SARCOTRAGUS FOETİDUS SÜNGERİNİN SERT VE YUMUŞAK DOKU MÜHENDİSLİĞİ UYGULAMALARI İÇİN FABRİKASYONU VE *İN VİTRO* KARAKTERİZASYONU

FABRICATION AND *IN VITRO* CHARACTERIZATION OF *SARCOTRAGUS FOETIDUS* SPONGE FOR HARD AND SOFT TISSUE ENGINEERING APPLICATIONS

DEMET ÇAKIR

PROF. DR. MENEMŞE GÜMÜŞDERELİOĞLU

Tez Danışmanı

Hacettepe Üniversitesi

Lisansüstü Eğitim-Öğretim ve Sınav Yönetmeliğinin

Kimya Mühendisliği Anabilim Dalı için Öngördüğü

DOKTORA TEZİ olarak hazırlanmıştır.

2025

Her sabah yeniden başlamayı seçenlere...

ÖZET

SARCOTRAGUS FOETİDUS SÜNGERİNİN SERT VE YUMUŞAK DOKU MÜHENDİSLİĞİ UYGULAMALARI İÇİN FABRİKASYONU VE *İN VİTRO* KARAKTERİZASYONU

Demet ÇAKIR

Doktora, Kimya Mühendisliği Anabilim Dalı

Tez Danışmanı: Prof. Dr. Menemşe GÜMÜŞDERELİOĞLU

Temmuz 2025, 261 sayfa

Tez çalışması, Hacettepe Üniversitesi Bilimsel Araştırmalar Birimi tarafından FDK-2020-18871 ve FHD-2024-21229 numaralı projeler kapsamında desteklenmiştir.

Tez çalışmasında *Demonspongiae* sınıfına ait *Sarcotragus foetidus* deniz süngerinden elde edilen doğal sponjin yapılar kullanılarak, hem doku mühendisliği hem de glioblastoma multiforme (GBM) tedavisine yönelik biyomedikal uygulamalarda değerlendirilebilecek çok işlevli sistemler geliştirilmiştir.

Çalışmanın ilk aşamasında, *Sarcotragus foetidus* kaynaklı iskelelerin, içerdiği sponjin sayesinde osteojenik farklılaşmayı destekleyeceği ve bu etkinin, bor katkılı hidroksiapatit (B-HAp) kaplamasıyla farklılaşma yollarının uyarılması sonucu daha da artacağı hipotezi ortaya konmuştur. Bu hipotez kapsamında, öncelikle *Sarcotragus foetidus* deniz süngerinden üç boyutlu (3B) sponjin doku iskeleleri izole edilmiştir. Elde edilen iskeleler, osteoindüktif özelliklerini geliştirmek için hidroksiapatit ve bor katkılı hidroksiapatit ile kaplanmıştır. MC3T3-E1 preosteoblast hücreleri ile gerçekleştirilen *in vitro* çalışmalarda, sünger iskelelerin hücre canlılığını koruduğu ve osteojenik farklılaşmayı desteklediği gösterilmiştir. Özellikle B-HAp kaplı iskele grubunda, *Col1a1* ve *Ocn* gen ekspresyon

düzeylerinin yaklaşık 2,5 kat arttığı tespit edilmiştir. Histolojik incelemelerde mineralizasyonun arttığı doğrulanırken, antibakteriyel testlerde ise özellikle B-HAp kaplı iskelelerin hem Gram pozitif hem de negatif bakterilere karşı belirgin bakteriyostatik etki gösterdiği tespit edilmiştir.

Çalışmanın ikinci bölümünde, *Sarcotragus foetidus* deniz süngerinden yüksek verim ve saflıkta kolajen başarıyla izole edilmiştir. Elde edilen kolajenin izolasyon verimi ~%12, toplam protein içeriği ~350 mg/g kuru kütle ve hidroksiprolin oranı ~%9 olarak ölçülmüştür. Kolajenin yapısal ve kimyasal karakterizasyonu, çeşitli analiz yöntemleriyle detaylı olarak gerçekleştirilmiş, elde edilen kolajen, triple heliks yapısını koruyan, Tip I kolajen ile benzerlik gösteren yüksek kaliteli bir yapı olarak tanımlanmıştır. Bu kolajen, EDC/NHS aracılığıyla çapraz bağlanarak hidrojel formuna dönüştürülmüş ve yumuşak doku mühendisliğine uygun biyouyumlu bir yapı oluşturulmuştur.

Tez çalışmasının son bölümünde, GBM tedavisine yönelik olarak geliştirilen gallik asit (GA) yüklü PBAT (poli(butilen adipat-ko-tereftalat)) nanopartiküller, *Opuntia ficus indica* müsilajı (ONM) ile kaplanarak kontrollü salım sistemi oluşturulmuş ve bu sistem, *Sarcotragus foetidus* sünger iskelelere başarıyla entegre edilmiştir. Optimize edilen formülasyonlar sonucunda, 190 ± 69 nm boyutunda ve yaklaşık %87 enkapsülasyon verimine sahip nanopartiküller başarıyla elde edilmiştir. T98G glioblastoma hücreleriyle yapılan *in vitro* analizlerde, GA yüklü ve ONM kaplı nanopartiküllerinin belirgin düzeyde sitotoksik ve apoptotik etki gösterdiği; ayrıca kaspaz-3 gen ekspresyonunu artırırken, tümörle ilişkili c-Myc ve β-katenin gen ekspresyonlarını anlamlı şekilde baskıladığı belirlenmiştir.

Sonuç olarak, bu tez çalışması, *Sarcotragus foetidus* süngerinden elde edilen biyolojik yapıların çok işlevli biyomedikal uygulamalarda kullanılabileceğini göstermiş; bu doğal yapıların hem doku rejenerasyonunu destekleyen iskele sistemlerine hem de kontrollü ilaç salımı sağlayan etkili taşıyıcılara dönüştürülebileceğini ortaya koymuştur.

Anahtar Kelimeler: *Sarcotragus foetidus*, kemik doku mühendisliği, bor ve hidroksiapatit, yumuşak doku mühendisliği, glioblastoma, gallik asit, kontrollü salım.

ABSTRACT

FABRICATION AND *IN VITRO* CHARACTERIZATION OF *SARCOTRAGUS FOETIDUS* SPONGE FOR HARD AND SOFT TISSUE ENGINEERING APPLICATIONS

Demet ÇAKIR

Doctor of Philosophy, Chemical Engineering Division

Supervisor: Prof. Dr. Menemşe GÜMÜŞDERELİOĞLU

July 2025, 261 pages

This thesis study has been financially supported by Hacettepe University Research Fund (Project No: FDK-2020-18871 and Project No: FHD-2024-21229).

In this doctoral study, multifunctional systems were developed using natural spongin structures derived from the marine sponge *Sarcotragus foetidus*, a member of the class *Demospongiae*, for potential biomedical applications in both tissue engineering and glioblastoma multiforme (GBM) therapy.

In the first part of the study, it was hypothesized that scaffolds derived from *Sarcotragus foetidus*, due to their spongin content, would support osteogenic differentiation, and that this effect would be further enhanced by boron-doped hydroxyapatite (B-HAp) coating through the stimulation of additional differentiation pathways. Within this hypothesis, three-dimensional (3D) spongin-based scaffolds were initially isolated from the marine sponge *Sarcotragus foetidus*. The scaffolds were then coated with hydroxyapatite and boron-doped hydroxyapatite to improve their osteoinductive properties. *In vitro* studies using MC3T3-E1 preosteoblast cells demonstrated that the scaffolds maintained cell viability and promoted osteogenic differentiation. Particularly in the B-HAp coated

group, expression levels of *Col1a1* and *Ocn* genes increased approximately 2.5-fold. Histological examinations confirmed enhanced mineralization, while antibacterial tests showed that especially B-HAp coated scaffolds exhibited pronounced bacteriostatic activity against both Gram-positive and Gram-negative bacteria.

In the second part of the study, collagen was successfully isolated from Sarcotragus foetidus with high yield and purity. The isolated collagen showed a protein yield of approximately 12%, a total protein content of ~350 mg/g dry weight, and a hydroxyproline content of ~9%. Structural and chemical characterization, conducted through various analytical methods, revealed that the collagen retained its triple helical structure and showed high similarity to Type I collagen, indicating a high-quality material. This collagen was crosslinked via EDC/NHS to form a hydrogel and provided a biocompatible matrix suitable for soft tissue engineering applications.

In the final part of the study, PBAT (poly(butylene adipate-co-terephthalate)) nanoparticles loaded with gallic acid (GA) were developed for GBM therapy and coated with *Opuntia ficus indica* mucilage (ONM) to enable controlled drug release. The optimized formulations yielded nanoparticles with an average size of 190 ± 69 nm and approximately 87% encapsulation efficiency. These nanoparticles were successfully integrated into *Sarcotragus foetidus* sponge-based scaffolds. *In vitro* analyses using T98G glioblastoma cells revealed that GA-loaded and ONM-coated nanoparticles exhibited significant cytotoxic and apoptotic effects, increasing caspase-3 gene expression while significantly suppressing tumor-associated genes c-Myc and β-catenin.

In conclusion, this study demonstrated that the biological structures derived from Sarcotragus foetidus can be effectively utilized in multifunctional biomedical applications. These natural materials were successfully transformed into both scaffold systems supporting tissue regeneration and efficient carriers providing controlled drug release.

Keywords: *Sarcotragus foetidus*, bone tissue engineering, boron and hydroxyapatite, soft tissue engineering, glioblastoma, gallic acid, controlled drug release.

TEŞEKKÜR

Öğrencilik hayatım boyunca bilgi, deneyim ve desteğini her daim yanımda hissettiğim, karşılaştığım her zorlukta yapıcı ve yol gösterici yaklaşımıyla bana rehberlik eden, bilimsel düşünceye olan bağlılığı, vizyoner bakış açısı ve ilham veren akademik duruşuyla her zaman örnek aldığım değerli danışmanım Prof. Dr. Menemşe Gümüşderelioğlu'na, bana kattığı her şey için gönülden teşekkür ederim.

Doktora tez çalışmalarımın yürütülmesinde FDK-2020-18871 ve FHD-2024-21229 numaralı projeler ile maddi destek sağlayan Hacettepe Üniversitesi Bilimsel Araştırmalar Birimi'ne teşekkür ederim.

Tez İzleme Komitemde yer alan, fikirleriyle çalışmamın yönünü şekillendiren Prof. Dr. Deniz Tanyolaç ve Prof. Dr. Z. Serpil Takaç hocalarıma; tez savunma sürecinde bilgi ve katkılarını esirgemeyen Prof. Dr. Mehlika Pulat, Prof. Dr. Mert Çalış ve Doç. Dr. Murat Şimşek hocalarıma sonsuz teşekkür ederim.

Her zorluğu birlikte aştığımız, yanımda olduklarını bilmenin içimi rahatlattığı can arkadaşlarım Tülay, Sena, Onat, Elvan, Tuğçe, Gökçe, Esra, Sitem ve Selcan abla . . . İyi ki varsınız.

Yoluma ışık tutan, desteğini her daim hissettiğim kıymetli hocalarım Dr. Damla Çetin Altındal'a, Dr. Anıl Sera Çakmak'a, Dr. Ülkü Çayır'a ve Dr. Işıl Gerçek Beşkardeş'e gönülden teşekkür ederim.

Hayatım boyunca her daim yanımda olan, koşulsuz sevgileri, sabırları ve desteğiyle beni ayakta tutan canım anneme ve sevgili ablama en derin şükranlarımı sunuyorum. Yorulduğumda dinlenebileceğim bir omuz, umutsuzluk anlarımda ilham kaynağım oldunuz. . . .

İçtenliğiyle, sevgisiyle ve sabrıyla bu süreci benim için daha anlamlı ve katlanabilir kılan, en zor anlarımda bile yanımda olmayı başaran sevgilim ve can dostum Levent'e kalpten teşekkür ederim. Sessizce dinlediğin, anlayışla yaklaştığın, yeri geldiğinde tek bir cümleyle tüm yükümü hafiflettiğin her an için minnettarım. . .

Evimin huzuru ve neşesi olan patili dostlarım Minik Farem ve Ponçik Şerom siz olmasaydınız bu süreç çok daha sessiz olurdu. . .

Ve son olarak. . . Hayatım boyunca varlığıyla bana güç veren, kalbimde yaşattığım babama. . .

İÇİNDEKİLER

ÖZET ..... **i**

ABSTRACT ..... **iii**

TEŞEKKÜR ..... **v**

İÇİNDEKİLER ..... **vi**

ŞEKİLLER DİZİNİ ..... **xiv**

ÇİZELGELER DİZİNİ ..... **xxii**

SİMGELER VE KISALTMALAR ..... **xxiv**

1. GİRİŞ **1**

2. GENEL BİLGİLER **6**

2.1. Doku Mühendisliği 6

2.2. Kemik Doku Mühendisliği 7

2.2.1. Kemik Dokusu ve Hücresel Dinamikleri 8

2.2.2. Doku İskeleleri 10

2.2.2.1. Doku İskelesi Biyomalzemeleri 12

2.3. Süngerler (Porifera) 14

2.3.1. Süngerlerin Sınıflandırılması 14

2.3.2. Süngerlerin İskelet Yapıları 15

2.3.2.1. Sponjin 16

2.4. Süngerlerin Doku Mühendisliğinde Kullanımı 19

2.5. *Sarcotragus foetidus* Deniz Süngeri 23

2.6. Yumuşak Doku Mühendisliği 27

2.7. Yumuşak Doku Kanserleri 29

2.7.1. Beyin Kanseri - Glioblastoma Multiforme 30

2.7.2. GBM Tedavisinde Kullanılan İlaçlar 32

2.7.2.1. Gallik Asit 34

2.7.2.2. GA Taşıyıcı Sistemler 37

2.7.2.2.1. Polimerik Nanopartiküller 40

2.7.2.2. *Opuntia ficus indica* (Nopal) 43

2.7.3. GBM Tedavisinde Kullanılan Lokal Taşıyıcı Sistemler 44

3. DENEYSEL ÇALIŞMALAR 47

3.1. Deneysel Çalışmalarda Kullanılan Malzemeler 47

3.2. Mali Destekler 50

KISIM I… 50

3.3. *Sarcotragus foetidus* Süngerlerinin İskelet Yapılarının İzole Edilmesi ile 3B Sponjin Doku İskelelerinin Eldesi 52

