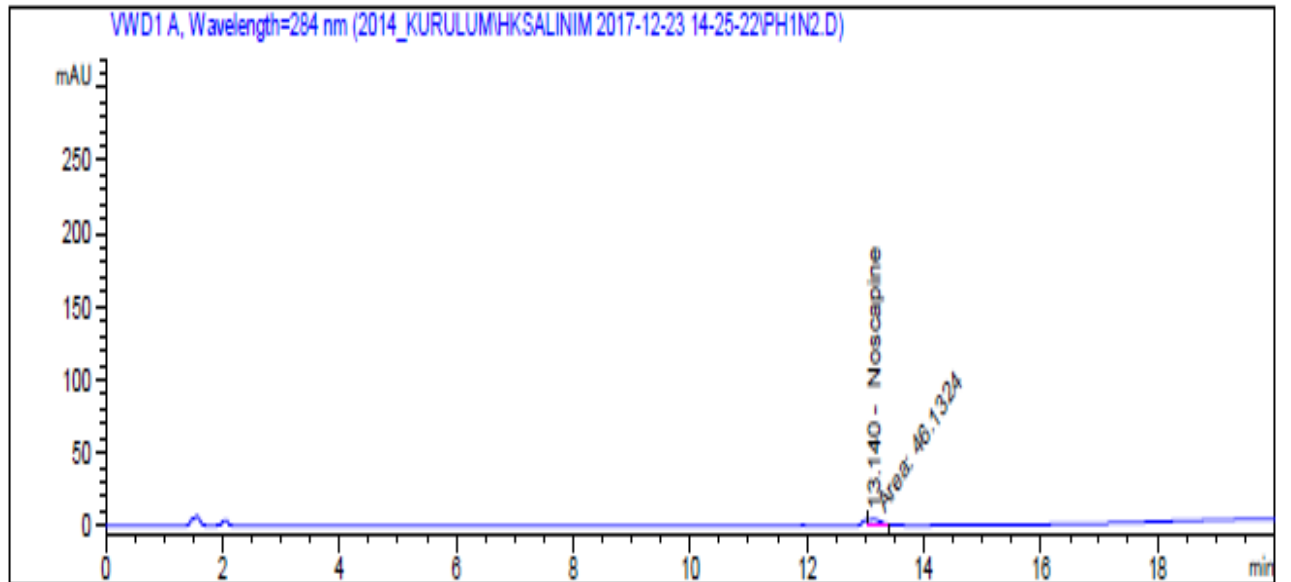
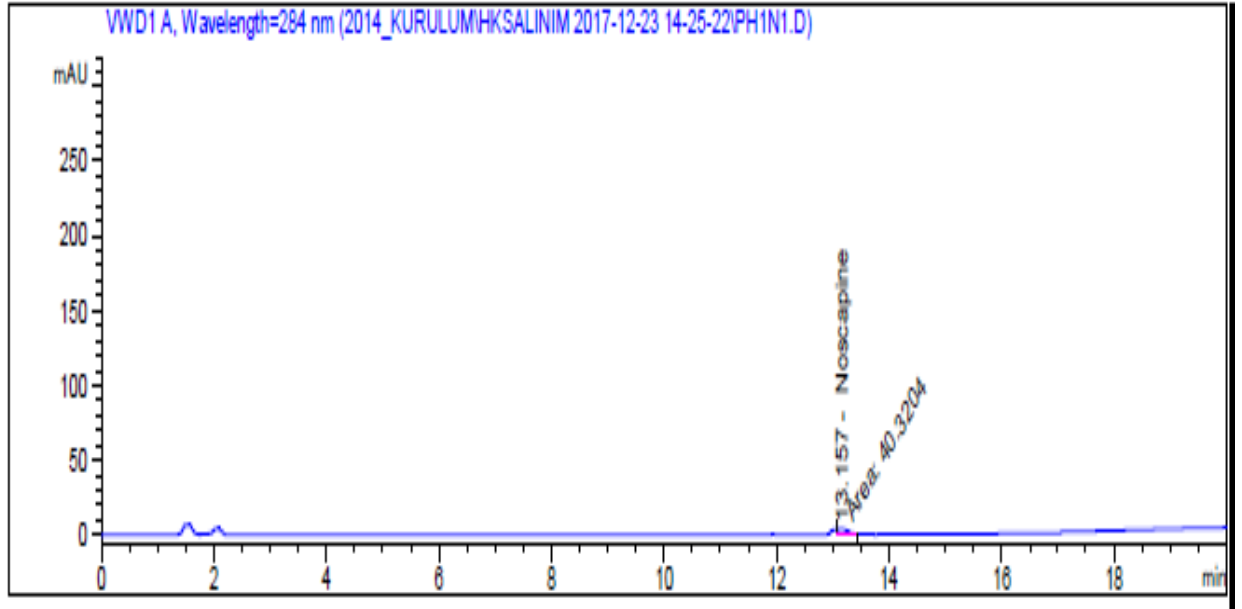
#### *In-vitro* Mide Ortamı HPLC Kromatogramları

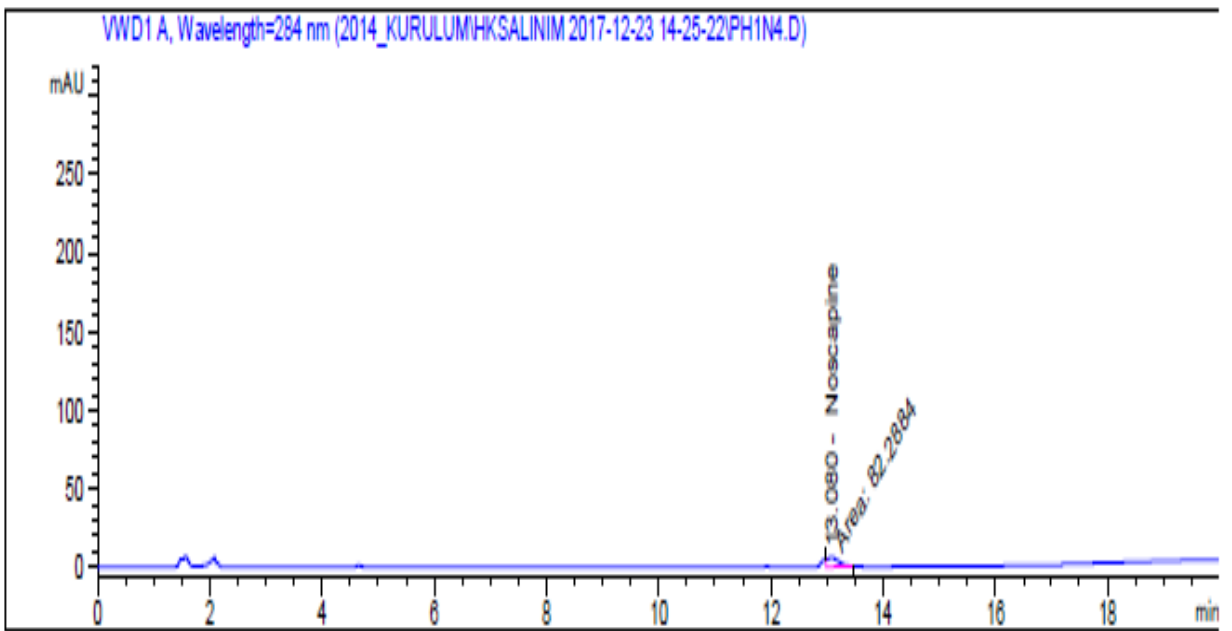
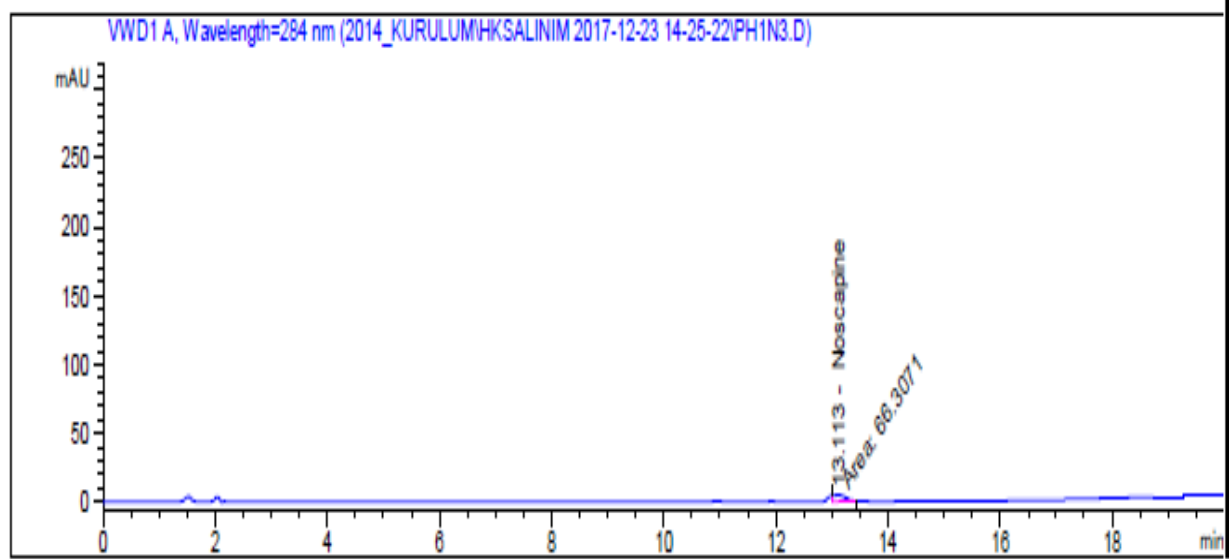
Ph 1,2 ortamında Morfin HPLC kromatogramları





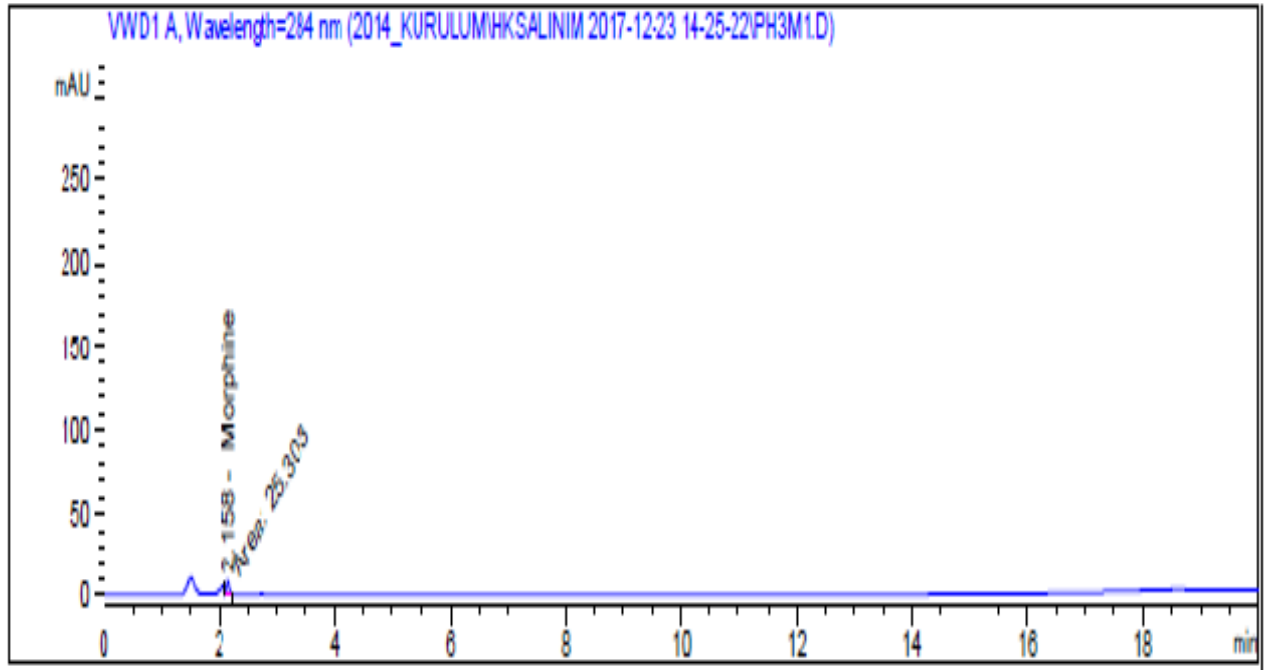
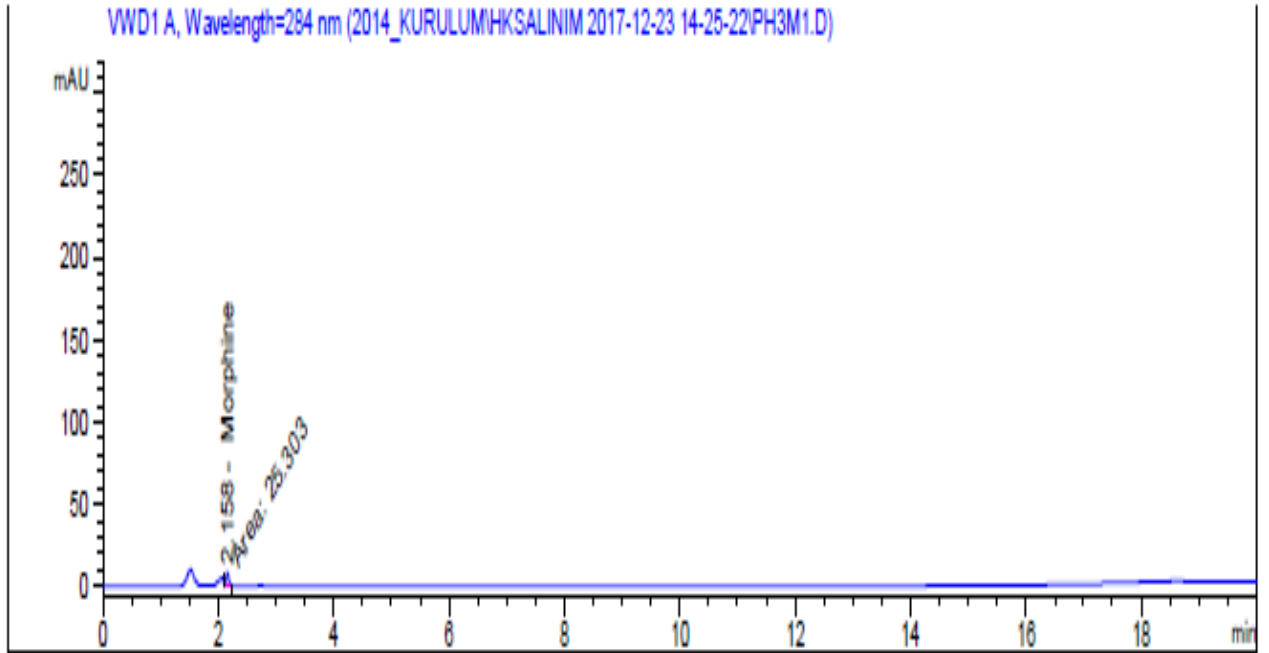
pH 1,2 ortamında noskapin HPLC kromatogramları

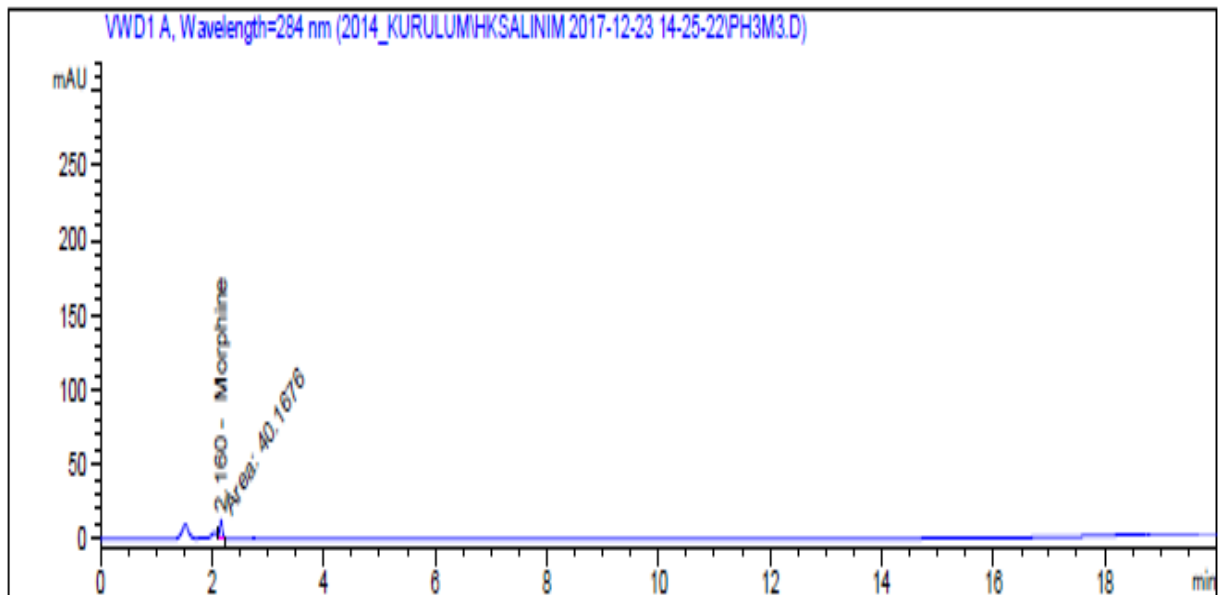
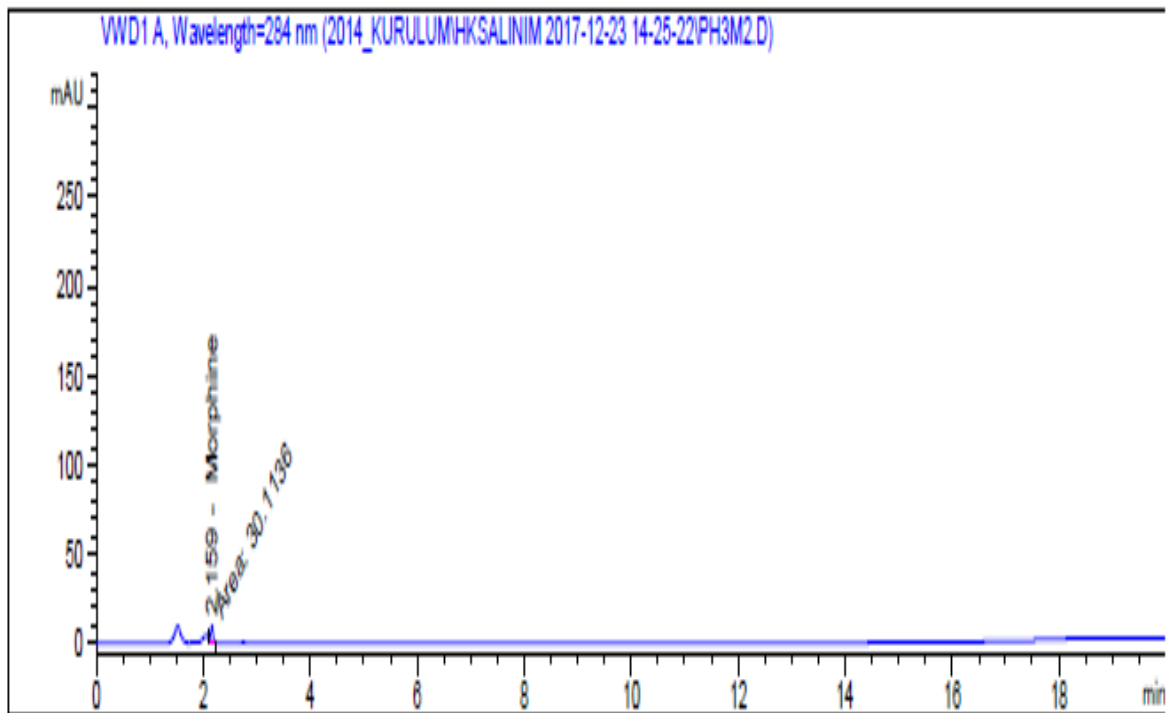