3.4. Sponjin Doku İskelelerinin Karakterizasyonu ve Hücre Canlılığına Etkisinin Belirlenmesi 54

3.5. HAp ve B-HAp Kaplı Sponjin Bazlı Biyohibrit Doku İskelelerinin Hazırlanması……...……55

3.6. Sponjin Bazlı Biyohibrit Doku İskelelerinin Karakterizasyonu 56

3.6.1. ATR-FTIR Analizi 56

3.6.2. SEM Analizi 57

3.6.3. Termogravimetrik Analiz (TGA) 57

3.6.4. Diferansiyel Taramalı Kalorimetre (DSC) Analizi 57

3.6.5. Elementel Analiz 57

3.6.6. Şişme Analizi 57

3.6.7. Mekanik Analizler 58

3.6.8. *In Vitro* Biyobozunurluk Çalışması 58

3.6.9. Mikro-Bilgisayarlı Tomografi (Mikro-CT) Analizi 58

3.7. *İn Vitro* Hücre Kültür Çalışmaları 59

3.7.1. MC3T3-E1 Hücreleri ile Yürütülen Hücre Kültür Çalışmaları 59

3.7.2. Osteojenik Farklılaşma Çalışmaları 59

3.7.3. MTT Analizi 60
3.7.4. SEM Analizi 60
3.7.5. ALP Aktivitesinin Tayini 61
3.7.6. Hidroksiprolin Analizi 61
3.7.7. Gerçek Zamanlı Polimeraz Zincir Reaksiyonu ile Gen İfadesi Analizi 63
3.7.8. Histolojik Boyamalar 64
3.8. *İn Vitro* Bakteri Kültürü Çalışmaları 67
KISIM II… 68
3.9. *Sarcotragus foetidus* Sünger Kolajenin İzole Edilmesi 69
3.10. Sünger Kolajeninin Karakterizasyonu 71
3.10.1. Optik Mikroskop ile Analiz 71
3.10.2. SEM Analizi 72
3.10.3. Kimyasal Özelliklerin Belirlenmesi 72
3.10.4. Kristalografik Özelliklerin Belirlenmesi 72
3.10.5. Termal Özelliklerin Belirlenmesi 72
3.10.6. Toplam Protein Miktarının Belirlenmesi 72
3.10.7. Hidroksiprolin Analizi 73
3.10.8. Sodyum Dodesil Sülfat Poliakrilamid Jel Elektroforezi (SDS-PAGE) 75
3.10.9. Sıvı Kromatografi-Kütle Spektrometrisi (LC-MS) Analizi 75
3.11. Kolajen Hidrojellerin Üretimi 76
3.12. Kolajen Hidrojellerin Karakterizasyonu 76
KISIM III.. 77
3.13. *Opuntia ficus indica* (Nopal) Müsilajının (ONM) İzolasyonu 78
3.14. Boş PBAT Nanopartiküllerin Üretimi 79
3.15. GA Yüklü PBAT Nanopartiküllerin Üretimi 80

3.16. Tepki Yüzey Metodolojisi (RSM) ile GA-PBAT Nanopartikül Üretim Prosesinin Optimizasyonu 82
3.17. GA-PBAT Nanopartiküllerin ONM ile Kaplanması 83
3.18. Karakterizasyon Çalışmaları 83
3.18.1. Kimyasal Yapı Analizi 83
3.18.2. Morfolojik İncelemeler 83
3.18.3. Termal Özelliklerin Belirlenmesi (Termogravimetrik ve Diferansiyel Termal Analiz)…. 84
3.18.4. Nanopartiküllerin Stabilite ve Morfolojik Değerlendirmesi 84
3.18.5. GA'nın Enkapsülasyon Veriminin Belirlenmesi 85
3.18.6. ONM Kaplama Veriminin Belirlenmesi 86
3.18.7. *İn Vitro* GA Salım Çalışmaları ve Salım Kinetiğinin Belirlenmesi 87
3.19. Hücre Kültür Çalışmaları 87
3.19.1. GA'nın Farklı Konsantrasyonlarının HUVEC ve T98G Hücreleri Üzerindeki Etkisinin İncelenmesi 88
3.19.1.1. MTT Analizi 88
3.19.1.2. Morfolojik Analiz 89
3.19.2. PBAT Nanopartikülleri ile Yürütülen Hücre İçerisine Alım Çalışmaları 89
3.19.2.1. FITC Yüklü PBAT Nanopartiküllerin Üretimi 90
3.19.3. PBAT Nanopartiküllerin T98G Hücreleri Üzerindeki Etkisinin İncelenmesi 90
3.19.3.1. MTT Analizi 90
3.19.3.2. Optik Mikroskop ile Analiz 91
3.19.3.3. Alexa Fluor® 488 Phalloidin/DAPI 91
3.19.3.4. Canlı/Ölü Hücre Boyama 91
3.19.3.5. Apoptoz Tespiti: Anneksin V-FITC/PI Yöntemi 92
3.19.3.6. ROS Analizi 92
3.19.3.7. Gerçek Zamanlı Polimeraz Zincir Reaksiyonu ile Gen İfadesi Analizi….. 93

3.20. PBAT Nanopartikül Yüklü *Sarcotragus foetidus* Sponjin Doku İskelelerinin Üretimi, Karakterizasyonu ve *İn Vitro* Hücre Kültür Çalışmaları.....94
3.20.1. Sponjin Doku İskelelerine PBAT Nanopartiküllerin Yüklenmesi 94
3.20.2. SEM Analizi 94
3.20.3. *İn Vitro* GA Salım Çalışmaları ve Salım Kinetiğinin İncelenmesi 94
3.20.4. T98G Hücreleri ile Yürütülen Hücre Kültür Çalışmaları.....95
3.20.4.1. MTT Analizi.....96
3.20.4.2. Konfokal Lazer Taramalı Mikroskop (CLSM) ile Analiz.....96
3.21. İstatistiksel Analiz 96
4. SONUÇLAR VE TARTIŞMA 98
KISIM I… 98
4.1. *Sarcotragus foetidus* Süngerlerinin İskelet Yapılarının İzole Edilmesi ile 3B Sponjin Doku İskelelerinin Eldesi.....100
4.1.1. Sponjin Doku İskelelerinin Karakterizasyonu ve Hücre Canlılığına Etkisinin Belirlenmesi.....101
4.1.1.1. Kimyasal Yapı Analizi 102
4.1.1.2. Morfolojik İncelemeler.....103
4.1.1.3. Şişme Analizi.....104
4.1.1.4. *İn Vitro* Hücre Kültür Çalışmaları.....106
4.2. HAp ve B-HAp Kaplı Sponjin Bazlı Biyohibrit Doku İskelelerinin Hazırlanması….....107
4.3. Sponjin Bazlı Biyohibrit Doku İskelelerinin Karakterizasyonu.....108
4.3.1. ATR-FTIR Analizi 109
4.3.2. SEM Analizi 110
4.3.3. Termogravimetrik Analiz (TGA) 111
4.3.4. Diferansiyel Taramalı Kalorimetre (DSC) Analizi 112
4.3.5. Elementel Analiz 114

4.3.6. Şişme Analizi 116
4.3.7. Mekanik Analizler 118
4.3.8. *İn Vitro* Biyobozunurluk 120
4.3.9. Mikro-Bilgisayarlı Tomografi (Mikro-CT) Analizi 121
4.4. *İn Vitro* Hücre Kültür Çalışmaları 123
4.4.1. MC3T3-E1 Hücreleri ile Yürütülen Osteojenik Farklılaşma Çalışmaları 123
4.4.1.1. MTT Analizi 124
4.4.1.2. SEM Analizi 125
4.4.1.3. ALP Aktivitesinin Tayini 128
4.4.1.4. Hidroksiprolin Analizi 129
4.4.1.5. Gerçek Zamanlı Polimeraz Zincir Reaksiyonu ile Gen İfadesi Analizi 130
4.4.1.6. Histolojik Boyamalar 132
4.5. *İn Vitro* Bakteri Kültürü Çalışmaları 137
KISIM II 139
4.6. *Sarcotragus foetidus* Sünger Kolajenin İzole Edilmesi 139
4.6.1. Sünger Kolajeninin Karakterizasyonu 139
4.6.1.1. Optik Mikroskop Görüntüleri ve SEM Analizi 141
4.6.1.2. Kimyasal Özelliklerin Belirlenmesi 142
4.6.1.3. Kristalografik Özelliklerin Belirlenmesi 143
4.6.1.4. Termal Özelliklerin Belirlenmesi 144
4.6.1.5. Toplam Protein Miktarının Belirlenmesi 146
4.6.1.6. Hidroksiprolin Analizi 147
4.6.1.7. Sodyum Dodesil Sülfat Poliakrilamid Jel Elektroforezi (SDS-PAGE) 148
4.6.1.8. Sıvı Kromatografi-Kütle Spektrometrisi (LC-MS) Analizi 150
4.7. Kolajen Hidrojellerin Üretimi ve Karakterizasyon Çalışmaları 152
4.7.1. Hidrojellerin Üretimi 152

4.7.2. Hidrojellerin Karakterizasyonu 155

KISIM III. 158

4.8. Boş PBAT Nanopartiküllerin Üretimi 160

4.9. GA Yüklü PBAT Nanopartiküllerin Üretimi ve Optimizasyonu 163

4.10. ONM Kaplama ve Stabilite Çalışmaları 171

4.11. Nanopartiküllerin Karakterizasyonu 174

4.11.1. Yüzey Yükünün Belirlenmesi 174

4.11.2. Kimyasal Yapı Analizi 176

4.11.3. Termal Özelliklerin Belirlenmesi 177

4.11.4. Nanopartiküllerin Stabilite ve Morfolojik Değerlendirmesi 180

4.12. *İn Vitro* GA Salım Çalışmaları ve Salım Kinetiğinin Belirlenmesi 182

4.13. Hücre kültür çalışmaları 186

4.13.1. GA'nın Farklı Konsantrasyonlarının HUVEC ve T98G Hücreleri Üzerindeki Etkisinin İncelenmesi 186

4.13.1.1. MTT Analizi 186

4.13.1.2. Morfolojik Analiz 188

4.13.2. PBAT Nanopartikülleri ile Yürütülen Hücre İçerisine Alım Çalışmaları 190

4.13.3. PBAT Nanopartiküllerin T98G Hücreleri Üzerindeki Etkisinin İncelenmesi……..... 191

4.13.3.1. Hücre Canlılığı ve Hücresel Morfoloji 192

4.13.3.2. Apoptoz Tespiti: Anneksin V-FITC/PI Yöntemi 196

4.13.3.3. ROS Analizi 199

4.13.3.4. Gerçek Zamanlı Polimeraz Zincir Reaksiyonu ile Gen İfadesi Analizi…. 200

4.14. PBAT Nanopartikül Yüklü *Sarcotragus foetidus* Sponjin Doku İskelelerinin Üretimi, Karakterizasyonu ve *İn Vitro* Hücre Kültür Çalışmaları 202

4.14.1. Sponjin Doku İskelelerine PBAT Nanopartiküllerin Yüklenmesi 202

4.14.2. Nanopartikül Yüklü Doku İskelelerinin Karakterizasyonu 203

4.14.2.1. SEM Analizi 203
4.14.2.2. *İn Vitro* GA Salım Çalışmaları ve Salım Kinetiğinin İncelenmesi 204
4.14.3. T98G Hücreleri ile Yürütülen Hücre Kültür Çalışmaları 207
4.14.3.1. MTT Analizi 207
4.14.3.2. Konfokal Lazer Taramalı Mikroskop (CLSM) ile Analiz 209
5. YORUM 211
6. KAYNAKLAR 218
EKLER 252
EK 1 - Tez Çalışmasında Kullanılan Hücrelerin Karakterizasyonu 252
EK 2 – Tezden Türetilmiş Yayınlar 252
EK 3 – Tezden Üretilmiş Projeler 256
EK 4 - Tez Çalışması Orjinallik Raporu 257
ÖZGEÇMİŞ 258

ŞEKİLLER DİZİNİ

Şekil 2.1. Kemik yapısı ile kemik hücreleri ([63]'den değiştirilerek). 10

Şekil 2.2. a) Deniz süngerlerinin ve b) kemiğin yapısı ([87]'den değiştirilerek). 19

Şekil 2.3. *Sarcotragus foetidus* süngerinin farklı açılardaki makroskobik kamera görüntüsü a) ön yüzey, b) arka yüzey. 24

Şekil 2.4. Standart Tedavi -SOC- olarak kabul edilen Stupp protokolüne göre tedavi yöntemi ([137]'den değiştirilerek). 31

Şekil 3.1. *Sarcotragus foetidus* süngerlerinin iskelet yapılarının izole edilmesi ile 3B sponjin doku iskelelerinin eldesinin şematik gösterimi (BioRender.com ile oluşturulmuştur; https://BioRender.com). 53

Şekil 3.2. Üç boyutlu sponjin doku iskelelerinin HAp ve B-HAp kaplanmasına ve biyohibrit doku iskelelerinin üretimine ait şematik gösterim (BioRender.com ile oluşturulmuştur; https://BioRender.com). 56

Şekil 3.3. Hücre kültürü çalışmalarının akış şeması. 60

Şekil 3.4. Hidroksiprolin kalibrasyon grafiği (560 nm) 62

Şekil 3.5. Kolajen izolasyonu için literatürde kullanılan protokoller (yıldız işareti geliştirilen modifiye yöntemde temel alınan formülasyonları ifade etmektedir) (BioRender.com ile oluşturulmuştur; https://BioRender.com). 69

Şekil 3.6. Tez çalışması kapsamında kullanılan kolajen izolasyon protokolleri (BioRender.com ile oluşturulmuştur; https://BioRender.com) 71

Şekil 3.7 BSA kalibrasyon grafiği (595 nm) 73

Şekil 3.8. Hidroksiprolin kalibrasyon grafiği (560 nm'de ölçüm yapılarak kit protokolüne göre hazırlanmıştır). 74

Şekil 3.9. ONM izolasyonuna ait şematik gösterim (BioRender.com ile oluşturulmuştur; https://BioRender.com). 79

Şekil 3.10. GA-PBAT nanopartiküllerin modifiye ikili emülsiyon hazırlama-çözücü buharlaştırma yöntemi ile üretiminin şematik gösterimi (BioRender.com ile oluşturulmuştur; https://BioRender.com). 81

Şekil 3.11. GA kalibrasyon grafiği (247 nm) 85

Şekil 3.12. ONM kalibrasyon grafiği (310 nm). 86

Şekil 4.1. Tez çalışmasının ilk kısmına ait akış şeması (BioRender.com ile oluşturulmuştur; https://BioRender.com). 100

Şekil 4.2. *Sarcotragus foetidus* süngerinden izole edilen doku iskelelerine ait ATR-FTIR spektrumları: (a) Sf-, (b) Sf/0.25, (c) Sf/0.50, (d) Sf/0.75, (e) Sf/1.0. 102

Şekil 4.3. *Sarcotragus foetidus süngerinden* izole edilen doku iskelelerine ait farklı büyütmelerdeki SEM görüntüleri: (a) Sf-, (b) Sf/0.25, (c) Sf/0.50, (d) Sf/0.75, (e) Sf/1.0, (f) süngerin makroskobik kamera görüntüsü (Kırmızı oklar sponjin liflerin kırılma bölgelerini göstermektedir). 103

Şekil 4.4. Doku iskelelerinin su alım kapasitesinin zamanla değişimi a) dk b) gün ile. 105

Şekil 4.5. Hücre kültür çalışmasının 1, 3 ve 7. günlerinde doku iskeleleri üzerinde çoğaltılan MC3T3-E1 hücrelerinin mitokondriyal aktiviteleri. (İstatistiksel anlamlı farklılıklar n = 3, *$p<0,05$, **$p<0,01$, ***$p<0,001$ gün bazında Sf- iskele grubundaki hücreler kontrol grubu iken; •$p<0,05$, ••$p<0,01$, •••$p<0,001$ gün bazında Sf/0.25 iskele grubundaki hücreler kontrol grubu iken). 106