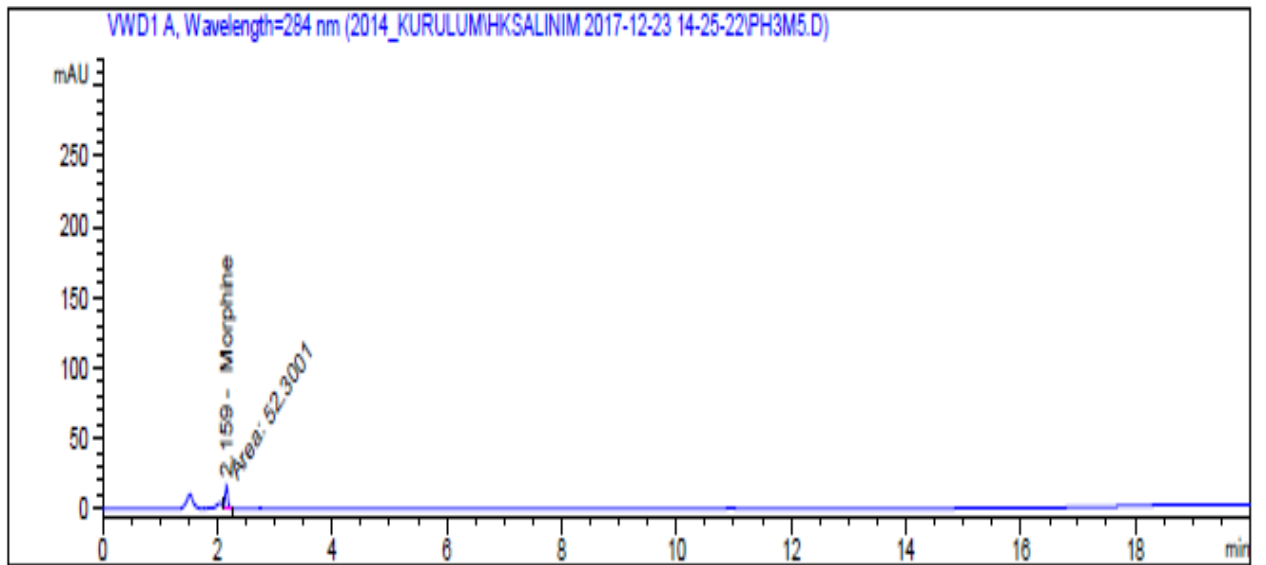
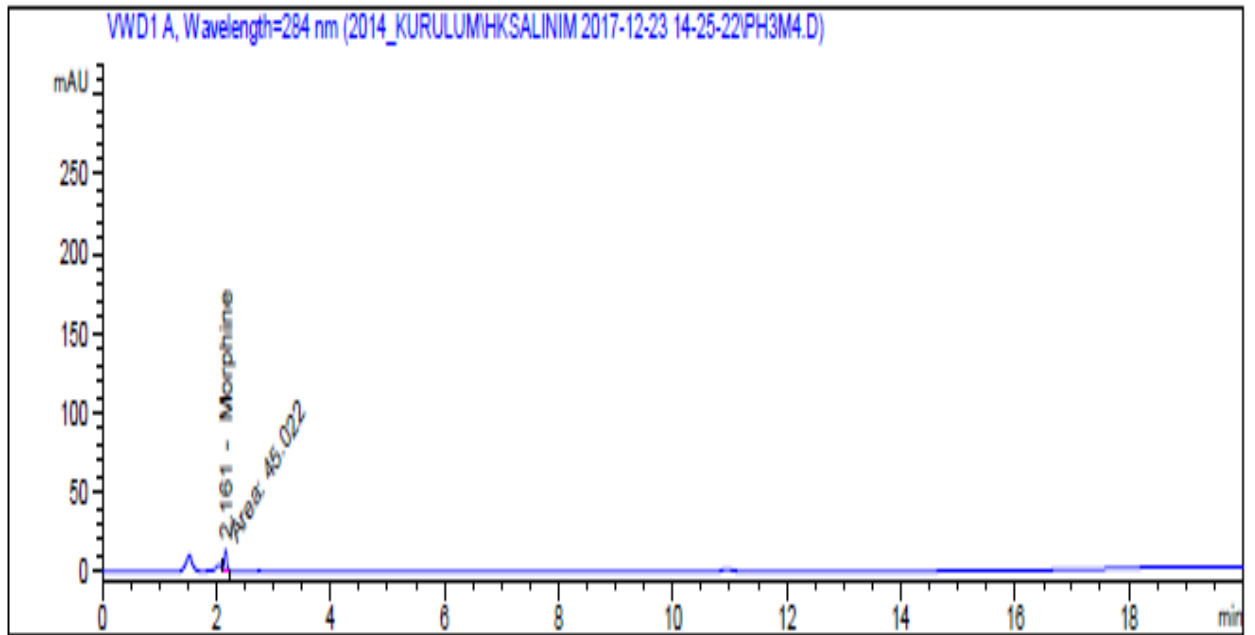


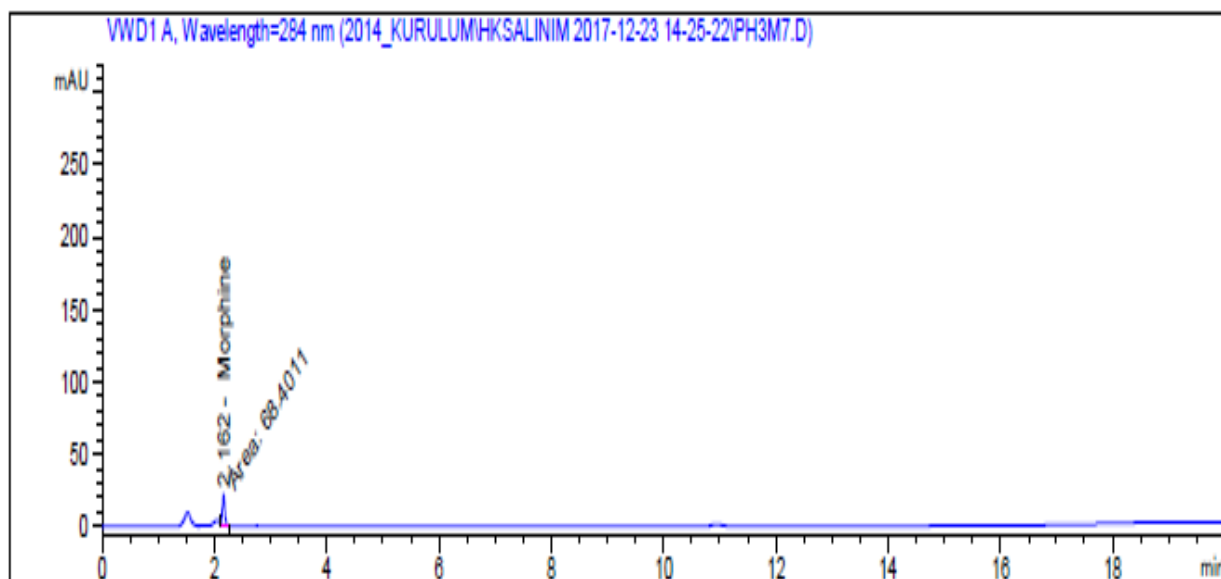
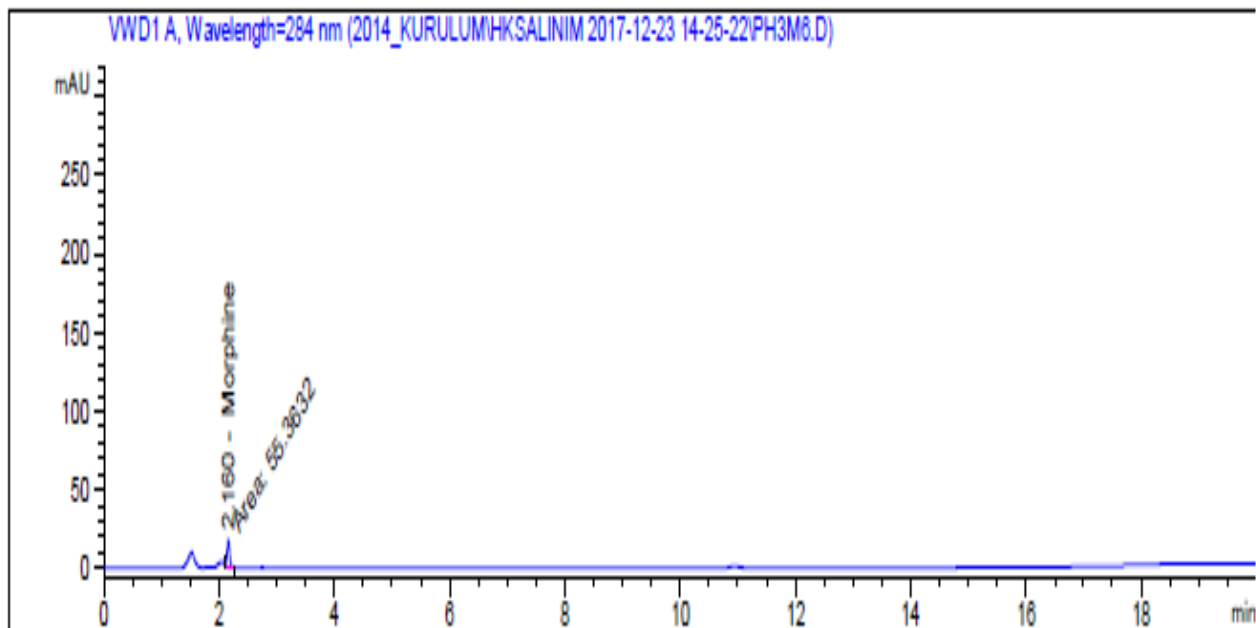


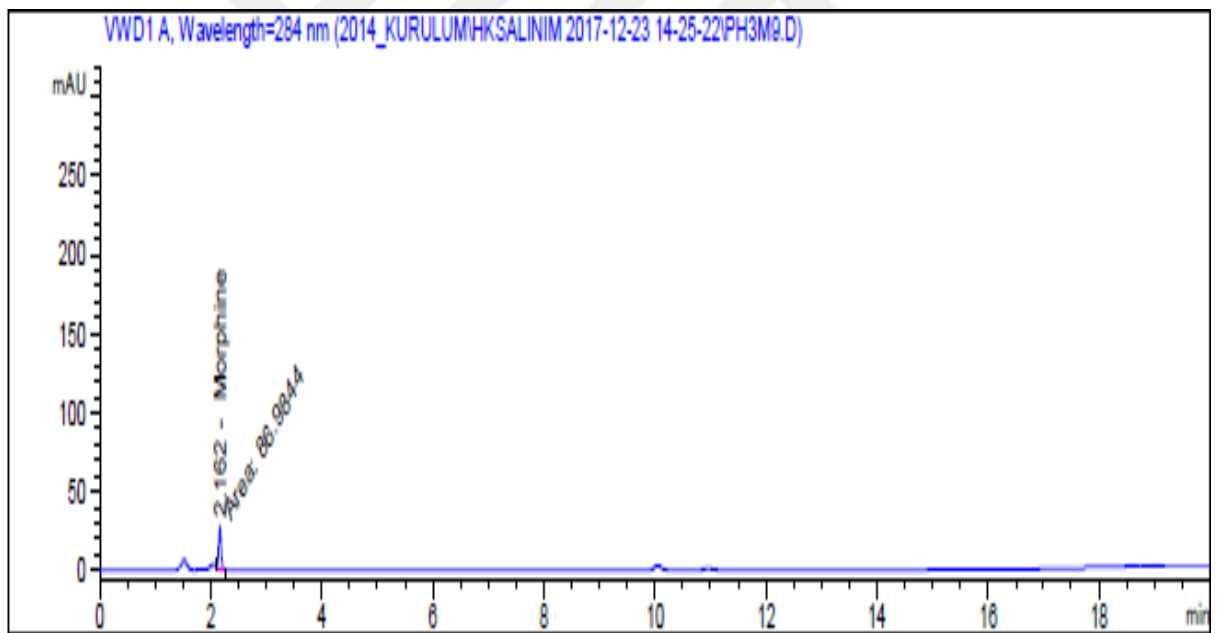
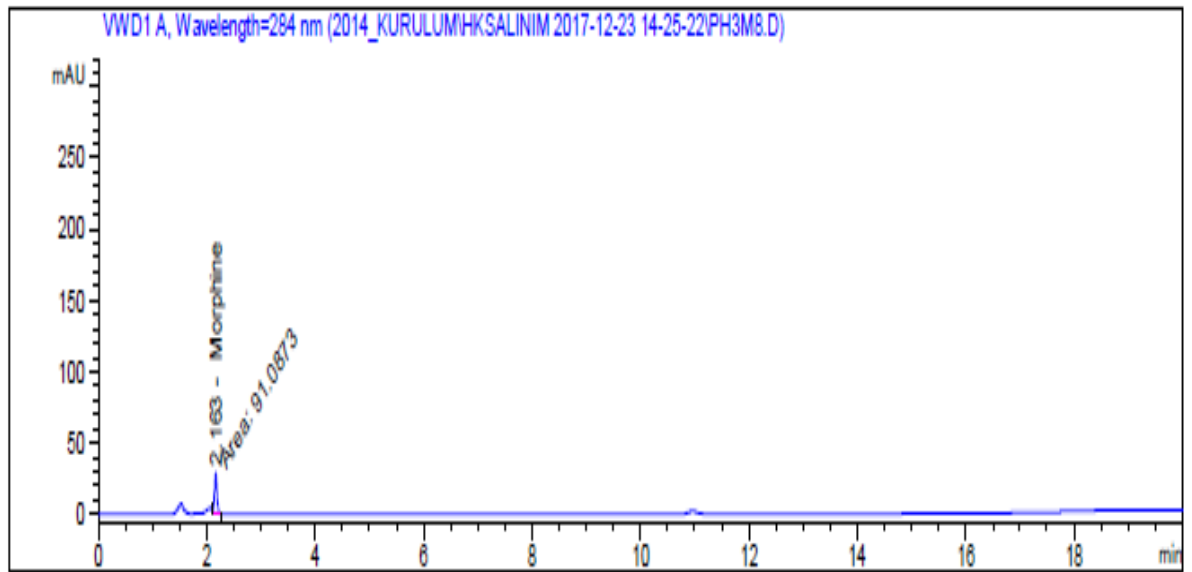
pH 3 ortamında Morfin HPLC kromatogramları