Şekil 4.6. Sf, Sf/HAp ve Sf/B-HAp sponjin doku iskelelerine ait ATR-FTIR spektrumları. 109

Şekil 4.7. Sf, Sf/HAp ve Sf/B-HAp sponjin doku iskelelerine ait farklı büyütmelerdeki SEM görüntüleri. Beyaz barlar 10 μm'yi temsil etmekte olup, HAp ve B-HAp kristal yapılarının bulunduğu alanlar kırmızı oklarla belirtilmiştir. Görselde sol üst köşede iskelelere ait kamera görüntüleri yer almaktadır. 110

Şekil 4.8. Sf, Sf/HAp ve Sf/B-HAp doku iskelelerine ait TGA termogramları. 111

Şekil 4.9. DSC termogramları; a) Sf, b) Sf/HAp ve c) Sf/B-HAp doku iskeleleri. 113

Şekil 4.10. Doku iskelelerinin EDX haritalama yöntemiyle belirlenen (a) EDX spektrumları (b) elementel içerikleri. 115

Şekil 4.11. Doku iskelelerinin su alım kapasitesinin zamanla değişimi. 117

Şekil 4.12. Doku iskelelerine ait mekanik analiz sonuçları. 118

Şekil 4.13. Doku iskelelerinin lizozim içeren PBS ortamındaki bozunma profilleri....120

Şekil 4.14. Mikro-CT tarama ile görüntülenen doku iskelelerinin üç boyutlu morfolojik yapıları.....121

Şekil 4.15. Sf, Sf/HAp ve Sf/B-HAp doku iskelelerinin gözenek çaplarının dağılımı. 122

Şekil 4.16. Doku iskeleleri üzerinde çoğalan MC3T3-E1 hücrelerinin mitokondriyal aktiviteleri.....124

Şekil 4.17. Sf grubu iskelelerde kültüre edilen hücrelerin SEM görüntüleri: a, d, g) 500X; b, e, h) 2 500X; c, f, ı) 5 000X. 125

Şekil 4.18. Sf/HAp grubu iskelelerde kültüre edilen hücrelerin SEM görüntüleri: a, d, g) 500X; b, e, h) 2 500X; c, f, ı) 5 000X. 126

Şekil 4.19. Sf/B-HAp grubu iskelelerde kültüre edilen hücrelerin SEM görüntüleri: a, d, g) 500X; b, e, h) 2 500X; c, f, ı) 5 000X. 126

Şekil 4.20. Yirmi bir günlük hücre kültürü sonunda doku iskeleleri üzerinde çoğalan hücrelerin dikey kesit SEM görüntüleri: a, d, g) 500X; b, e, h) 2 500X; c, f, ı) 5 000X. 127

Şekil 4.21. Doku iskelelerinde çoğaltılan hücrelerin ALP aktiviteleri. Enzim aktivitesi, hücre canlılığına göre normalize edilerek ALP/MTT oranı şeklinde ifade edilmiştir. Bu normalizasyon, hücre proliferasyonundaki değişimlerden bağımsız olarak osteojenik farklılaşmanın değerlendirilmesini sağlamaktadır. (İstatistiksel anlamlı farklılıklar n = 3, *$p<0,05$, **$p<0,01$, ***$p<0,001$ grup bazında 7. gün kontrol grubu iken; •$p<0,05$, ••$p<0,01$, •••$p<0,001$ grup bazında 7. gündeki Sf grubu kontrol grubu iken).....128

Şekil 4.22 Doku iskeleleri üzerinde üreyen MC3T3-E1 hücreleri tarafından sentezlenen Hyp miktarı. (İstatistiksel anlamlı farklılıklar n = 3, *$p<0,05$, **$p<0,01$, ***$p<0,001$ grup bazında 7. gün kontrol grubu iken; •$p<0,05$, ••$p<0,01$, •••$p<0,001$ grup bazında 7. gündeki Sf grubu kontrol grubu iken). 129

Şekil 4.23. Doku iskelelerinde çoğalan MC3T3-E1 hücrelerine ait bağıl *Col1a1* ve *Ocn* gen ifadeleri. (İstatistiksel anlamlı farklılıklar n = 3, yıldız vs. Sf: $p<0,05$).....131

Şekil 4.24. Doku iskeleleri üzerinde kültüre edilen MC3T3-E1 hücrelerin kültürün 7. ve 21. günlerindeki Hematoksilen&Eozin boyama görüntüleri.....133

Şekil 4.25. Doku iskeleleri üzerinde kültüre edilen hücrelerin kültürün 21. günündeki ALP boyama görüntüleri. Yıldızlar mineralize bölgeleri göstermektedir. 134

Şekil 4.26. Doku iskeleleri üzerinde kültüre edilen hücrelerin kültürün 21. günündeki Alizarin Red boyama görüntüleri. 135

Şekil 4.27. Doku iskeleleri üzerinde kültüre edilen hücrelerin kültürün 21. günündeki Von Kossa boyama görüntüleri. 136

Şekil 4.28. Sf, Sf/HAp ve Sf/B-HAp doku iskelelerine ait antibakteriyel aktivite sonuçları: a) disk difüzyon yöntemi ile belirlenen inhibisyon zonlarının kamera görüntüleri, b) OD-zaman grafikleri i) *E. coli ATCC 25922* ve ii) *S. aureus ATCC 25923*. 137

Şekil 4.29. Farklı formülasyonlarla elde edilen kolajen örnekleri ve ticari sığır kolajeninin makroskobik görüntüleri (Sağ alt köşe: Eppendorf örnekleri). 140

Şekil 4.30. (a) F1 ve (b) F2 formülasyonları kullanılarak izole edilen kolajen örneklerine ait optik mikroskop görüntüleri. Kırmızı oklar kolajen fibrillerini göstermektedir. 141

Şekil 4.31. F1 ve F2 formülasyonları kullanılarak izole edilen kolajen örneklerine ait farklı büyütmelerdeki SEM görüntüleri…….141

Şekil 4.32. Farklı izolasyon formülasyonları kullanılarak elde edilen kolajen örneklerine ait ATR-FTIR spektrumları. (Formülasyon adının sonundaki '1' birinci paraleli, '2' ise ikinci paraleli temsil etmektedir). 142

Şekil 4.33. F1 ve F2 formülasyonları kullanılarak izole edilen kolajen örnekleri ile ticari sığır kolajenine ait XRD difraktogramları. 144

Şekil 4.34. F1 ve F2 formülasyonları kullanılarak izole edilen kolajen örnekleri ile ticari sığır kolajenine ait TGA termogramları..... 145

Şekil 4.35. F1 ve F2 formülasyonları kullanılarak izole edilen kolajen örnekleri ile ticari sığır kolajenine ait DSC termogramları. 146

Şekil 4.36. Sünger kolajenine (SK) ait SDS-PAGE jel elektroforez görüntüsü (MW: standart protein ağırlığı, kDa)..... 149

Şekil 4.37. Sünger kolajenine (SK) ait LC-MS kromatogramı; LC Koşullar: Kolon: C18 ters faz kolonu (Reverse-Phase, RP-C18); Mobil Faz: A fazı: Su + %0,1 formik asit B fazı: Asetonitril (ACN) + %0,1 formik asit. Akış Hızı: 0,5 mL/dk. 151

Şekil 4.38. Kolajenin EDC/NHS ile çapraz bağlanması sırasında gerçekleşen reaksiyonun mekanizması. 152

Şekil 4.39. a) 35 mm çapındaki 4 bölmeli hücre kültürü Petri kabının her bir bölmesine 100 µL hidrojel çözeltisi uygulanarak EDC/NHS ile çapraz bağlanan hidrojellere ait mikroskobik kamera görüntüleri, b) fomülasyonların içerikleri. 154

Şekil 4.40. a) H4 formülasyonu ile üretilmiş ve EDC/NHS ile çapraz bağlanmış hidrojellerin 7 gün süresince hidrolitik ortamdaki bozunma profilini gösteren grafik (n=3), b) hidrojelin 1., 3., 5. ve 7. gün makroskobik kamera görüntüleri. 156

Şekil 4.41. H4 formülasyonu ile üretilmiş ve EDC/NHS ile çapraz bağlanmış hidrojellerin su alım kapasitesi (% şişme değerleri). 157

Şekil 4.42. Tez çalışmasının üçüncü kısmına ait akış şeması (BioRender.com ile oluşturulmuştur; https://BioRender.com). 160

Şekil 4.43. Farklı formülasyonlara (F1-F7) ait boş PBAT nanopartiküllerin SEM görüntüleri 162

Şekil 4.44. RSM'de kullanılan parametreler ve modelin grafikleri, (a ve d) pertürbasyon çizimleri, (b ve e) kontur çizimleri ve (c ve f) partikül çapı ve enkapsülasyon verimi üzerindeki önemli parametrelerin 3B yüzey çizimleri. 167

Şekil 4.45. Tahmin edilen ve gerçek değerler için tanısal grafikler, (a) partikül çapı (nm) ve (b) enkapsülasyon verimi (%). 168

Şekil 4.46. (a) Emülsiyon hazırlama-çözücü buharlaştırma ile hazırlanan boş PBAT ve (b, c) GA-PBAT nanopartiküllerin farklı büyütmelerdeki SEM görüntüleri. 171

Şekil 4.47. (a) *Opuntia ficus indica'dan* izole edilen musilaj (ONM) ve (b, c) GA-ONM-PBAT nanopartiküllerinin farklı büyütmelerdeki SEM görüntüleri, (d) Sudan I ile boyanmış ONM'nin (e) FITC yüklü PBAT nanopartiküllerin ve (f) Sudan I ile boyanan ONM ile kaplanmış FITC yüklü PBAT nanopartiküllerin optik mikroskop görüntüleri. 173

Şekil 4.48 Çalışma kapsamında üretilen nanopartikülere ile PBAT, DMAB, GA ve ONM'ye ait ATR-FTIR spektrumları. 177

Şekil 4.49. Çalışma kapsamında üretilen nanopartikülerin (a) TGA termogramları; (b) PBAT reçinesinin, (c) boş PBAT, (d) GA-PBAT ve (e) GA-ONM-PBAT nanopartiküllerinin DTA termogramları. Siyah oklar T_m değerlerini göstermektedir.. 179

Şekil 4.50. Yedi gün boyunca saf suda inkübe edilen c) boş PBAT, d) GA-PBAT ve e) GA-ONM-PBAT nanopartiküllerine ait SEM görüntüleri; asetat tamponunda (pH 5,5) inkübe edilen f) boş PBAT, g) GA-PBAT ve h) GA-ONM-PBAT nanopartiküllerine ait SEM görüntüleri. 181

Şekil 4.51. Fizyolojik ve asidik ortamlarda kümülatif GA salım grafiği (n=3). 183

Şekil 4.52. (a) T98G hücreleri ve (b) HUVEC'ler için farklı miktarlardaki GA'nın canlılık üzerindeki etkisini gösteren 5 günlük MTT sonuçları. (İstatistiksel olarak anlamlı farklılıklar n =3 *$p<0,05$*, **$p<0,01$*, ***$p<0,001$*, 0 µM kontrol grubu iken). Ekim yoğunluğu: $4x10^4$ hücre/mL. 188

Şekil 4.53. Farklı miktarlardaki GA'nın T98G hücreleri ve HUVEC'lerin canlılığı üzerindeki etkisini gösteren kristal viyole boyama görüntüleri (ölçek çubukları her bir şekil için 100 µm'yi temsil etmektedir). 189

Şekil 4.54. T98G hücreleri ve HUVEC'lerin birleştirilmiş mikroskop görüntüleri: (a) ışık ve floresan, (b) DAPI ile boyanmış; yeşil alanlar FITC işaretli nanopartikülleri temsil etmektedir. Ekim yoğunluğu: $4x10^4$ hücre/mL..... 190

Şekil 4.55. a) Nanopartiküllerin ve serbest GA'nın T98G hücrelerinin canlılığı üzerindeki etkisini gösteren MTT sonuçları (İstatistiksel olarak anlamlı farklar n=3 *$p<0,05$*, **$p<0,01$*, ***$p<0,001$*; kontrol: TCPS), b) kültürün üçüncü gününde nanopartiküllerin ve serbest GA'nın T98G hücrelerinin canlılığı üzerindeki etkisini gösteren optik mikroskop görüntüleri; Kırmızı oklar yüzeyden kalkmakta olan hücreleri göstermektedir. 193

Şekil 4.56. Nanopartiküllerin ve serbest GA'nın T98G hücrelerinin morfolojisi üzerindeki etkisini gösteren Alexa Fluor® 488 Phalloidin/DAPI boyama görüntüleri. Kırmızı oklar parçalanan hücre zarlarını ve çekirdeklerini göstermektedir. 194

Şekil 4.57. Nanopartiküllerin ve serbest GA'nın T98G hücrelerinin canlılığı üzerindeki etkisini gösteren a) canlı/ölü boyama görüntüleri b) % canlılık grafiği. (İstatistiksel olarak anlamlı farklar n =3 *$p<0,05$*, **$p<0,01$*, ***$p<0,001$*; kontrol: TCPS)..... 195

Şekil 4.58. Kültürün 3. gününde T98G hücrelerine ait a) Annexin V-FITC/PI çift boyama görüntüleri, b) Annexin V-FITC/PI apoptoz tespit kiti ile akım sitometrisi kullanılarak yapılan apoptoz değerlendirmesi (apoptoz sürecinin tüm aşamalarındaki hücrelerin grafiksel temsili).....197

Şekil 4.59. Kültürün 3. gününde T98G hücrelerinin erken apoptoz, geç apoptoz, nekroz ve canlılık durumlarını kuadrantlara ayırarak Annexin V-FITC ve PI arasındaki dağılımı gösteren nokta grafiği.....198

Şekil 4.60. Kültürün 3. gününde T98G hücrelerine ait bağıl ROS değişimi. (İstatistiksel olarak anlamlı farklar n =3 *$p<0,05$, **$p<0,01$, ***$p<0,001$; kontrol: TCPS) 200

Şekil 4.61. Kültürün 3. gününde T98G hücrelerine ait bağıl Kaspaz-3, c-Myc ve β-katenin gen ifadeleri. (İstatistiksel anlamlı farklılıklar n = 3, *$p<0,05$, **$p<0,01$, ***$p<0,001$; kontrol: TCPS). 201

Şekil 4.62. Nanopartikül yüklü doku iskelelerine ait SEM görüntüleri a) Sf/PBAT, b,c) Sf/GA-PBAT ve d,e) Sf/GA-ONM-PBAT doku iskeleleri. Sarı oklar doku iskeleleri içerisindeki nanopartikülleri işaret etmektedir. 203

Şekil 4.63. Sünger doku iskelelerinden fizyolojik ve asidik ortamlarda kümülatif GA salım grafiği (n=3).....205

Şekil 4.64. T98G hücrelerinin 3 günlük MTT sonuçları. (İstatistiksel olarak anlamlı farklar n =3 *$p<0,05$, **$p<0,01$, ***$p<0,001$, Sf grubu kontrol grubu iken).....208