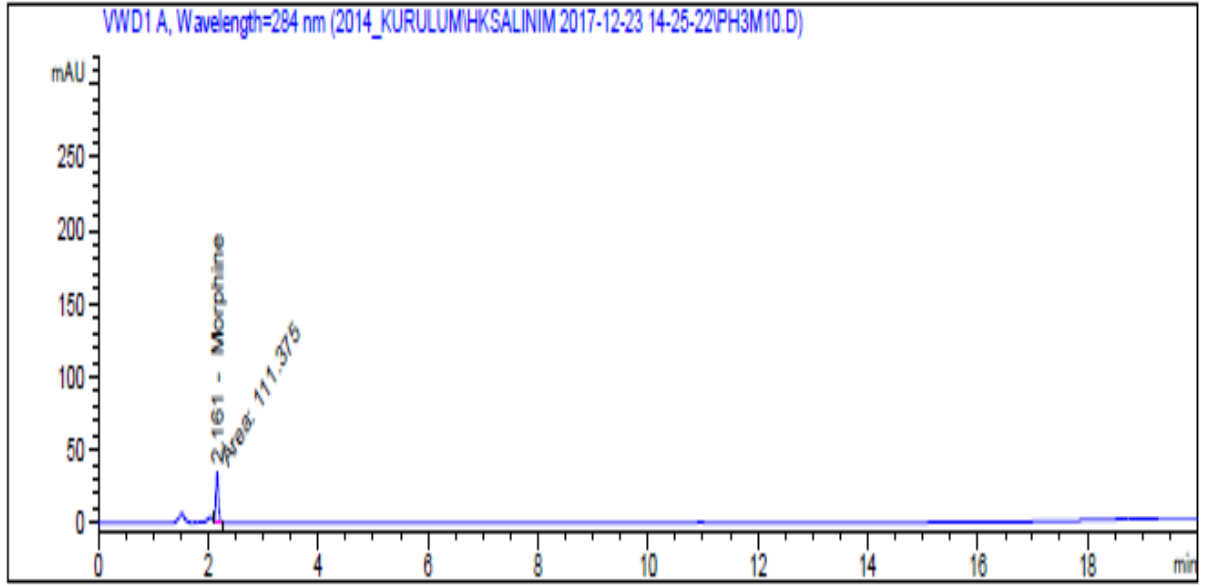




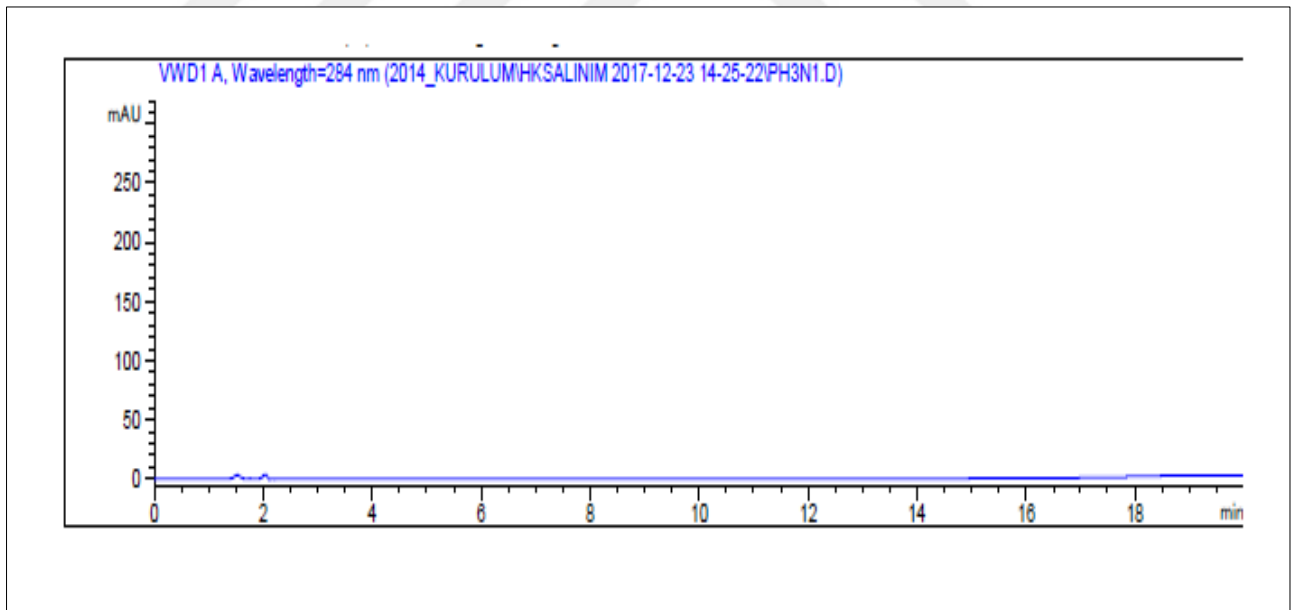


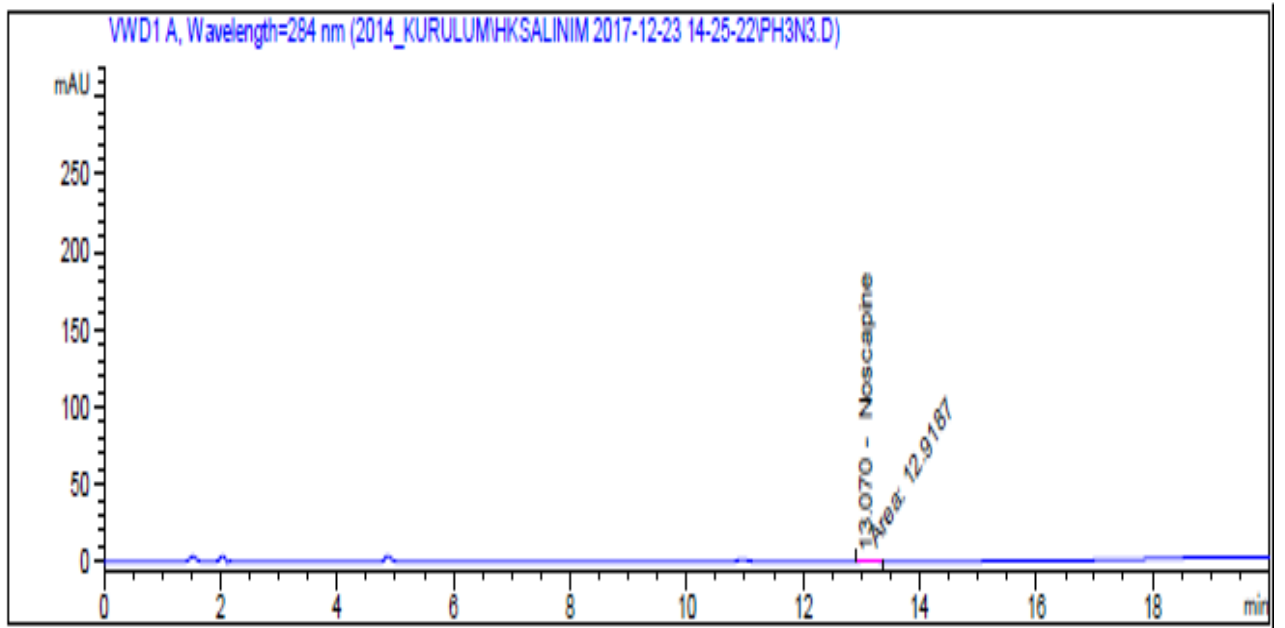
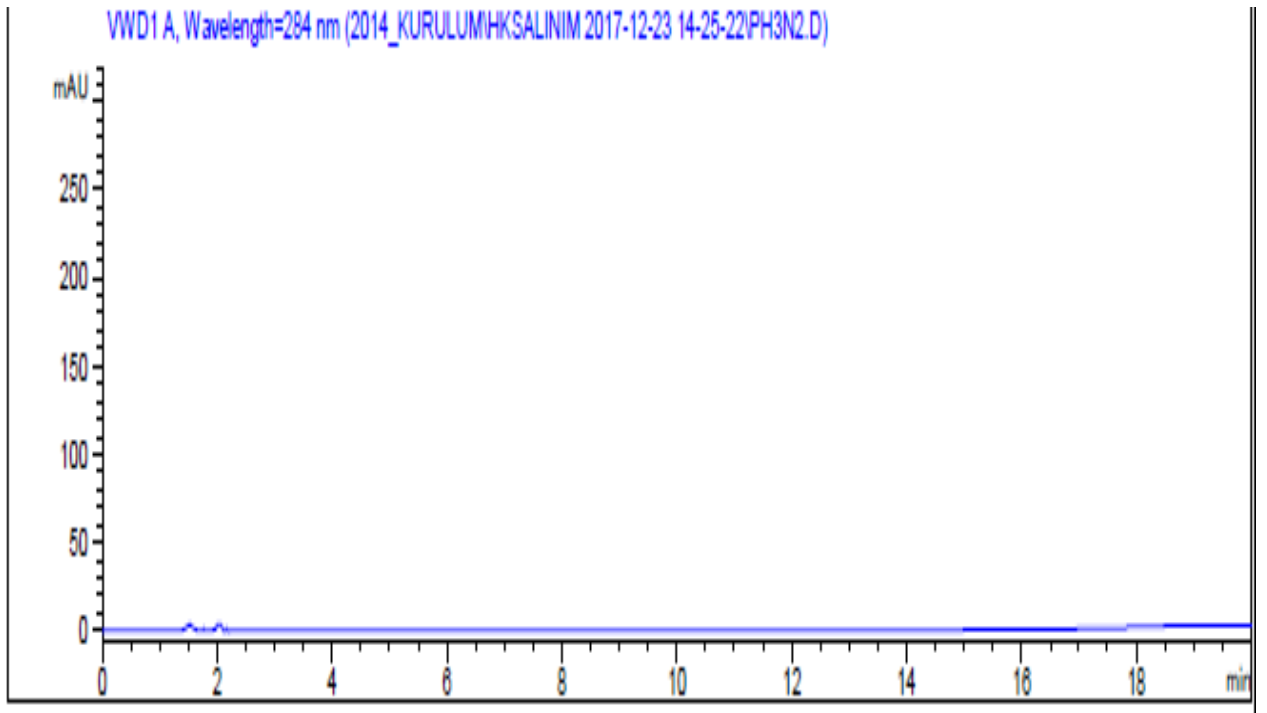


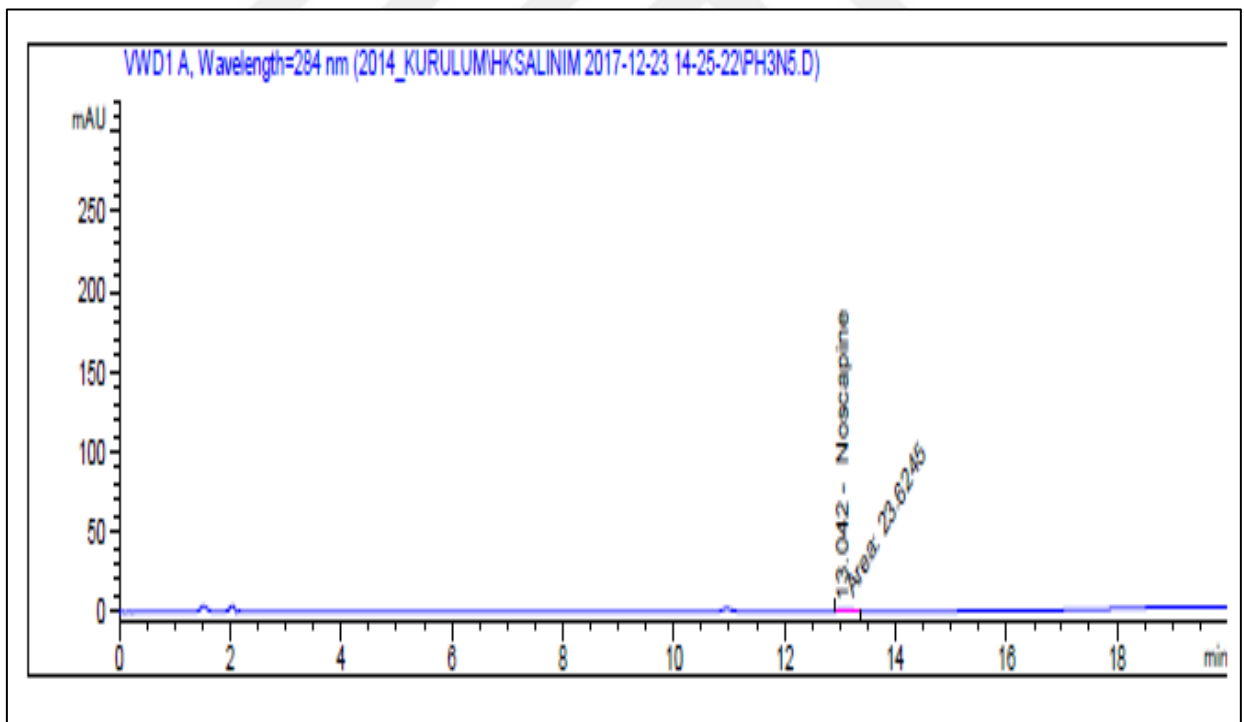
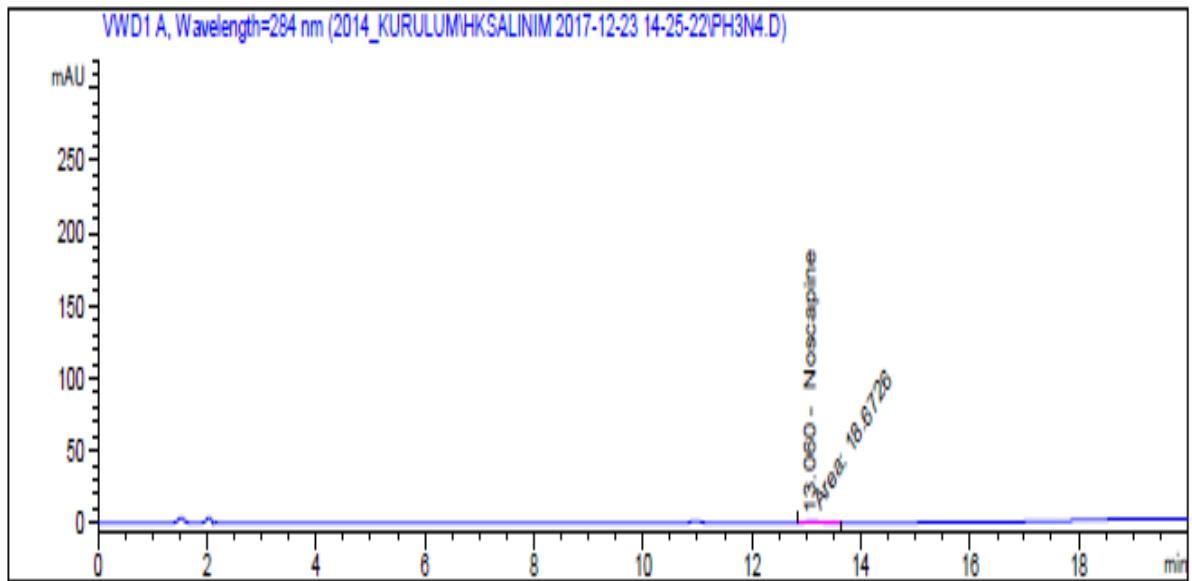