Şekil 4.65. Doku iskelelerinde kültüre edilen T98G hücrelerinin üçüncü gün canlı-ölü boyama görüntüleri. (Beyaz oklar canlı hücreleri, sarı oklar ise ölü hücreleri göstermekte olup; yapılan analizde canlı hücreler yeşil, ölü hücreler ise kırmızı renkte boyanarak belirlenmiştir). 210

Şekil E1.1. MC3T3-E1 hücrelerinin a) hemasitometrik hücre sayımı ile elde edilen üreme grafiği, farklı günlerdeki b) Kristal viyole boyama görüntüleri, c) Alexa Fluor® 488 ve PI ile yapılan ikili floresan boyama görüntüleri (kırmızı renk ile hücre çekirdekleri yeşil renk ile hücre iskeleti boyanmıştır) ([312]'den değiştirilerek)……..252

Şekil E1.2. T98G hücrelerinin a) hemasitometrik hücre sayımı ile elde edilen üreme grafiği, farklı günlerdeki b) Kristal viyole boyama görüntüleri, c) Alexa Fluor® 488 ve PI ile yapılan ikili floresan boyama görüntüleri (kırmızı renk ile hücre çekirdekleri yeşil renk ile hücre iskeleti boyanmıştır) ([313]'ten değiştirilerek)……..253

Şekil E1.3. HUVEC'lerin a) hemasitometrik hücre sayımı ile elde edilen üreme grafiği, farklı günlerdeki b) Kristal viyole boyama görüntüleri, c) Alexa Fluor ®488 ve PI ile yapılan ikili floresan boyama görüntüleri (kırmızı renk ile hücre çekirdekleri yeşil renk ile hücre iskeleti boyanmıştır) ([313]'ten değiştirilerek)……..254

ÇİZELGELER DİZİNİ

Çizelge 2.1. Sünger sınıfları, özellikleri ve yaşam alanları ([11]'den değiştirilerek).....15

Çizelge 2.2. Deniz süngerlerinin osteojenik potansiyeline yönelik *in vitro* ve *in vivo* çalışmalar ([11]'den değiştirilerek).....21

Çizelge 2.3 *Sarcotragus foetidus* süngerinin taksonomik sınıflandırması.....23

Çizelge 2.4. GA'nın bazı kanser türleri üzerindeki etkileri ([37]'den değiştirilerek).....35

Çizelge 2.5. GA için kullanılan ilaç taşıma sistemleri ([34]'ten değiştirilerek) 37

Çizelge 3.1. Deneysel çalışmalarda kullanılan malzemeler.....47

Çizelge 3.2. RT-PCR analizinde kullanılan primer dizileri 63

Çizelge 3.2. Kolajen hidrojel üretim koşulları 76

Çizelge 3.3. Boş PBAT nanopartikül üretim formülasyonları.....80

Çizelge 3.4. RT-PCR analizinde kullanılan primer dizileri. 93

Çizelge 4.1. Doku iskelelerinin denge durumundaki su alım yüzdeleri. 105

Çizelge.4.2. Doku iskelelerinin elementel bileşimi (ağırlıkça).....116

Çizelge.4.3 Doku iskelelerinin su alım yüzdeleri. 117

Çizelge 4.4. Sf, Sf/HAp ve Sf/B-HAp doku iskelelerinin gözenek profili ve ortalama gözenek çapı.....122

Çizelge 4.5. Kolajen hidrojelleri oluşturmak için çalışılan proses değişkenleri.....153

Çizelge 4.6. Kolajen hidrojellerin jelleşme süreleri.....155

Çizelge 4.7. Emülsiyon hazırlama-çözücü buharlaştırma yöntemi ile üretilen boş PBAT nanopartiküllere ait formülasyonlar ve ortalama çap değerleri.....161

Çizelge 4.8. RSM'de kullanılan parametreler, CCD için bağımsız değişkenler ve seviyeleri 163

Çizelge 4.9. Optimizasyon çalışmaları, sistem yanıtları ve nanopartiküllerle yüklenen GA miktarı. 164

Çizelge 4.10. Ortalama partikül çapına ait ikinci dereceden model için varyans analizi (ANOVA). 166

Çizelge 4.11. GA enkapsülasyon verimine ait ikinci dereceden model için varyans analizi (ANOVA). 166

Çizelge 4.12. PBAT nanopartiküllere ait özellikler 171

Çizelge 4.13 ONM kaplama verimi ve kaplama stabilitesi. 172

Çizelge 4.14 ONM kaplı GA-PBAT nanopartiküllere ait özellikler. 173

Çizelge 4.15. PBAT nanopartiküllerin zeta potansiyel değerleri 175

Çizelge 4.16. Saf su ortamında inkübe edilen nanopartiküllerin farklı zaman noktalarındaki ortalama çap ve zeta potansiyel değerleri. Değerler ortalama ± standart sapma olarak ifade edilmiştir. 180

Çizelge 4.17. Asetat tamponunda (pH 5,5) inkübe edilen nanopartiküllerin farklı zaman noktalarındaki ortalama çap ve zeta potansiyel değerleri. Değerler ortalama ± standart sapma olarak ifade edilmiştir. 181

Çizelge 4.18. Fizyolojik (pH 7,4) ve asidik (pH 5,5) ortamda partiküllerden toplam salınan GA miktarı (µg GA/mg partikül) 184

Çizelge 4.19. Fizyolojik ve asidik ortamda PBAT ve ONM-PBAT nanopartiküllerinden GA salımına ait kinetik modelleri. 186

Çizelge 4.20. PBAT nanopartiküllerinin T98G hücreleri ve HUVEC'ler tarafından hücre içine alım yüzdesi (n=3). Ekim yoğunluğu: $4x10^4$ hücre/mL 191

Çizelge 4.21. Fizyolojik ve asidik ortamda sünger doku iskelelerinden toplam salınan GA miktarı (n=3) (µg GA/iskele). 206

Çizelge 4.22. Fizyolojik ve asidik ortamda doku iskelelerinin GA salım kinetik modelleri……207

SİMGELER VE KISALTMALAR

Simgeler

$AgNO_3$	Gümüş Nitrat
B	Bor
C	Karbon
Ca	Kalsiyum
$CaCl_2$	Kalsiyum Klorür
$CaCl_2.2H_2O$	Kalsiyum Klorür Dihidrat
CO_2	Karbon Dioksit
Da	Dalton
dk	Dakika
H_2O_2	Hidrojen Peroksit
KCl	Potasyum Klorür
K_0	Sıfırıncı Derece Salım Hız Sabiti
K_1	Birinci Derece Salım Hız Sabiti
K_H	Higuchi Salım Hız Sabiti
K_{HC}	Hixson-Crowell Salım Hız Sabiti
$MgCl_2.6H_2O$	Magnezyum Klorür Hekzahidrat
NaCl	Sodyum Klorür
$NaHCO_3$	Sodyum Bikarbonat
$(NaH_2PO_4.H_2O)_2$	Sodyum Dihidrojen Fosfat Monohidrat
NaN_3	Sodyum Azid
NaOH	Sodyum Hidroksit
O	Oksijen
P	Fosfor

rpm	Dakikadaki Devir Sayısı
sa	Saat
s	Saniye
α	Alfa
β	Beta
γ	Gama
h/h	Hacim/hacim
k/h	Kütle/hacim
k/k	Kütle/kütle

Kısaltmalar

2B	İki Boyutlu
3B	Üç Boyutlu
ACN	Asetonitril
ALP	Alkalen Fosfataz
ANOVA	Tek Yönlü Varyans Analizi
ATR-FTIR	Fourier Dönüşümlü Toplam Yansıması Azaltılmış Kızılötesi Spektroskopisi
BBB	Kan-Beyin Bariyeri
B-HAp	Bor Katkılı Hidroksiapatit
BMP	Kemik Morfogenetik Protein
BSA	Sığır Serum Albümin
CCD	Merkezi Birleşik Tasarım
cDNA	Komplementer DNA
CLSM	Konfokal Lazer Taramalı Mikroskobu
Col1a1	Tip I Kollajen Alfa 1 Zinciri Geni

DAPI	4’-6-Diamidino-2-Fenilindol
DCM	Diklorometan
dH_2O	Saf su
DMAB	Didodesil Dimetil Amonyum Bromür
DMEM	Dulbecco’s Modified Eagle Medium
DPBS	Dulbecco Fosfat Tampon Çözeltisi
ECM	Hücre Dışı Matriks
EDC	1-Etil-3-(3-dimetilaminopropil)Karbodiimid Hidroklorür
EDTA	Etilendiamin Tetraasetik Asit
F-Aktin	Filementöz Aktinleri
FBS	Fetal Sığır Serumu
FITC	Floresan İzotiyosiyanat
GA	Gallik Asit
GBM	Glioblastoma Multiforma
HAp	Hidroksiapatit
HCl	Hidroklorik Asit
HMDS	Hekzametil Disilazan
HUVEC	İnsan Umbilikal Damar Endotel Hücreleri
LC-MS	Sıvı Kromatografisi – Kütle Spektrometrisi
MAPK	Mitojen-Aktive Protein Kinaz
MC3T3-E1	Fare Osteoblastik Hücre Hattı
MHA	Mueller Hinton Agar
MHB	Mueller Hinton Broth
MTT	3-[4,5-Dimetiltiyazol-2-il]-Difeniltetrazolyum Bromür
NHS	N-Hidroksisüksinimid
NPs	Nanopartikül

Ocn	Osteokalsin
ONM	*Opuntia ficus indica* Müsilajı
p53	Tümör Protein 53
PBAT	Poli(bütilen adipat-ko-tereftalat)
PBS	Fosfat Tampon Çözeltisi
PI	Propidyum İyodür
pNPP	p-Nitrofenil Fosfat
ROS	Reaktif Oksijen Türleri
RSM	Tepki Yüzey Metodolojisi
RT-PCR	Gerçek Zamanlı Polimeraz Zincir Tepkimesi
SBF	Yapay Vücut Sıvısı
SDS	Sodyum Dodesil Sülfat
SDS-PAGE	Sodyum Dodesil Sülfat–Poliakrilamid Jel Elektroforezi
SEM	Taramalı Elektron Mikroskobu
SK	Sünger Kolajeni
TCPS	Polistiren Hücre Kültür Kapları
T98G	İnsan Glioblastoma Hücresi

1. GİRİŞ

Günümüzde enfeksiyonlar, kırıklar, osteoporoz ve kemik tümörleri gibi faktörlerin neden olduğu kemik hasarları giderek artmakta ve bu durum, kemik rejenerasyonu ve onarımına yönelik bilimsel araştırmaların önemini daha da artırmaktadır. Konvansiyonel doku onarım teknikleri donör bölgesinde hasar oluşması, yeterli doku bulunamaması ve bağışıklık sistemi tarafından reddedilme riski gibi sorunlara yol açtığı için, doku mühendisliği temelli yeni yaklaşımlar ön plana çıkmıştır [1-3]. Bu yaklaşımın temel amacı, doğal kemik dokusunun mimarisini ve biyolojik özelliklerini taklit edebilen, yeterli mineralize doku oluşumunu destekleyen, biyouyumlu ve biyobozunur iskele sistemleri geliştirmektir [4, 5].

Bu hedef doğrultusunda pek çok farklı iskele malzemesi araştırılmış olmakla birlikte [6-9], sentetik iskelelerin yüksek üretim maliyetleri ve teknik zorlukları, doğal ve çevre dostu kaynaklardan elde edilen malzemelere ilgiyi artırmıştır. Bu bağlamda, deniz süngerleri (Porifera), biyouyumlu ve biyobozunur üç boyutlu iskelet yapıları sayesinde umut vadeden biyomalzemeler arasında yer almaktadır [10-13]. Özellikle *Demospongiae* sınıfındaki süngerlerin, kolajen temelli sponjin liflerinden oluşan nanofibröz iskelet yapısı ve porozite özellikleri; besin iletimi, metabolik ürünlerin taşınması, hücre canlılığı ve proliferasyonu açısından kemik doku mühendisliği uygulamaları için önemli avantajlar sunmaktadır [11]. Ancak bu süngerlerin doğal osteoindüktif kapasiteleri sınırlı olduğundan [14, 15], biyolojik aktiviteyi artırmak amacıyla yeni stratejilere ihtiyaç duyulmakta ve bu noktada, biyolojik özelliklerle birlikte mekanik stabilite sağlayan biyohibrit sünger temelli iskeleler dikkat çekmektedir.

Akdeniz Havzası'nda yaygın olarak bulunan *Sarcotragus foetidus*, *Demospongiae* sınıfına ait bir sünger türü olup, yüksek mekanik dayanıklılığa sahip 3B sponjin iskeleti ile öne çıkmaktadır [16, 17]. Bu iskelet, kolajen ve skleroproteinlerden oluşan hiyerarşik yapısı ile hücre dışı matriksi taklit eden biyobenzer yüzeyi, açık ve bağlantılı kanalları ile hücre tutunmasını ve göçünü destekleyen poröz mimarisi sayesinde kemik doku mühendisliği için potansiyel bir adaydır [16, 18, 19]. Bu bağlamda tez çalışması, *Sarcotragus foetidus* süngerinin kemik doku mühendisliğinde iskele materyali olarak değerlendirilmesine yönelik literatürdeki ilk kapsamlı araştırmayı sunmaktadır.

Bilindiği üzere kemik dokusu, organik fazı kolajenden ve inorganik fazı büyük oranda hidroksiapatitten (HAp) oluşan bir biyoseramik kompozittir [20]. HAp; osteokonduktif yapısı, biyouyumluluğu ve biyomimetik özellikleri nedeniyle iskelelerin yüzeyine kaplanarak kemik benzeri özelliklerin kazandırılmasında sıklıkla tercih edilmektedir [21-23]. Mikrodalga destekli kaplama yöntemi, düşük maliyet, homojen partikül dağılımı ve düşük sıcaklık gereksinimi gibi avantajları nedeniyle öne çıkmaktadır [24]. Literatürde HAp'a farklı iyonların (Zn, Fe, Ag, B vb.) katkısı üzerine çok sayıda çalışma bulunmakla birlikte, bor (B) elementi özellikle dikkat çekmektedir. Bor; hücre zar fonksiyonları, hormon metabolizması, enzim aktivitesi, yara iyileşmesi ve sert doku rejenerasyonu gibi birçok biyolojik süreçte rol oynamakta [25, 26] ve osteojenik farklılaşmayı indükleyici etkisi bulunmaktadır [27]. Bu nedenle, bu çalışmada *Sarcotragus foetidus* temelli sponjin iskelelerin bor katkılı hidroksiapatit (B-HAp) ile kaplanarak osteoindüktif kapasitelerinin artırılması ve yeni bir biyohibrit iskele geliştirilmesi hedeflenmiştir.

Bu kapsamda, geliştirilen iskeleler morfolojik, kimyasal, mekanik ve şişme özellikleri açısından karakterize edilmiş; ardından MC3T3-E1 preosteoblast hücre hattı ile biyouyumluluk ve osteojenik farklılaşma potansiyelleri *in vitro* olarak değerlendirilmiştir. Ayrıca, iskelelerin Gram pozitif ve negatif bakterilere karşı antibakteriyel özellikleri de test edilmiştir. Bu çalışma, literatürde ilk kez *Sarcotragus foetidus* kökenli sponjin iskelelerin B-HAp ile kaplanarak kapsamlı bir şekilde *in vitro* hücre kültürü ve bakteri kültürü analizlerinin yapıldığı çalışmadır.

Her ne kadar deniz süngerlerinin kemik doku mühendisliği açısından sunduğu avantajlar birçok çalışmada gösterilmiş olsa da, bu doğal yapıların hem sert hem de yumuşak doku mühendisliği alanlarında eş zamanlı kullanılabilirliğine dair literatürde çalışma bulunmamaktadır. Oysa süngerlerin biyouyumluluk ve biyobozunurluk gibi özellikleri, onları çoklu doku rejenerasyonu için potansiyel biyomalzeme adayları haline getirmektedir. Bu tez çalışması ile söz konusu eksiklik giderilmeye çalışılmış; *Sarcotragus foetidus* süngerinin hem sert hem de yumuşak doku mühendisliği uygulamalarındaki potansiyeli bütüncül bir yaklaşımla ele alınmıştır.

Bu bağlamda tez çalışmasının ikinci temel odağı, *Sarcotragus foetidus* süngerinden deniz kaynaklı kolajen izole edilerek yumuşak doku mühendisliğine uygun bir biyomalzeme

formuna dönüştürülmesidir. Farklı karakterizasyon teknikleri ile analiz edilen hidrojel formundaki kolajen yapılar, çapraz bağlama yöntemleri optimize edilerek stabil ve biyouyumlu sistemler haline getirilmiştir. Bu kolajen bazlı sistemler, özellikle lokal ilaç salımı uygulamalarında terapötik ajanların etkinliğini artırabilecek önemli taşıyıcı yapılar olarak değerlendirilmiştir.

Yukarıda ayrıntılı olarak açıklandığı gibi çalışmanın merkezinde, *Sarcotragus foetidus* süngerinden elde edilen doğal sponjin iskelet yapısı yer almakta olup, bu yapı hem sert doku mühendisliğine yönelik osteoindüktif biyohibrit iskelelerin hem de yumuşak doku uygulamalarına uygun kolajen temelli sistemlerin geliştirilmesinde kullanılmıştır. Bunun yanı sıra tez kapsamında, glioblastoma multiforme (GBM) gibi agresif beyin tümörlerinin tedavisine yönelik olarak gallik asit (GA) yüklü, *Opuntia ficus indica* müsilajı (ONM) ile kaplanmış PBAT (poli(bütilen adipat-ko-tereftalat)) nanopartikül sistemleri geliştirilmiş; bu sistemler *Sarcotragus foetidus* temelli taşıyıcı iskelelerle entegre edilerek yenilikçi bir lokal ilaç taşıyıcı sistem oluşturulmuştur.

GBM, çocuklarda en sık görülen ikinci, yetişkinlerde ise altıncı en yaygın malign tümör türü olup, hızlı yayılımı, invaziv karakteri ve kan-beyin bariyerini (BBB) aşamayan konvansiyonel tedavi yöntemleri nedeniyle prognozu oldukça kötü olan bir hastalıktır. Ortalama sağkalım süresi yaklaşık 12 ay [28, 29] ile sınırlı kalan bu tümör tipi, lokal ilaç salım sistemlerine olan ihtiyacı artırmıştır. Bu kapsamda geliştirilen nanopartikül temelli sistemler, doğrudan tümör bölgesine yerleştirilerek [30-33] ilaçların kontrollü ve uzun süreli salımını sağlamayı hedeflemektedir.

Bu sistemlerde terapötik ajan olarak tercih edilen gallik asit (GA), doğal polifenolik bir bileşiktir. Antioksidan, antiinflamatuar ve antikanser özelliklere sahip olan GA; apoptotik hücre ölümünü tetikleyerek, hücre döngüsü durdurma, anjiyogenez ve metastazla ilişkili sinyal yollarını inhibe etme gibi etkiler göstermektedir [34]. GA'nın birçok kanser hücre hattında (A549, HL-60, MCF-7, Caco-2 vb.) etkili olduğu raporlanmış [35-38] olmasına rağmen, glioma hücreleri üzerindeki etkisine dair literatürdeki çalışmalar sınırlıdır. Bununla birlikte, GA'nın düşük biyoyararlanımı ve hedef bölgeye yeterli miktarda ulaşamaması, terapötik etkinliğini sınırlayan önemli faktörlerdendir [39, 40].

Bu sınırlamaların üstesinden gelmek amacıyla, bu tezde PBAT esaslı nanopartiküller geliştirilmiştir. PBAT, aromatik (BT) ve alifatik (BA) bileşenlerin özelliklerini bir araya getiren alifatik-aromatik bir kopoliesterdir. Yüksek esnekliği [41], tamamen biyobozunur yapısı [42], toksik olmayan bozunma ürünleri [43], hidrofilik karakteri ve hidrolojik koşullardaki kontrollü bozunma davranışı [44] sayesinde PBAT, hem doku mühendisliği hem de kontrollü ilaç salım sistemleri için uygun bir polimer olarak öne çıkmaktadır [45, 46]. PBAT kullanılarak geliştirilen nanopartiküller, GA'nın kontrollü salımını destekleyerek terapötik etkisini uzatmayı amaçlamaktadır.

Buna ek olarak, GA salım profilini iyileştirmek ve sistemin biyofonksiyonelliğini artırmak için nanopartikül yüzeyi ONM ile kaplanmıştır. ONM, heteropolisakkaritler ve fenolik bileşikler bakımından zengin olup [47], doğal, biyobozunur ve biyouyumlu yapısıyla jel oluşturma, bağlayıcılık [48, 49] ve kontrollü salım sağlama gibi özellikleri nedeniyle ilaç taşıma sistemlerinde kaplayıcı ajan olarak kullanılmaya uygundur. ONM'nin ayrıca antioksidan ve potansiyel antikanser özellikleri de bulunduğundan [50], GA ile sinerjik etki oluşturabileceği öngörülmüştür. Literatürde ONM'nin nanopartikül kaplama ajanı olarak kullanıldığı çalışma bulunmamaktadır; bu doğrultuda, çalışma ONM'nin PBAT nanopartiküllerinin kaplanmasında ve GA'nın kontrollü salımının desteklenmesinde kullanıldığı literatürdeki öncü örneklerden biri olma niteliği taşımaktadır.

Sonuç olarak tez çalışmasında, *Sarcotragus foetidus* süngerinden elde edilen doğal sponjin yapı hem sert hem de yumuşak doku mühendisliği açısından çok yönlü olarak değerlendirilmiştir. Sert doku uygulamaları için sünger iskelet yapısı izole edilerek HAp ve B-HAp ile kaplanmış, böylece osteoindüktif özellikleri artırılmış biyohibrit iskeleler geliştirilmiştir. Yumuşak doku uygulamaları için ise aynı süngerden deniz kökenli kolajen izole edilmiş, bu kolajen yapılar hidrojel formuna dönüştürülerek stabilize edilmiştir. Ayrıca, GA yüklü ve müsilaj ile kaplanmış PBAT nanopartiküller hazırlanmış ve bu partiküller, geliştirilen sünger bazlı iskele sistemine entegre edilmiştir. Böylece hem kontrollü ilaç salımı sağlayan hem de hücresel proliferasyonu destekleyen çok işlevli bir sistem oluşturulmuştur. Elde edilen veriler, bu bütünleşik yapının GBM tedavisinde yüksek antikanser aktivite sergilediğini ve doku mühendisliği uygulamaları için etkili bir taşıyıcı sistem oluşturduğunu ortaya koymuştur. Bu yönüyle çalışma, *Sarcotragus*

foetidus süngerinin hem sert ve yumuşak doku mühendisliği iskelesi olarak hem de lokal ilaç taşıyıcı sistemin bir bileşeni olarak kullanımını bir arada ele alan literatürdeki ilk kapsamlı araştırma niteliğindedir.

2. GENEL BİLGİLER

Bu tez çalışmasının teorik temelini oluşturan literatür bilgileri bu bölümde detaylı şekilde sunulmuştur. İlk olarak, doku mühendisliği yaklaşımları kapsamında doğal biyomalzeme kaynaklarının rolü ele alınmış ve özellikle *Sarcotragus foetidus* süngerinin biyolojik ve yapısal özellikleri değerlendirilmiştir. Bu sünger türünden elde edilen sponjin iskelet, hem sert doku mühendisliği uygulamalarında osteoindüktif biyohibrit yapıların geliştirilmesi, hem de yumuşak doku mühendisliğine yönelik kolajen temelli hidrojel yapılarının üretimi açısından ele alınmıştır. Ayrıca, kolajen izolasyonu sonrasında elde edilen yapılar HAp ve B-HAp ile kaplanarak mekanik dayanım ve osteojenik potansiyel yönünden iyileştirilmiş; elde edilen sistemlerin rejeneratif tıpta kullanımına dair literatür bilgileri sunulmuştur.

İkinci olarak, GBM gibi agresif beyin tümörlerinin tedavisinde ilaçların lokal ve kontrollü salımına yönelik biyomalzeme temelli yaklaşımlara ilişkin literatür bilgileri sunulmuştur. Bu çerçevede, doğal bir polifenol olan GA'nın antikanser etkileri ile farmakokinetik sınırlamaları ele alınmış; GA'nın terapötik etkinliğini artırmak amacıyla PBAT temelli biyobozunur nanopartikül sistemlerinin sunduğu avantajlar değerlendirilmiştir. Ayrıca, bu nanopartikül sistemlerinin lokal uygulamalardaki etkinliğini artırmak üzere taşıyıcı yapı olarak *Sarcotragus foetidus* süngerinden elde edilen doğal iskelet yapısının kullanımı incelenmiş ve ilgili literatür bilgilerine yer verilmiştir.

2.1. Doku Mühendisliği

Kanser, konjenital anomaliler veya travma gibi nedenlerle dokular veya organlar ciddi şekilde hasar gördüğünde veya kaybolduğunda, konvansiyonel farmasötik tedaviler artık uygulanamaz hale gelir. Bu gibi durumlarda, yapay organlar (dokular dahil) veya organ nakli, tahrip olmuş doku veya organların yeniden yapılandırılmasında ilk tercih olmaktadır. Ancak, bu cerrahi tedaviler günümüzde birçok zorlukla karşı karşıyadır. Yapay organlar, son yıllarda biyomedikal mühendislik alanında kaydedilen önemli ilerlemelerle geliştirilmiş olsa da, halen daha iyi biyouyumluluk ve biyofonksiyonellik gerektirmektedir. Organ naklinde ise bağışlanan organ eksikliği ve immün reddetme gibi sorunlar devam etmekte, ancak bağışıklık baskılayıcı tedavilerde son dönemde önemli ilerlemeler kaydedilmiştir. Yaklaşık 60 yıl önce, doku ve organ yenilenmesine alternatif

bir yaklaşım olarak yeni bir paradigma ortaya çıkmıştır: Doku mühendisliği. Doku mühendisliğinin ayırt edici özelliği, kötü biyouyumluluk, düşük biyofonksiyonellik ve şiddetli bağışıklık reddi gibi sorunlardan tamamen arındırılmış, hastanın kendi dokularını ve organlarını yeniden oluşturma yeteneğidir. Bu olağanüstü avantajları nedeniyle, doku mühendisliği sıklıkla nihai ve ideal bir tıbbi tedavi olarak görülmektedir. Yeni dokuların rejenerasyonu için, bu biyomedikal mühendislik yaklaşımı üç temel aracı kullanır: hücreler, doku iskelesi ve büyüme faktörleri. Hücre, yeni dokunun matrikslerini sentezlerken, iskelet ise hücrelerin görevlerini etkili bir şekilde yerine getirebilmeleri için uygun ortamı sağlar. Büyüme faktörlerinin işlevi ise hücrelerin yeni doku oluşturmasını kolaylaştırmak ve teşvik etmektir. Pek çok farklı doku tipini rejeneratif olarak üretmeye yönelik birçok araştırma yapılmış olmasına rağmen, bu rejeneratif süreçte hücre kaynağı, iskele yapısı, kültür ortamı, hücre-iskelet kompleksinin mekanik özellikleri ve uygun hayvan modelleri gibi kritik faktörler hâlâ önemli bir rol oynamaktadır. Günümüzde doku mühendisliğinin deri, kıkırdak ve kemik doku gibi farklı dokuların geliştirilmesinde uygulamaları mevcuttur [51].

2.2. Kemik Doku Mühendisliği

İnsan vücudunda, farklı morfolojilere ve boyutlara sahip 200'den fazla kemik bulunur ve bu kemikler yapısal bir işlev görmenin yanı sıra hayati organları korur. Bu karmaşık, aktif ve hiyerarşik doku, aynı zamanda vücut hareketlerini ve yer değiştirmeyi de destekler. Ayrıca, kemikler kan hücrelerinin üretiminden ve mineraller ile büyüme faktörlerinin (GF'ler) depolanmasından da sorumludur. Kemiklerin fizyolojik işlevleri, hücre bölünmesi, göçü ve farklılaşması gibi hücresel işlevlerin düzenleyicisi olan GF'lerin ve sitokinlerin üretiminden sorumlu kök hücrelerin varlığıyla yakından ilişkilidir [52, 53].

Kemik, olağanüstü dinamik ve damarlanmış mineralize ve organize bir yapıya sahip olup, kendini onarma özelliğiyle dikkat çekmektedir [54]. Kemik hasarları doğuştan gelen kusurlar veya yaşlanmanın etkisi gibi sonradan ortaya çıkan durumlar sonucu gelişebilir. Özellikle, travma, enfeksiyon, inflamasyon veya tümör rezeksiyonu gibi karmaşık lezyonlarda ve kritik boyutları aşan doku kayıplarında klinik müdahale gereklidir [55]. Günümüzde bu tür hasarların tedavisinde otolog, allojenik veya ksenojenik kemik grefti nakli gibi çeşitli seçenekler kullanılmaktadır. Fakat, donör kaynaklarının sınırlı olması ve

doku uyumsuzluğu gibi sorunlar nedeniyle, son yıllarda kemik doku mühendisliği yaklaşımları ön plana çıkmıştır [56]. Bu yöntem, biyobozunur ve gözenekli iskelelerin sinyal verici faktörlerle birleştirilmesi yoluyla hücre adezyonu, proliferasyonu ve fonksiyonunu destekler; aynı zamanda doku yenilenmesi ve damarlanmayı teşvik eder [57]. Özellikle, iskele bazlı doku mühendisliği literatürde kemik rejenerasyonu için umut vaat eden bir yöntem olarak tanımlanmakta olup, mikro ve makro ölçekte kemik mimarisini taklit ederek hücre büyümesi ve farklılaşmasını iyileştirmeyi hedefler [3].