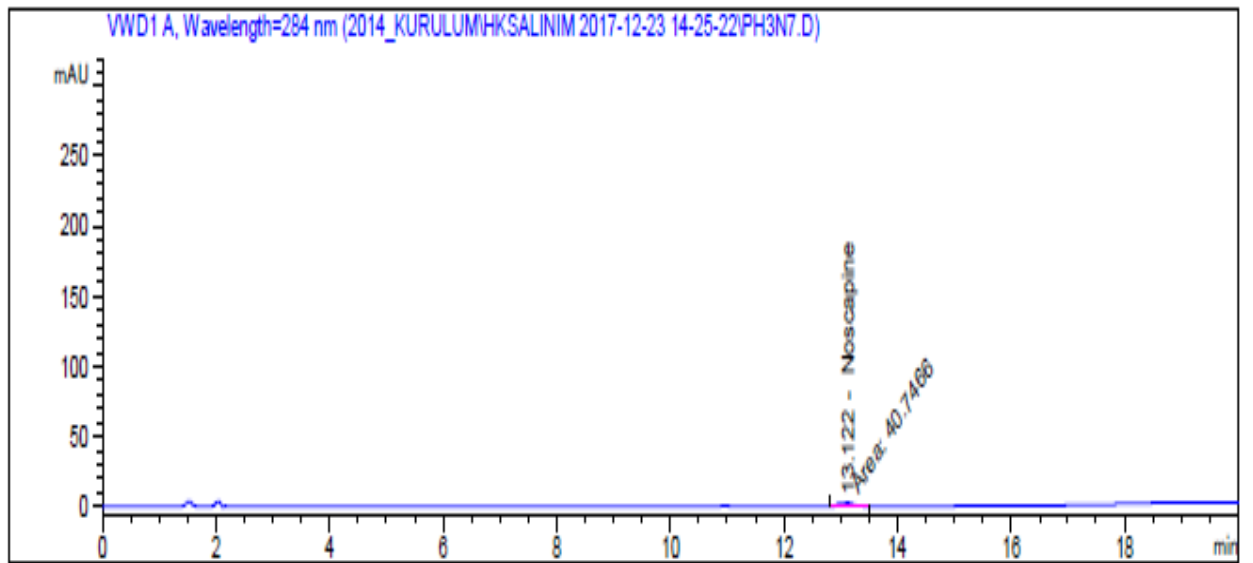
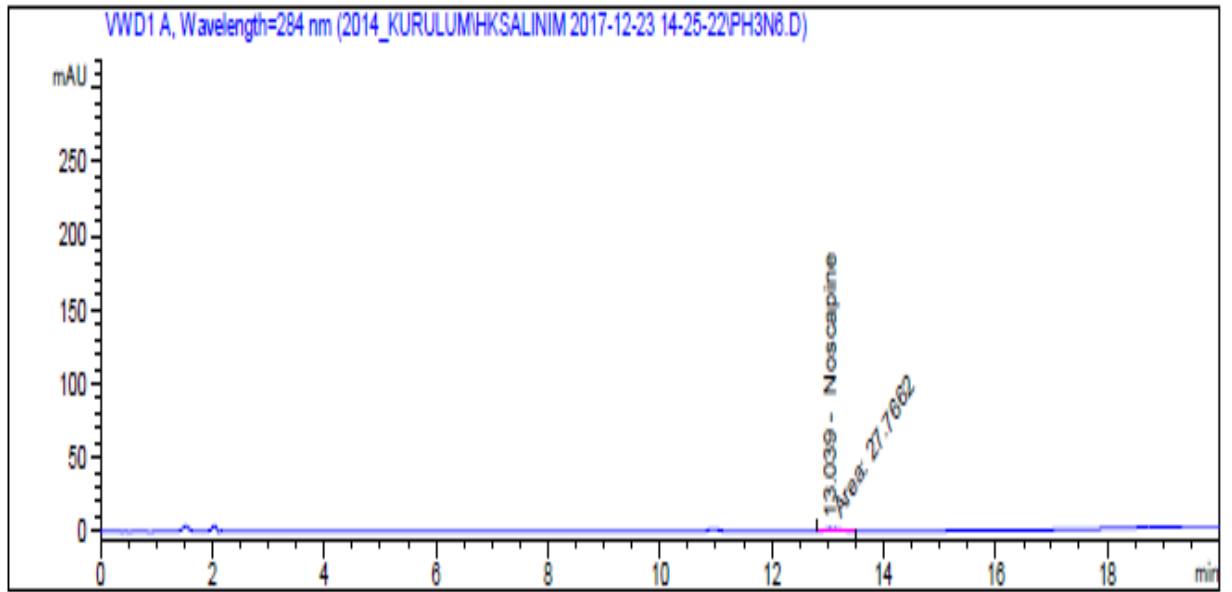
pH 3 ortamında Noskapin HPLC kromatogramları

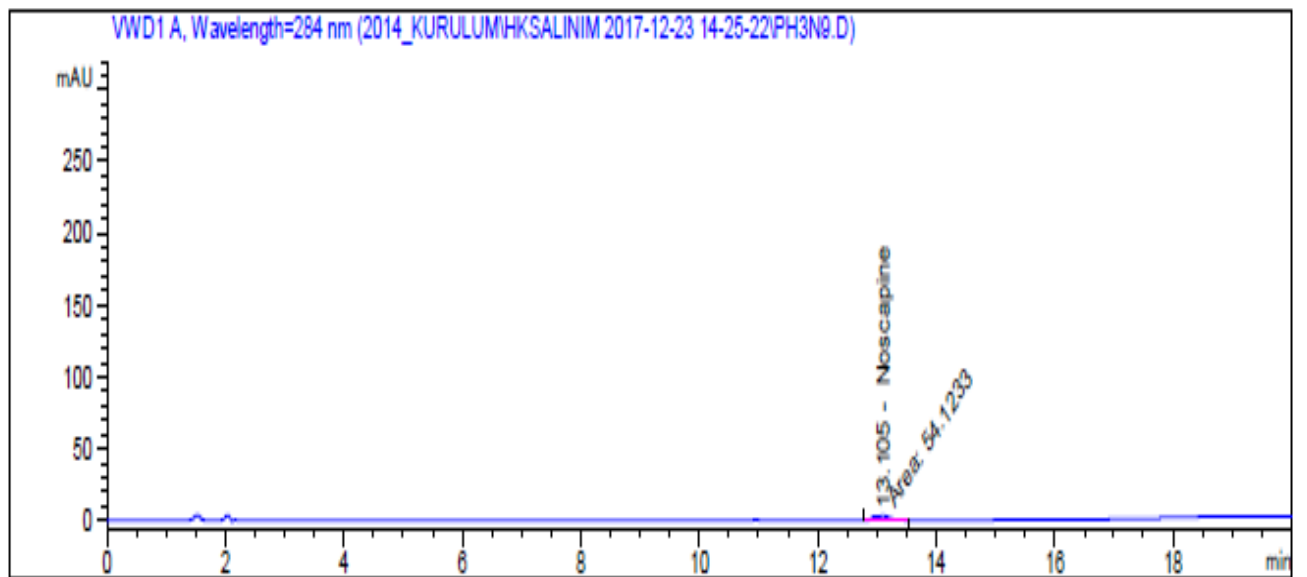
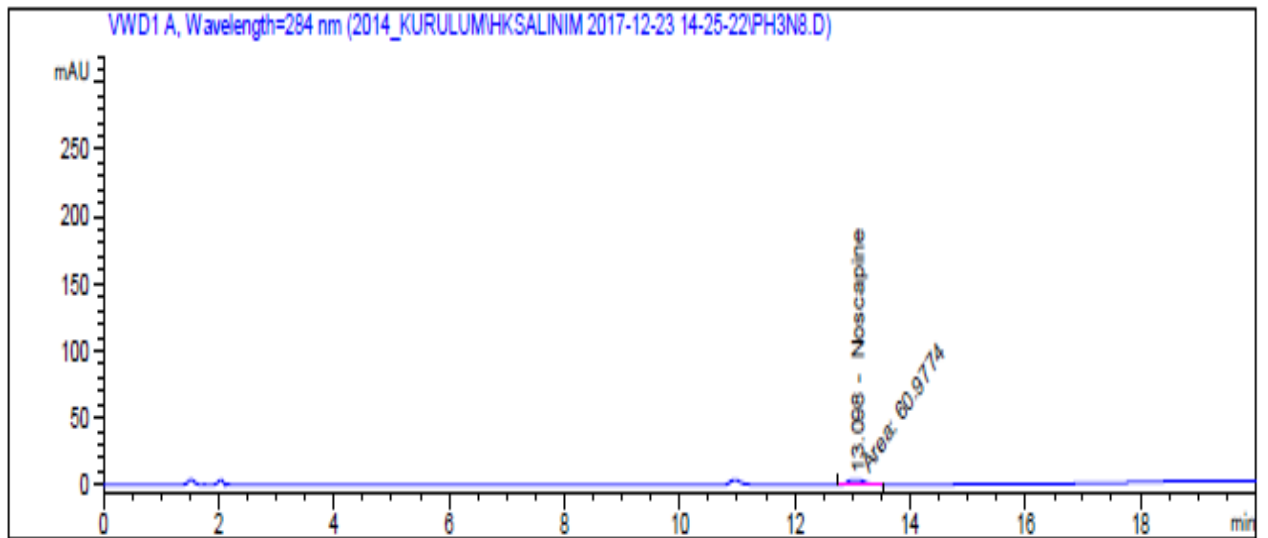


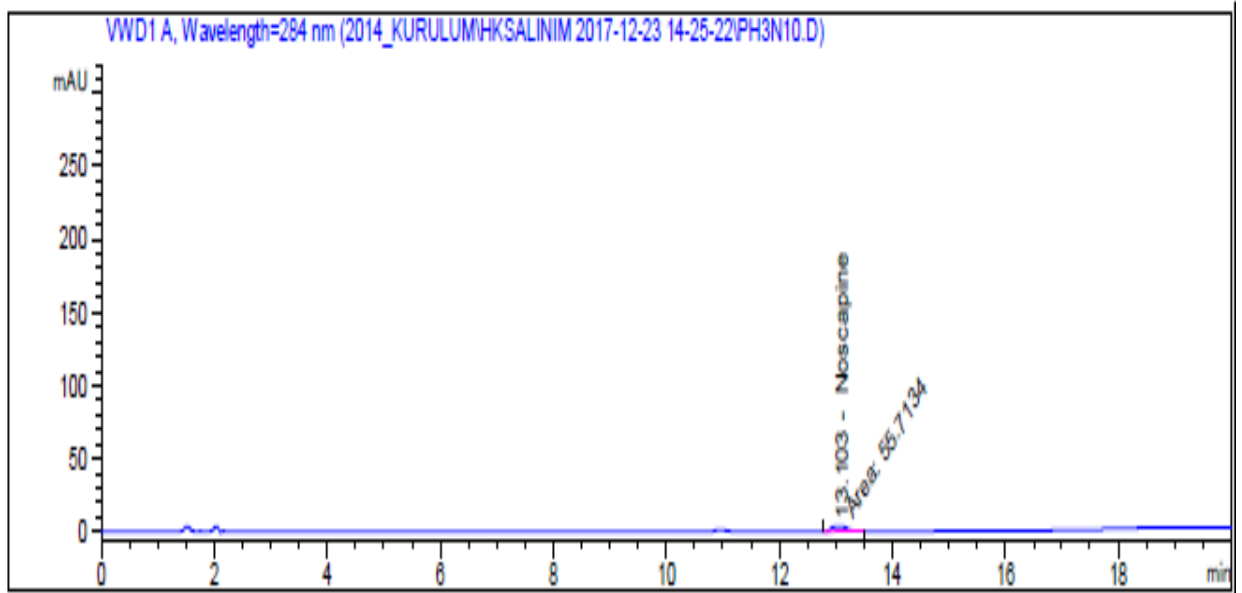








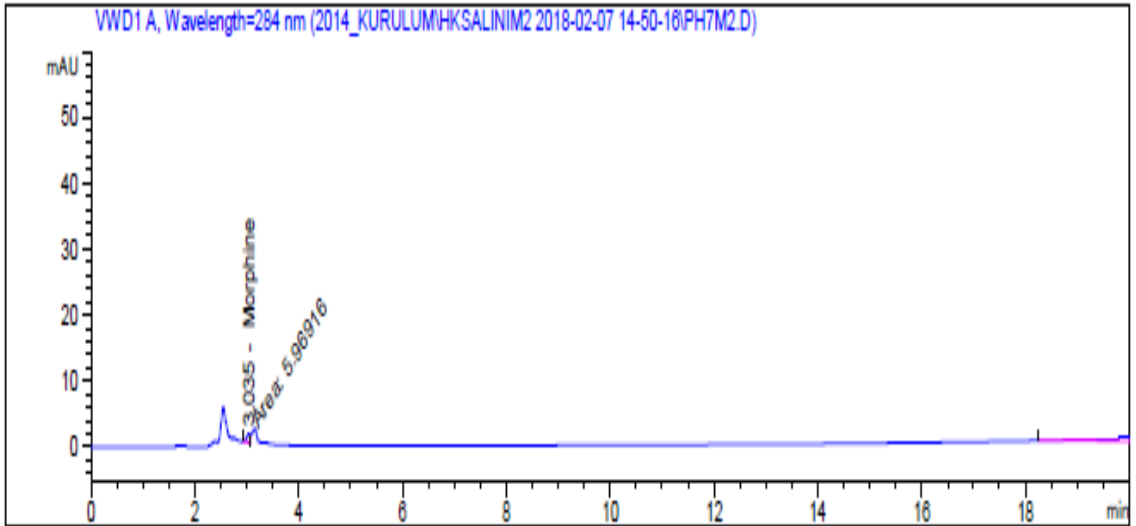
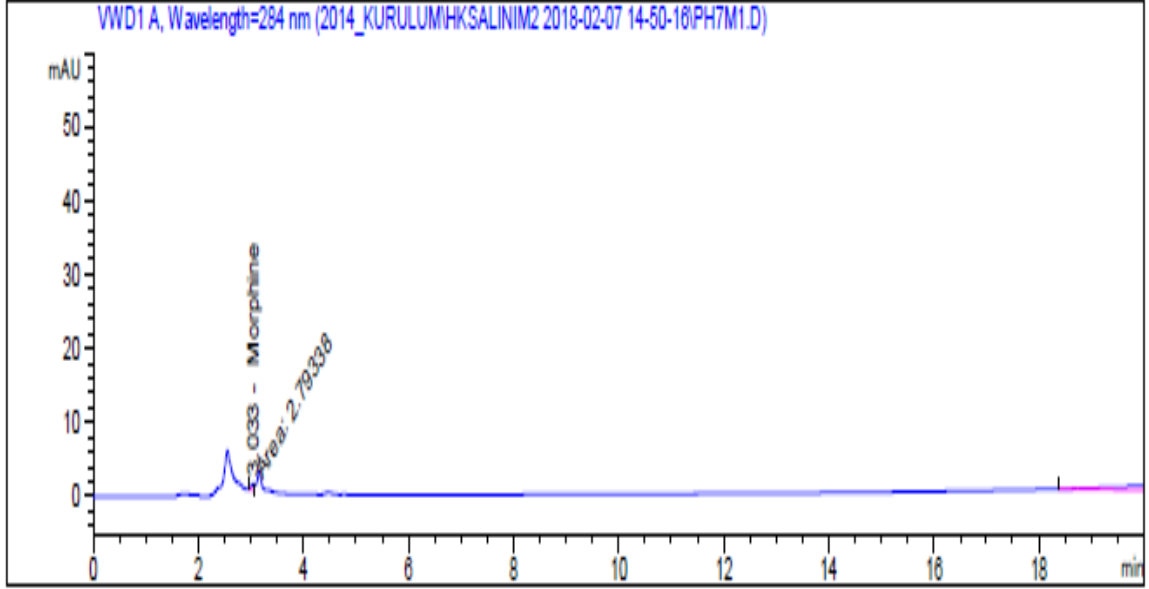