2.2.1. Kemik Dokusu ve Hücresel Dinamikleri

Kemik dokusu, mimarisine göre iki ana sınıfa ayrılmaktadır: trabeküler veya süngerimsi kemik ve kortikal veya kompakt kemik. Trabeküler kemik daha gözenekli bir yapıya sahip olduğundan, kortikal kemiklere kıyasla sıkıştırmaya karşı daha az dirençlidir. Süngerimsi kemik, sünger şeklindeki morfolojisi nedeniyle geniş bir yüzey alanı sunar ve bu da daha fazla metabolik aktiviteye olanak tanır. Bu yapı, besinlerin, biyomoleküllerin ve gazların değişimini mümkün kılar. Trabeküler kemik, femur ve humerus gibi uzun kemiklerin metafiz bölgelerinde ve çene ve kafatası gibi yassı kemiklerde bulunur (**Şekil 2.1**). Kortikal kemik ise uzun kemiklerin diafiz kısmında yer alır ve çok daha az sayıda gözenek içererek neredeyse katı bir yapı sergiler. Ayrıca, vücuttaki tüm kemikleri kaplayan bir tabakadır. Destekleme işlevinde kritik bir role sahip olan kortikal kemik, üç alt tipe ayrılır: femur ve tibia gibi uzun kemikler; kafatası gibi yassı kemikler; ve ayak bileği ve el bileği kemikleri gibi kısa kemikler [54, 58].

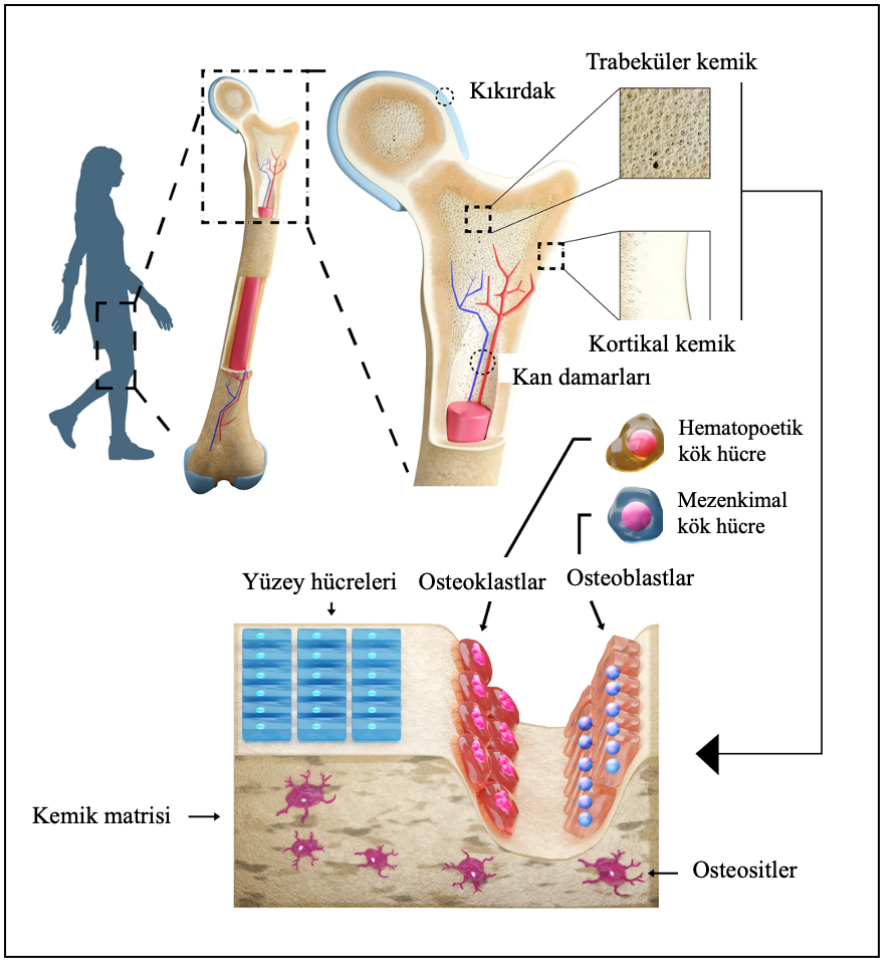
Kemik morfolojisi, vücudun yapısal ihtiyaçlarını karşılayacak şekilde güç ve dayanıklılık sağlar. Makroskobik olarak, trabeküler kemik güçlü bir gözenekli ağ yapısına sahiptir ve bu ağ, madde taşınımını sağlayan kanallar içerir. Trabekül adı verilen bu ağ, fonksiyonel olarak kuvvetlerin dağılımını sağlayarak, aşırı koşullarda bile kırık riskini en aza indirir. Ayrıca, kemik dokusu vücut hareketlerini desteklerken ağırlığın etkilerini azaltır ve eksenel sıkıştırma kuvvetlerini dağıtır. Kortikal kemik açısından bakıldığında ise, osteon adı verilen ve birbirine çok yakın yerleşmiş yapılar bu kemiğin mimarisini oluşturur. Bu düzen, kemiği eğilmelere karşı oldukça dirençli hâle getirir. Yaşla birlikte kortikal kemikte daha fazla gözeneklilik ve daha az kalınlık gözlemlenebilir [58].

Mikroskobik düzeyde, kemik dokusunun işlevsel bütünlüğünü sağlayan üç temel hücre tipi bulunmaktadır: Osteoblastlar, osteositler ve osteoklastlar. Bu hücreler, birbirini tamamlayan işlevleriyle dinamik ve sürekli değişen bu dokunun yaşamı ve aktiviteleri için kritik öneme sahiptir [59].

Osteoblastlar, kemik matriksini oluşturan ve tabakalar hâlinde organize olan hücrelerdir. Küboidal morfolojileri sayesinde kemiğin lameller yapısının oluşumunu sağlarlar. Ayrıca osteoblastlar, yalnızca kemik dokusu üretmekle kalmaz, aynı zamanda kemik yeniden şekillenmesi ve mineralizasyonunda rol alan reseptör ve proteinleri de barındırırlar. Kemik yüzeyinde yer alan bu hücreler, mezenkimal kök hücrelerin (MSCs) yakınında bulunurlar. Osteoblastların işlevlerini ve dokunun metabolik yanıtını sürdürebilmeleri için matriks-hücre ve hücre-hücre temasına, aynı zamanda yüzeye tutunmaya bağımlıdırlar. Bu temaslar; reseptörler, sitokinler, hormonlar, büyüme faktörleri ve çeşitli proteinler aracılığıyla düzenlenmektedir [60].

Osteositler, erişkin kemikteki en yaygın ve merkezi hücrelerdir. Mineralize kemikte ağ yapısını oluşturmaktan sorumludurlar. MSC'lerden türeyen osteositler, özelleşmiş ve farklılaşmış osteoblastlar olmalarına rağmen, morfolojik ve işlevsel olarak osteoblastlardan ayrılırlar [61]. Osteositlerin çok sayıda filopod adı verilen uzantısı bulunur; bu yapılar, kemik dokusunun yüzey hücreleriyle bağlantı kurmalarını sağlar [60, 61]. Ayrıca osteositler, salgıladıkları sinyal verici faktörlerle osteoblast ve osteoklastların fonksiyonlarını düzenleme kapasitesine sahiptirler [61].

Osteoklastlar, kan hücrelerinin de kaynağı olan kemik iliği kökenli pluripotent kök hücrelerden türeyen hücrelerdir. İşlevsel olarak, mineralize kemik dokusunu yüksek oranda rezorbe etme yeteneğine sahip olup, bu süreçte matriks enzimlerinin sentezini düzenlerler. Apikal membran yapısı, kalsifiye matriksle bir sızdırmazlık bölgesi oluşturarak liziz enzimlerinin etkinleşmesini ve kemik dokusunun çözünmesini sağlar [62].



Şekil 2.1. Kemik yapısı ile kemik hücreleri ([63]'den değiştirilerek).

Kemik dokusunun yeniden yapılanma süreci dört ana evrede gerçekleşir: rezorpsiyon (kemik yıkımı), hücresel geri dönüşüm, yeni matriks sentezi ve mineralizasyon. Sürecin başlangıcında, hasarlı bölgeden salınan sitokinler preosteoklastları kemik yüzeyine yönlendirir; bu hücreler olgunlaşarak osteoklastlara dönüşür ve yıkım işlemini başlatır. Yıkımın ardından preosteoblastlar çoğalarak osteoblastlara farklılaşır ve yeni matriks sentezleyerek onarım sürecini başlatır. Son aşamada ise osteoblastlar osteosit formuna geçer ve mineralizasyon ile birlikte yeni kemik dokusu oluşur [63].

2.2.2. Doku İskeleleri

Her doku, bir matriks ve bir veya genellikle birçok hücre tipinden oluşur. Matriks, *in vivo* ortamda hücreler için üç boyutlu bir iskele görevi görerek dokulara özgü bir çevre ve mimari sağlar. Dahası, su, besin maddeleri, sitokinler ve büyüme faktörleri gibi moleküller için bir depo işlevi de görür. Bu bağlamda, fonksiyonel onarımı veya doku

rejenerasyonunu sağlamak için, hücre proliferasyonu ve ekstraselüler matriks birikimine uygun geçici bir matriks görevi görecek, yeni kemik dokusu tamamen restore edilene kadar iskele işlevi görecek bir şablon yani "iskelet (scaffold)" gereklidir. Dahası, bu iskeleler yapısında bulunan büyüme ve farklılaşma faktörlerini serbest bırakarak rejeneratif sürece aktif olarak katılabilirler [4].

Dolayısıyla, uygun bir üç boyutlu iskele, doku mühendisliği stratejilerinin temel bir bileşeni olarak kabul edilir. Ancak, böyle bir iskele geliştirilirken belirli özelliklerin karşılanması da zorunludur. Malzeme seçiminden bağımsız olarak, iskelelerin makro ve mikro yapısal özellikleri son derece önemlidir. Bu özellikler, yalnızca hücrelerin canlılığını, sinyalizasyonunu, büyümesini, yayılmasını ve yeniden organizasyonunu değil; aynı zamanda gen ekspresyonunu ve hücresel fenotipin korunup korunmadığını da doğrudan etkiler. Bu bağlamda, iskelelerin temel gereklilikleri arasında biyouyumluluk, gözeneklilik, optimum gözenek boyutu, yüzey özellikleri, osteoindüktivite, mekanik özellikler ve biyobozunurluk gibi önemli kriterler yer almaktadır. Bu kriterler, aşağıda detaylı ve kapsamlı bir şekilde ele alınmıştır [4].

Biyouyumluluk: İskeleler, konak dokuya iyi entegre olmalı ve bir bağışıklık yanıtını tetiklememelidir.

Gözeneklilik: İskeleler, açık gözenekli, tamamen birbiriyle bağlantılı bir geometriye ve yüksek poroziteye sahip olmalıdır. Bu yapı, hücrelerin iskelenin iç bölgelerine kadar ilerlemesini, düzgün dağılmasını ve yeni doku oluşumuyla birlikte damarlaşmasını destekler. Ayrıca, yeterli mikro gözeneklilik de kılcal damarların iskelenin içine büyümesini sağlamak için önemlidir. Gözeneklilik ve bağlantılılık, hücrelerin aktivitesi sonucu oluşan atık ürünlerin uzaklaştırılması ve besin-gaz difüzyonunu kolaylaştırır. Özellikle kemik dokusu mühendisliğinde, kemiğin metabolik özellikleri nedeniyle yüksek kütle transfer hızları beklendiğinden bu durum çok önemlidir. Ancak gözeneklilik derecesi, iskelelerin mekanik stabilitesini de etkilediğinden, her zaman hedef dokunun mekanik ihtiyaçlarıyla dengeli bir şekilde optimize edilmelidir.

Gözenek Boyutu: Gözenek boyutu da çok önemlidir. Çünkü gözenekler çok küçükse hücreler gözenekleri tıkayarak ilerlemeyi ve ekstraselüler matriks (ECM) üretimini

engelleyebilir. Kemik doku mühendisliği için optimum gözenek boyutunun 200–900 μm arasında olması yaygın olarak kabul edilmektedir [4, 64]. Ancak Holly ve ark. [65], 1,2–2,0 mm gibi daha büyük makrogözenekli, 3B bağlantılı bir yapı önererek kemik rejenerasyonu için alternatif bir yaklaşım sunmuştur. Bu büyük gözenekli yapılar, hücre, doku ve damar büyümesini desteklese de mekanik açıdan zayıf oldukları için yüksek mekanik gereksinimli alanlarda kullanılamazlar.

Yüzey Özellikleri: Yüzeyin kimyasal ve topografik özellikleri, hücre adezyonunu ve çoğalmasını doğrudan etkiler. Kimyasal özellikler, hücrelerin malzemeye bağlanma kapasitesi ve protein etkileşimlerini belirler. Topografik özellikler ise özellikle osteokondüksiyon açısından önemlidir. Osteokondüksiyon, osteojenik hücrelerin fibrin pıhtısı aracılığıyla iskele yüzeyine göç etmesi sürecidir [66]. Pıhtı iskelenin yüzeyine sıkıca bağlanmazsa, hücre göçü sırasında pıhtının ayrılması doku oluşumunu olumsuz etkiler. Yapılan çalışmalar, daha "pürüzlü" yüzeylerin fibrin pıhtısını hapsederek osteojenik hücrelerin iskelenin yüzeyine göçünü kolaylaştırdığını göstermiştir.

Osteoindüktivite: Osteoindüksiyon, kök ve osteoprogenitör hücrelerin kemik iyileşme bölgesine çekilmesi ve osteojenik farklılaşmaya yönelmesi sürecidir [67]. Rejenerasyon hedefi büyük olduğunda, doğal osteoindüksiyon ve biyobozunur bir iskele yeterli olmayabilir. Bu nedenle, iskelenin de osteoindüktif özellik göstermesi gerekir.

Mekanik Özellikler ve Biyobozunurluk: *İn vitro* koşullarda iskele, hücrelerin büyümesi ve ECM üretimi için gerekli boşlukları koruyacak ve hidrodinamik basınçlara dayanabilecek mekanik güce sahip olmalıdır [5]. *İn vivo* ortamda ise, kemik sürekli stres altında olduğundan, iskelenin mekanik özellikleri canlı kemiğin özelliklerine yakın olmalı, böylece yaralanma bölgesi erken dönemde mobilize edilebilmelidir. Ayrıca, iskelelerin bozunma hızı, yeni doku büyüme hızıyla uyumlu olmalı ve doku tamamen yenilendiğinde iskele de tamamen bozunmuş olmalıdır.

2.2.2.1. Doku İskelesi Biyomalzemeleri

Kemik doku mühendisliğinde başarılı bir iskele tasarımı için en uygun malzemenin seçimi kritik öneme sahiptir. Zira kullanılan malzemenin biyolojik ve fiziksel özellikleri,

geliştirilen iskelenin mekanik dayanımı, biyouyumluluğu ve hücresel etkileşim potansiyeli gibi temel performans kriterlerini doğrudan etkilemektedir.

Seramikler, biyomedikal mühendislikte ve kemik onarımı gibi uygulamalarda yaygın olarak kullanılmaktadır. Bu seramikler, mercan gibi doğal kaynaklardan elde edilen hidroksiapatit (HAp) ya da laboratuvar ortamında üretilen sentetik HAp ve β-trikalsiyum fosfat (β-TCP) gibi malzemeler olabilir [68]. Özellikle osteokondüktif ve osteoindüktif özellikleri nedeniyle kemik doku mühendisliği uygulamaları için umut verici materyaller olarak görülmektedirler. Ancak bu malzemelerin bazı önemli dezavantajları da vardır. Öncelikle, kırılgan yapıları ve düşük mekanik stabiliteleri nedeniyle büyük kemik defektlerinin rejenerasyonunda kullanımları sınırlıdır. Ayrıca, osteoklast aktivitesi gibi *in vivo* faktörler nedeniyle bu seramiklerin bozunma/çözünme oranlarını öngörmek zordur. Çok hızlı bozunmaları durumunda, bu durum hem kendi düşük mekanik stabilitelerini hem de konstrüksiyonun genel dayanımını tehlikeye atar. Aynı zamanda, bu hızlı bozunma hücre ölümü gibi istenmeyen sonuçlara yol açan kalsiyum (Ca) ve fosfor (P) iyonlarının hücre dışı ortamda aşırı artışına sebep olabilir [69].

Bunlara alternatif olarak, biyobozunur polimerler, kemik doku mühendisliği için ideal malzemeler olarak kabul edilmektedir. Bu polimerler iki gruba ayrılır: sentetik ve doğal. Sentetik biyobozunur polimerler, bu alanda en sık kullanılan malzemelerdir. Kimyasal çeşitlilikleri ve işlenebilirlikleri, yapılarına ve doğalarına göre değiştiğinden, doğal polimerlerle doğrudan karşılaştırılmaları mümkün değildir. Ancak, bu malzemelerin kullanımıyla ilgili bazı kısıtlamalar bulunmaktadır; özellikle üretim maliyetlerinin yüksek olması önemli bir dezavantajdır. En yaygın kullanılanlar arasında poli(α-hidroksi asitler), poli(ε-kaprolakton), poli(propilen fumaratlar), poli(karbonatlar), poli(fosfazenler) ve poli(anhidritler) yer almaktadır [4, 70].

Doğal biyobozunur polimerler, hayvansal ya da bitkisel kökenli doğal kaynaklardan elde edilir ve kolajen, fibrinojen, kitin, nişasta, hiyalüronik asit ve poli(hidroksibutirat) gibi malzemeleri içerir [71]. Bu malzemelerin temel avantajları arasında düşük immünojenik potansiyel, biyolojik olarak aktif davranabilme, konak dokuyla bütünleşebilme ve kimyasal çeşitlilikleri bulunur. Ayrıca bazıları (örneğin nişasta ve kitin gibi) sınırsız kaynak potansiyeline sahiptir salgado. Son yıllarda deniz süngerleri de bu polimerler

arasında dikkat çekmektedir [11]. Doğal olarak gözenekli ve üç boyutlu bir ağ yapısı sunan sünger iskeleleri, hücre göçünü ve damarlaşmayı destekleyerek kemik doku mühendisliğinde önemli bir rol oynar [10]. Ayrıca, çevresel sürdürülebilirlik açısından da avantaj sağlayan deniz süngerleri, yenilenebilir ve sürdürülebilir bir doğal kaynak olması nedeniyle tercih edilmektedir.

2.3. Süngerler (Porifera)

Deniz organizmalarının biyoteknoloji alanındaki potansiyeli henüz tam anlamıyla keşfedilmemiş olsa da, sahip oldukları yapısal ve kimyasal özellikler, tıbbi amaçlı yenilikçi ürünlerin geliştirilmesine olanak tanımaktadır [72, 73]. Özellikle deniz süngerleri, antitümör, antiviral, anti-inflamatuar ve antibiyotik özellikleri sayesinde geniş bir uygulama alanı sunar ve önemli bir terapötik potansiyel taşır [74, 75]. Yapılan bazı çalışmalar, süngerlerden elde edilen doğal kimyasal bileşiklerin transkripsiyon faktörlerini inhibe edebildiğini ve bu sayede hem kanserli hücrelere hem de viral hastalıklara karşı etkili olabileceğini ortaya koymuştur [75].

Deniz süngerleri, Porifera filumuna ait, hareketsiz yaşam süren hayvanlardır. Bilinen ilk çok hücreli hayvanların temsilcileri olarak kabul edilirler ve kökenlerinin yaklaşık 580 milyon yıl öncesine, Geç Proterozoik döneme kadar dayandığı düşünülmektedir [76]. Bu organizmalar, flagellalı (kamçılı) hücreler olan koanositlerle kaplı, oldukça karmaşık ve etkili bir su taşıma sistemi oluşturan kanallar ve odacıklar ağı sayesinde süzerek beslenirler [77].

2.3.1. Süngerlerin Sınıflandırılması

Porifera filumu, morfolojik ve genetik özelliklerine göre dört ana sınıfa ayrılmaktadır: *Demospongiae*, *Homoscleromorpha*, *Hexactinellida* ve *Calcarea* [78]. Bunlar arasında en büyük ve en çeşitli sınıf olan *Demospongiae*, tüm sünger türlerinin %81'ini oluşturmakta ve dünya genelinde yaklaşık 7200 türe ev sahipliği yapmaktadır. *Demospongiae*, deniz ortamlarının yanı sıra bazı tatlı su ekosistemlerinde de bulunabilir. *Homoscleromorpha* ise yaklaşık 100 türe sahip küçük bir grup olup yakın zamanda sınıf seviyesine yükseltilmiştir [79]. *Hexactinellida* sınıfı, yaklaşık 600 türüyle özellikle derin

deniz ve kutup bölgelerinde yaygındır. Yaklaşık 700 türe sahip olan *Calcarea* sınıfı ise daha çok sığ deniz ortamlarında görülmektedir. Her bir sınıfın ayırt edici özellikleri ve yaşam alanları, **Çizelge 2.1**'de detaylı olarak sunulmuştur [11].

Çizelge 2.1. Sünger sınıfları, özellikleri ve yaşam alanları ([11]'den değiştirilerek).

Sünger sınıfı	Özellikleri ve yaşam alanları
Demospongiae	En büyük ve en çeşitli sınıf olan bu grup, bazı deniz ve tüm tatlı su sünger türlerini kapsar. İskelet yapısı oldukça farklılık gösterebilir; yalnızca silisli spiküllerden, yalnızca kolajen liflerinden veya her ikisinin çeşitli oranlarda kombinasyonlarından oluşabilir. Bazı durumlarda iskelet yapısı, kum taneleri gibi yabancı inorganik malzemeleri de içerebilir. Hatta bazı türlerde iskelet tamamen yoktur ve sünger gövdesi yoğun bir kolajen matriksi ile desteklenerek güçlendirilmiştir (örneğin, *Chondrosia*).
Homoscleromorpha	Bu sınıf, bazal membranında tip IV kolajen barındırması ve silli pinakosit hücrelerine sahip olması gibi bazı kendine özgü özelliklere sahiptir. İskeleti genellikle az sayıda silisli spikül barındırabilir veya iskelet yapısı bulunmayabilir.
Hexactinellida	Bu grup, derin denizlerde ve kutup bölgelerinde yaygın olarak bulunur. Bazı türlerde dokular incelmiş ve hücrelerin sitoplazmalarının birleşmesi sonucu çok çekirdekli bir yapı oluşmuştur. İskelet, genellikle silisli spiküllerden oluşur; bazı türlerde bu spiküller 2 metreyi aşan uzunluklara ulaşabilir (örneğin *Monoraphis chuni*). Bazı türlerde ise spiküller birleşerek sert bir ağ yapısı oluşturur ve bu yapı "cam süngerleri" (örneğin *Euplectella*) olarak bilinir.
Calcarea	Sığ deniz bölgelerinde sıkça rastlanan bu organizmalar, genellikle milimetre ile birkaç santimetre arasında değişen küçük boyutlardadır. Diğer sünger sınıflarından farklı olarak, bu süngerlerin iskelet yapısı kalsiyum karbonattan oluşur. Bazı türlerde ise bu spiküller birbirine kaynaşarak daha sert ve dayanıklı bir yapı meydana getirir.

2.3.2. Süngerlerin İskelet Yapıları

Süngerler; renk, boyut ve doku gibi pek çok açıdan türler arasında büyük farklılıklar gösterse de, temel yapıları oldukça basit ve sadedir. Genellikle, fibril yapıdaki kolajenle zenginleştirilmiş bir hücre dışı matriksin (ECM) etrafını saran tek katmanlı bir epitel tabakası olan pinakoderm bu temel yapıyı oluşturur. Hücre dışı matriks içinde çeşitli özelleşmiş hücreler ile iskelet elemanları yer alır. Çoğu süngerde iskelet, spikül adı verilen inorganik yapılarla desteklenir. Bu spiküller, türüne göre farklı bileşenlerden oluşur: *Demospongiae*, *Homoscleromorpha* ve *Hexactinellida* sınıflarındaki süngerlerde

spiküller, amorf, kristalleşmemiş ve hidratlı yapıda olan silikadan ($SiO_2 \cdot nH_2O$) oluşur. *Calcarea* sınıfında ise spiküller, kalsiyum karbonat ($CaCO_3$) içeriklidir. Spikül oluşumu, türe bağlı olarak hücre içinde ya da hücre dışında gerçekleşebilir ve bu süreç sklerosit adı verilen özel hücreler tarafından kontrol edilir. Silisli süngerlerde, spiküller oluşurken silika, organik bir filamentin etrafında birikir [77]. Buna karşılık, *Calcarea* türlerinde bu süreçte organik bir eksen bulunmaz. Ayrıca bazı *Demospongiae* türleri, "koralin sünger" veya "sklerosünger" olarak adlandırılır [80]. Bu süngerler, ince bir yumuşak doku tabakasıyla kaplı sert bir kalsiyum karbonat zemine tutunarak büyür ve yapılarında silisli spiküllerle güçlendirilmiş karmaşık bir iskelet sistemi oluştururlar. *Demospongiae* sınıfındaki süngerlerde iskelet, yalnızca silisli spiküllerden oluşabileceği gibi, genellikle farklı oranlarda sponjin adı verilen özel kolajen lifleriyle birlikte bulunur. Bu lifler, spikülleri çevreleyerek iskeletin dayanıklılığını ve esnekliğini artırır.

2.3.2.1 Sponjin

Sponjin, süngerlerde bulunan spongosit hücreleri tarafından salgılanan, modifiye edilmiş bir proteindir. Sponjin liflerinin iskele içinde nasıl düzenlendiği, süngerin mekanik özelliklerini ve esnekliğini doğrudan etkiler. Sponjin, yapısal olarak kolajene benzerlik göstermektedir [81]. Kolajen ise, özellikle doku biyorejenerasyonu uygulamalarında yaygın olarak tercih edilen doğal bir polimerdir [82]. İnsan vücudunda çeşitli kolajen tipleri bulunsa da, bu proteinler boyut, işlev ve dokuya özgü dağılımları açısından çeşitlilik gösterir. Bununla birlikte, tüm kolajen tipleri üç polipeptit zincirinden oluşan karakteristik bir üçlü sarmal (triple helix) yapıya sahiptir [18]. Ayrıca, kolajen moleküllerinin amino asit dizilimleri, evrimsel süreç boyunca büyük ölçüde korunmuş olup farklı türler arasında yüksek benzerlik göstermektedir; bu durum, kolajenin canlılar arasında geniş bir yapısal benzerlik göstermesini mümkün kılmaktadır [83]. Heinenam ve ark. (2007), *Chondrosia reniformis* türünden izole edilen kolajenin yapısal özelliklerini incelemiş ve elde edilen sünger kolajeninin, spektral analizler sonucunda tip I kolajenle yüksek düzeyde benzerlik gösterdiğini ortaya koymuştur [83]. Farklı bir çalışmada ise, yapılan morfolojik ve biyokimyasal analizler, sponjin matriksinin, omurgalıların ekstraselüler matriksiyle yapısal açıdan benzerlik taşıdığını göstermiştir. Özellikle, sünger iskeletindeki kolajen liflerinin yönelimi, insan trabeküler kemik dokusunda gözlemlenen lif düzenine benzerlik göstermektedir [18]. Bir başka çalışmada ise,

kızılötesi spektroskopi analizleri, sponjin fibrillerinin amino asit bileşiminin omurgalı kolajeniyle büyük ölçüde örtüştüğünü doğrulamıştır [81].

Yapısal benzerliklere dayanarak, allojenik ve ksenojenik kökenli kolajenler, doku onarımı için geliştirilen iskelet sistemlerinde önemli bir biyomalzeme olarak değerlendirilmektedir. Bu kapsamda, özellikle deniz kaynaklı kolajenler, sığır kolajenine göre daha düşük biyolojik risk taşımalarıyla öne çıkar. Örneğin, sığır kaynaklı kolajende görülebilecek süngerimsi ensefalopati gibi hastalıkların bulaşma riski, deniz kökenli alternatiflerde bulunmamaktadır [73]. Bu da onları daha güvenli ve tercih edilebilir kılmaktadır. Öte yandan, yapılan çalışmalar, sünger kolajeninin hücre-matriks etkileşimlerinde aktif rol aldığını ve hücre adezyonunu destekleyen bir yapı olarak görev yaptığını göstermektedir [81]. Özellikle deniz süngerlerinin iskeletinde bulunan kolajen liflerinin, osteoblast hücrelerinin yüzeye tutunması, hareket etmesi ve çoğalması için uygun bir mikroçevre sunduğu belirlenmiştir. Osteoblastların sponjin lifleri üzerinde kümelenmesi ise, bu liflerin kolajenöz yapıları ve yüzeylerinde bulunan doğal matriks bileşenleriyle ilişkili olarak açıklanabilir.

Sünger iskeletlerinin dikkat çekici biyolojik özellikleri, bu yapıların biyolojik uyumluluk ve fonksiyonel etkinlik bakımından incelenmesine olan ilgiyi artırmıştır [81, 84]. Bu kapsamda, Green ve ark.'nın (2003) *Spongia* türü sünger üzerinde yürüttüğü bir çalışma, sünger iskeletinde yer alan kolajen liflerinin, insan osteoprogenitör hücrelerinin tutunmasını, kümelenmesini ve çoğalmasını etkin şekilde desteklediğini göstermiştir [84]. Çalışmada yapılan histokimyasal boyamalar, sünger iskeleti üzerinde yeni kemik matriksi oluşumunun başladığını göstermektedir. Ayrıca, sponjin iskelet üzerinde kültüre edilen hücrelerde ölçülen alkalen fosfataz (ALP) aktivitesinin, kontrol grubu olarak kullanılan 2B kültür plakalarındaki hücrelere göre istatistiksel olarak anlamlı derecde daha yüksek olduğu rapor edilmiştir. Bu sonuç, sponjin yapısının osteojenik farklılaşmayı destekleyebilecek biyolojik sinyallere sahip olduğunu göstermektedir. Dikkate değer bir başka sonuç ise, osteoprogenitör hücrelerin serum içermeyen ortamda bile sponjin liflerine tutunabilmesidir. Bu durum, sünger iskeletinin doğal olarak hücre adezyonunu kolaylaştıran proteinler içerdiğine işaret etmektedir. İlginç şekilde, hücrelerin sünger liflerinin uzanımı boyunca hizalandığı da gözlemlenmiştir; bu da iskele yapısının hücresel yönlenmeyi desteklediğini göstermektedir [84].