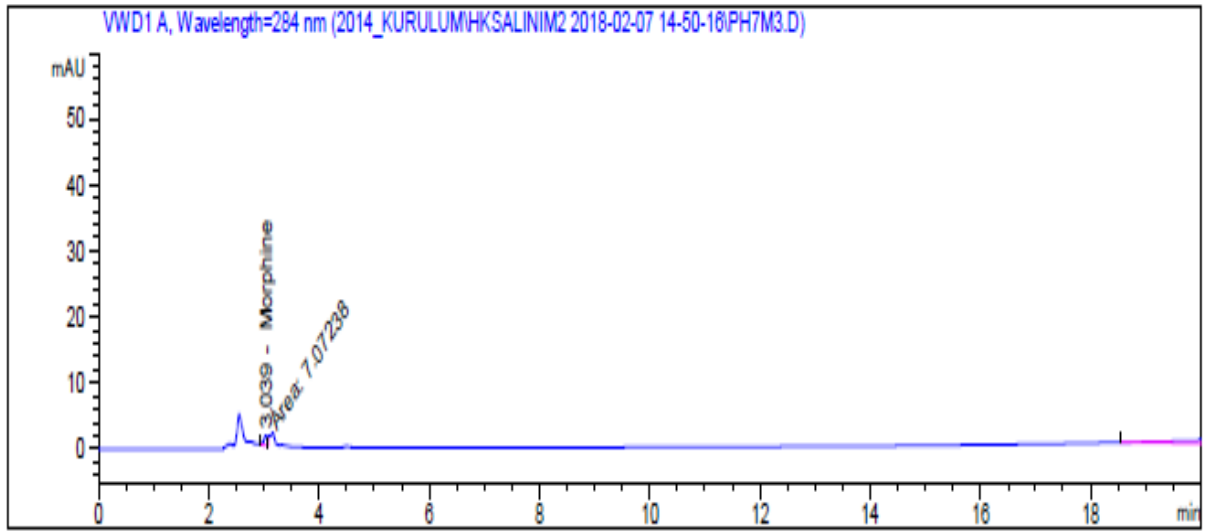


#### Ek 4

### *İn-vitro* İnce Bağırsak Ortamı Kromatogramları

Ph 7,4 Ortamında Morfin HPLC kromatogramları





## Ek 5

### Etik Kurul Kararı

Evrak Tarih ve sayısı: 02/06/2017-E.18151

T.C.  
SAĞLIK BİLİMLERİ BİLİMSEL ARAŞTIRMA VE YAYIN ETİĞİ KURULU  
KARARLARI

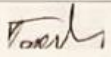
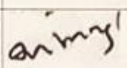
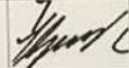
TOPLANTI SAYISI: 06

KARAR TARİHİ: 18.05.2017

Üniversitemiz Bilimsel Araştırma ve Yayın Etiği Yönergesi gereğince, 10.05.2017 günü yapılması planlanan toplantıda yeterli çoğunluk sağlanamadığı için toplantının 18.05.2017 tarihinde yapılmasına karar verilmiş olup Sağlık Bilimleri Bilimsel Araştırma ve Yayın Etiği Kurulu, Kurul Başkanı Prof. Dr. Ömer KARAHAN başkanlığında toplanarak gündem maddelerinin görüşülmesine geçilmiştir.

KARAR 2017-34

Proje yürütücüsü Prof. Dr. Safiye Elif KÖRCAN'ın üniversitemiz Moleküler Biyoloji ve Genetik Bölümü öğrencisi Havva KÖLEMEK ile birlikte " ile birlikte Bilimsel Araştırma Projeleri (BAP) Birimine başvurmak üzere hazırlamış olduğu "Hidroksiapatit Nanomoleküllerine Tutturulmuş Tıbbi Bitki Ekstratlarının Karakterizasyon ve Biyoaktivite Çalışmaları" başlıklı araştırmasının ve bu araştırma kapsamında uygulanacak yöntemlerin etik açıdan uygun olduğuna katılanların oybirliği ile karar verilmiştir.

No	Üyenin Adı Soyadı	İmza	No	Üyenin Adı Soyadı	İmza
	Prof. Dr. Ömer KARAHAN Başkan		5	Prof. Dr. Rıdvan ÜNAL Üye	KATILMADI
2	Prof. Dr. celal ARTUNÇ Başkan Yardımcısı		6	Prof. Dr. Suat ŞAHİNLER Üye	
3	Prof. Dr. safiye Elif KORCAN Üye	KATILMADI	7	Prof. Dr. Kadir ÖZCAN Üye	
4	Prof. Dr. Erden Erol ÜNLÜER Üye	KATILMADI		Av. Fatih GÜNGÖR Raportör	

5.

Bu belge 5070 sayılı Elektronik İmza Kanununun Maddesi gereğince güvenli elektronik imza ile imzalanmıştır.

## ÖZGEÇMİŞ

### Kişisel Bilgiler

Soyadı, adı : KÖLEMEK, Hava

Uyruğu :T.C.

Doğum Tarihi ve yeri :01.07.1994, Ordu

Öğrenim Durumu : Yüksek Lisans Öğrencisi

Telefon : 538 387 3883

E-mail : hava.klmk@gmail.com

### Eğitim

Derece	Bölüm/Program	Üniversite	Yıl
Lisans	Moleküler Biyoloji ve Genetik	Uşak Üniversitesi	2016
Y.Lisans	Moleküler Biyoloji ve Genetik	Uşak Üniversitesi	Devam ediyor

### İş Deneyimi

Radboud University Medical Center 'da New Horizons Erasmus programı ile 2,5 aylık stajyerlik (2016)

Dokuz Eylül Üniversitesi, Tıbbi Biyoloji ve Genetik Ana Bilim Dalı laboratuvarında gönüllü stajyerlik (2014).

Devlet hastanesinde patoloji laboratuvarında bir aylık gönüllü staj deneyimi (2013-2015).

### Yabancı Dil

İngilizce

## Yayınlar

Uluslararası bilimsel toplantılarda sunulan ve bildiri kitabında (*Proceedings*) basılan bildiriler:

- S. E. Korcan, İ. Bulduk, Y. S. Karafakıoğlu, M. Öztürk, H. Kölemek, A. Kahraman, Total Phenolic Content And Antimicrobial Activity Of Methanolextract Of *Geraniummacrorrhizum L.* (Geraniaceae) Naturallyfound İn Turkey, I. International Congress On Medicin Aland Aromatic Plants “Natural And Healthy Life”, 2017.
- Y. S. Karafakıoğlu, İ. Bulduk, , S. E. Korcan, M. Öztürk, H. Kölemek, A. Kahraman, Determination Of Total Phenolic And Antimicrobial Activity İn Erodium Laciniatum (Cov.) Willd Collected Fromthe Adana, I. International Congress On Medicin Aland Aromatic Plants “Natural And Healthy Life”, 2017.
- S. E. Korcan, Y. S. Karafakıoğlu, İ. Bulduk, M. Öztürk, H. Kölemek, A. Kahraman, Total Phenolic Content And Antimicrobial Activity Of Methanol Extract Of *Stachys Obliqua Waldst.&Kıt. And S. Thracia Davidov (Lamiaceae) İn Turkey*, I. International Congress On Medicin Aland Aromatic Plants “Natural And Healthy Life”, 2017.
- Bulduk, İ., Korcan E., Öztürk M.,Kölemek, H., Kargıoğlu M., Türkiye’de Yayılış Gösteren *Helleborus Orientalis* Metanolik Ekstraktlarının Toplam Fenolik, Flavonoid Ve Antioksidan Aktivitesinin Belirlenmesi, I. Uluslararası Bitki Biyolojisi Kongresi, Konya, 2018
- Korcan E., Öztürk M.,Kölemek H., Bulduk, İ., *Helleborus Orientalis* Bitkisinin Metanolik Ekstraktının Antimikrobiyal Aktivitesi, . Uluslararası Bitki Biyolojisi Kongresi, KONYA, 2018
- Öztürk M.,Kölemek H., Bulduk, İ., Korcan E., *Helleborus orientalis* Kök Ekstraktlarının Marul Tohumlarının (*Lactuca sativa*) Çimlenmesi Üzerine Herbisidal Etkisi, I. Uluslararası Bitki Biyolojisi Kongresi, KONYA, 2018
- Kölemek H., Bulduk, İ., Korcan E., Öztürk M.,Doğal Ortamından Toplanan *Helleborus Orientalis*’de Ağır Metal Tayini, I. Uluslararası Bitki Biyolojisi Kongresi, KONYA, 2018



- Öztürk M., Kölemek H., Bulduk, İ., Korcan E., Haşhaş Kapsülünün (*Papaver somniferum L.*), Metanolik Ekstraktının Antimikrobiyal Aktivitesi, I. Uluslararası Bitki Biyolojisi Kongresi, KONYA, 2018
- Kölemek H., Bulduk, İ., Korcan E., Öztürk M., Haşhaş Kapsülü Ekstraktlarından Noskapin Yüklü Hidroksiapatit Nanopartiküllerin Sentezi ve Karakterizasyonu, I. Uluslararası Bitki Biyolojisi Kongresi, KONYA, 2018
- Bulduk, İ., Korcan E., Öztürk M., Kölemek H., Haşhaş Kapsülü Ekstraktlarından Morfin Yüklü Hidroksiapatit Nanopartiküllerin Sentezi ve Karakterizasyonu, I. Uluslararası Bitki Biyolojisi Kongresi, KONYA, 2018
- Korcan E., Öztürk M., Kölemek H., Bulduk, İ., Haşhaş Kapsülünün (*Papaver somniferum L.*), Metanolik Ekstraktının Toplam Fenolik, Flavonoid ve Antioksidan Aktivitesinin Belirlenmesi, , I. Uluslararası Bitki Biyolojisi Kongresi, KONYA, 2018

### **Devam Eden Projeler**

Hidroksiapatit Nanomoleküllerine Tutturulmuş Tıbbi Bitki Ekstratlarından Elde Edilen Alkaloidlerin Karakterizasyon ve Biyoaktivite Çalışmaları (Bilimsel Araştırma Projesi Devam Ediyor)

Helleborus Ekstraktlarının Biyolojik Ve Kimyasal Özelliklerinin Belirlenmesi (Bilimsel Araştırma Projesi Devam Ediyor)

### **Diğer Etkinlikler**

I.Uluslar arası tıbbi ve aromatik bitkiler kongresi KONYA 2017.

I.Uluslar arası bitki biyolojisi kongresi KONYA, 2018