Lin ve ark. (2011), *Callyspongiida*e familyasına ait bir deniz süngerinin osteojenik potansiyelini, primer fare osteoblast hücreleri kullanarak değerlendirmiştir [81]. Sünger iskeleti, 100–300 μm çapında gözenekler içeren kolajen lifli bir yapıya sahip olup, hücrelerin tutunması, kümelenmesi ve proliferasyonu için uygun bir mikroyapı sunmuştur. F-aktin boyamaları, osteoblast hücrelerinin kolajen liflerine başarıyla tutunduğunu göstermiştir. Ayrıca, erken osteojenik farklılaşma göstergesi olan ALP ekspresyonu 7. günde belirgin şekilde artmış, kültür süresi ilerledikçe kademeli olarak azalmıştır. Von Kossa boyamaları sonucunda, kültürün 21. gününde mineralizasyon nodüllerinin oluştuğu gözlemlenmiştir. Ayrıca, osteoblastlara özgü genler olan osteokalsin ve osteopontin ifadeleri, kültür süresi boyunca tespit edilmiştir [81]. Sonuç olarak bu çalışma ile, söz konusu deniz süngerinin hücre aktivitesini artırma ve kemik benzeri mineral oluşumunu destekleme kapasitesi sayesinde, kemik doku mühendisliğinde alternatif bir doğal iskele malzemesi olarak değerlendirilebileceğini ortaya konmuştur.

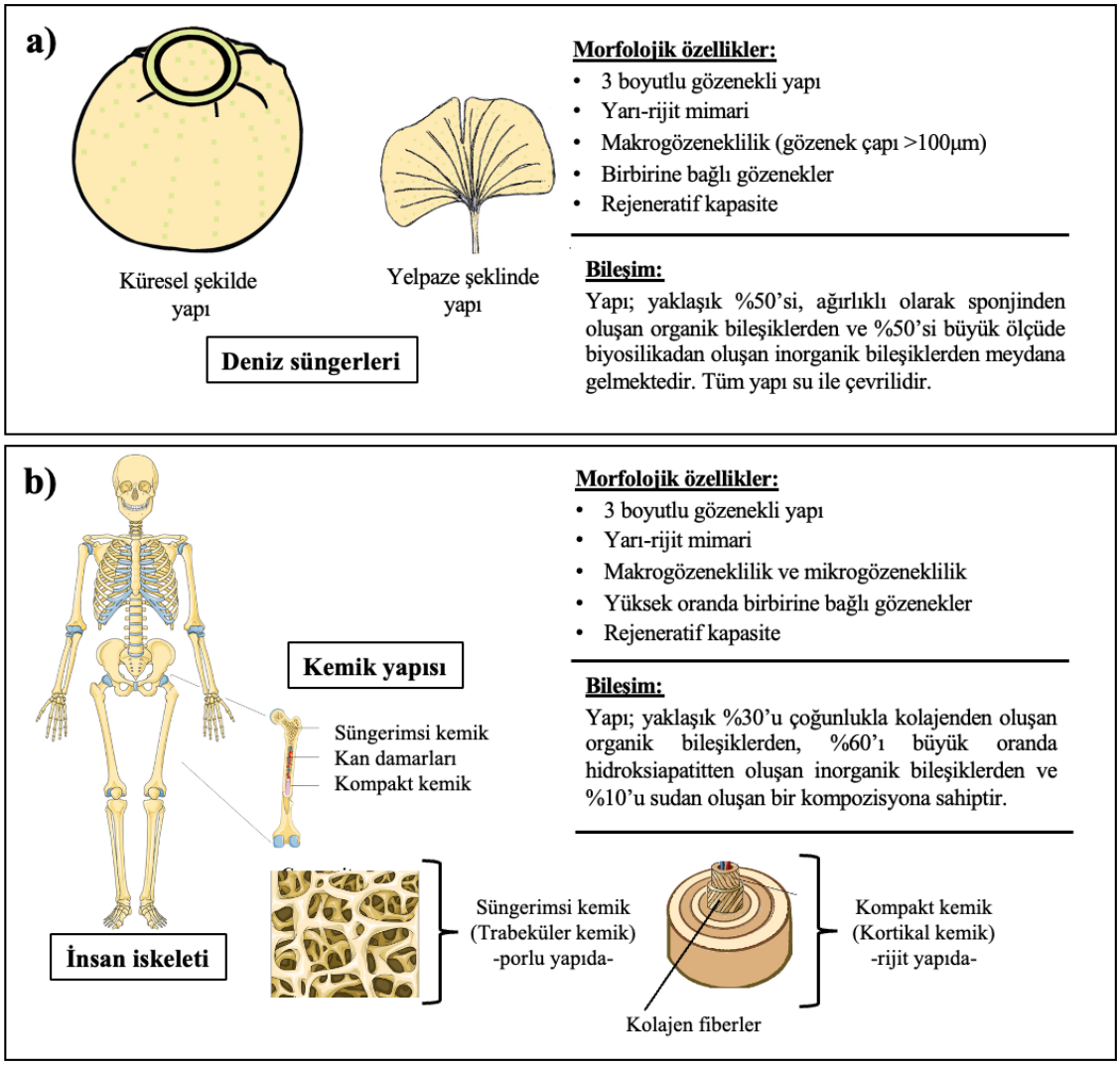
Pallella ve ark. (2011), Thunnus obesus balık kemiğinden elde edilen hidroksiapatit (HAp), kitosan (Chi) ve *Ircinia fusca* deniz süngeri kolajeninden (MSCol) oluşan üç bileşenli bir iskele geliştirmiştir) [85]. Dondurarak kurutma yöntemiyle hazırlanan iskeleler, taramalı elektron mikroskobu (SEM) ve optik mikroskop ile incelenmiş; HAp ve MSCol'un kitosan matriksine homojen dağıldığı ve 50–180 μm aralığında bağlantılı gözenekler oluşturduğu gösterilmiştir. MTT ve Hoechst boyama ile yapılan *in vitro* testlerde, MG63 osteosarkom hücrelerinin bu kompozit iskelelerde saf kitosana göre daha iyi proliferasyon gösterdiği saptanmıştır [85]. Bu sonuçlar, Chi-HAp-MSCol kompozitinin kemik matriksi onarımında umut vadeden bir biyomalzeme olduğunu göstermiştir.

Her ne kadar deniz süngerlerinin osteojenik potansiyele sahip olduğu bilinse de, bu yapıların *in vivo* etkilerine dair literatürdeki veriler sınırlıdır. Bu eksikliği ele alan Nandi ve ark. (2015), *Biemna fortis* türü deniz süngerinden elde ettikleri örnekleri kristobalit formuna dönüştürmüştür. *İn vivo* kemik iyileşme süreci, radyolojik görüntüleme, histolojik analizler ve SEM gibi yöntemlerle değerlendirilmiştir. SEM analizleri, sünger iskeletinin 10–220 μm arasında değişen gözeneklere sahip, kolajen liflerinden oluşan

bağlantılı bir ağ yapısı sergilediğini ortaya koymuştur. MTT sonuçları, bu yapının hücreler açısından toksik olmadığını, biyouyumlu olduğunu göstermiştir. Ayrıca, radyolojik, histolojik bulgular, sünger iskeletinin kemik doku oluşumunu etkin biçimde desteklediğini doğrulamış ve neticede bu doğal malzemenin kemik rejenerasyonunu destekleyebilecek etkili bir biyomalzeme adayı olduğu sonucuna varılmıştır [12].

2.4. Süngerlerin Doku Mühendisliğinde Kullanımı

Süngerler, suyun vücutları boyunca verimli bir şekilde dolaşmasını sağlayan bağlantılı gözenekli yapılarıyla, yani akifer mimarileriyle tanımlanır. Bu doğal mimari, kemik dokunun gözenekliliğini başarılı şekilde taklit eder [86]. Nitekim süngerlerin morfolojik, topografik ve fiziksel özellikleri, özellikle ECM düzeyinde, kemik dokusuyla çarpıcı paralellikler göstermektedir (**Şekil 2.2**) [87].



Şekil 2.2. a) Deniz süngerlerinin ve b) kemiğin yapısı [87]'den değiştirilerek.

Yüksek gözeneklilik, uygun gözenek boyutu ve bağlantılı yapı, damar oluşumu ve hücresel göçü destekleyerek kemik ile greft materyali arasındaki biyolojik entegrasyonu kolaylaştırır. Bu bağlamda, Barros ve ark. (2014), *Petrosia ficiformis* türü deniz süngerini mikro-CT ile incelemiş ve yapının %73 gözeneklilik ile ortalama 364 µm gözenek boyutuna sahip olduğunu bildirmiştir [88]. Benzer şekilde, Cunningham ve ark. (2010) da deniz süngerlerini, seramik esaslı doku mühendisliği iskelelerinin üretiminde potansiyel bir malzeme olarak değerlendirmiştir [89]. *Spongia agaricina* süngerinden elde edilen seramik iskelelerin %56–61 gözeneklilik, %83 oranında 100–500 µm aralığında gözenek boyutu (ortalama 349 µm) ve %99,92 bağlantılılık sergilediği rapor edilmiştir. Tüm bu yapısal özelliklerin, kemik doku mühendisliği uygulamaları için son derece elverişli olduğu vurgulanmıştır [89].

Uygun yapısal özelliklerinin yanı sıra, sünger iskeletinde bulunan spiküller, yapıya içsel bir sertlik ve mekanik dayanıklılık kazandırır; bu da süngerleri kemik benzeri biyomedikal uygulamalar için avantajlı bir malzeme haline getirir [90]. Nitekim bazı çalışmalar, süngerlerin yüksek stres koşulları altında dahi esnekliklerini ve dayanıklılıklarını koruyabildiğini ortaya koymuştur [91]. Bu bağlamda Aluma ve ark. (2011), *Cinachyrella levantinensis* türü deniz süngerine yönelik mekanik testler gerçekleştirerek iskelet yapısının işlevselliğini değerlendirmiştir [92]. Silindirik sünger numunelerine uygulanan basınç testleri, spiküllerin yük taşıma kapasitesinin artırılması, yapısal bütünlüğün korunması ve genel dayanıklılığın sürdürülmesinde kritik bir rol oynadığını göstermiştir [92]. Ancak, farklı deniz süngeri türleri arasında yapısal özelliklerin değişkenlik göstermesi, kemik dokusunu en iyi taklit edebilecek optimum matriksin belirlenmesini güçleştirmektedir. Bu nedenle, daha ideal bir yapı elde edebilmek için ileri düzeyde çalışmalara ihtiyaç duyulmaktadır.

Literatürde deniz süngerlerinin osteojenik etkilerini inceleyen çok sayıda çalışma mevcuttur. **Çizelge 2.2**'de, bu çalışmalardan elde edilen *in vitro* ve *in vivo* bulgular derlenerek özetlenmiştir [11].

Çizelge 2.2. Deniz süngerlerinin osteojenik potansiyeline yönelik *in vitro* ve *in vivo* çalışmalar ([11]'den değiştirilerek).

Tür	Bileşim	Model sistem	Sonuç
Spongia sp	Sponjinden oluşan iskelet	Kemik iliği hücreleri (*in vitro*)	Sünger iskeleti, insan osteoprogenitör hücrelerinin tutunmasını, büyümesini ve invazyonunu desteklemiştir. Alkalen fosfataz ve tip I kolajen için yapılan histokimyasal boyamalar, kemik matriksi oluşumunu göstermiştir [84].
Suberites domuncula	Biyosilika	SaOS-2 (*in vitro*)	Biyosilika (silikatein) ile modifiye edilmiş yüzeylerde artmış kalsiyum-fosfat birikimi gözlenmiştir [93].
Suberites domuncula	Silika bazlı bileşenler (Sodyum silikat, tetraetil ortosilikat [TEOS], silika nanoparçacıkları)	SaOS-2 (*in vitro*)	Mine matriksi ile ilişkili genlerin ekspresyonunun artmasıyla birlikte, hidroksiapatit (HAp) birikiminde de belirgin bir artış gözlemlenmiştir [94].
Suberites domuncula	Biyosilika	SaOS-2 (*in vitro*)	Biyosilika ile muamele edilen hücrelerde OPG ekspresyonu artarken, RANKL ekspresyonunda herhangi bir değişiklik gözlemlenmemiştir [95].
Suberites domuncula	Biyosilika	SaOS-2 (*in vitro*)	HAp nodüllerinin oluşumunda ve BMP2 ekspresyonunda artış gözlemlenmiştir [96].
Callyspongiidae sp.	Kolajenöz lifli sünger iskelet	Fare primer osteoblastlar (*in vitro*)	Hücrelerin kolajen liflerinin yüzeyine başarıyla tutunduğu ve mineralizasyon nodülleri oluşturduğu gözlenmiştir. Bunun yanı sıra, osteokalsin ve osteopontin gibi osteoblast belirteçlerinin ekspresyonunda da artış tespit edilmiştir [81].
Ircinia fusca	Kitosan (Chi), Thunnus obesus balığı kemiğinden elde edilen hidroksiapatit (HAp) ve Ircinia fusca deniz süngerinden izole edilen kolajeni (MSCol) içeren üçlü kompozit iskele (Chi-HAp-MSCol)	MG63 (*in vitro*)	Kompozit iskelelerde, saf kitosana kıyasla hücre proliferasyonunda artış gözlemlenmiştir [85].

OPG: Osteoprotegerin; RANKL: Nükleer Faktör Kappa-B Reseptör Aktivatörü Ligandı; BMP2: Kemik Morfogenetik Proteini-2

Çizelge 2.2. Deniz süngerlerinin osteojenik potansiyeline yönelik *in vitro* ve *in vivo* çalışmalar (devamı)

Tür	Bileşim	Model sistem	Sonuç
Suberites domuncula	Silikat	SaOS-2 ve RAW 264.7 *(in vitro)*	SaOS-2 hücreleri, OPG geninin RANKL genine kıyasla daha yüksek düzeyde ifade edilmesini sağlayan diferansiyel gen ekspresyon kapasitesini korumuştur. Özellikle TRAP(+) RAW 264.7 hücrelerinin sayısında belirgin bir azalma gözlemlenmiş, bu da osteoklastogenezisin anlamlı şekilde baskılanmasına yol açmıştır [97].
Petrosia ficiformis	Kalsinasyon işleminden geçmiş süngerler	SaOS-2 (*in vitro*)	Hücreler, biyoseramik yüzeylerde başarıyla tutunarak büyüme ve yayılma göstermiştir [88].
Suberites domuncula	Orto-silikattan ve polifosfattan (polyP) enzimatik olarak sentezlenen biyosilika	İnsan multipotent stromal hücreleri (hMSC) *(in vitro)*	Biyosilika ve polyP, insan mezenkimal kök hücrelerinin büyüme ve farklılaşmasını desteklemiş; osteojenik hücrelerde mineralizasyonu artırmış ve (BMP-2 ile ALP ekspresyonunu artırmıştır [98]
Suberites domuncula	Silika/silikatein ile takviye edilmiş β-TCP mikroküreler	SaOS-2 *(in vitro ve in vivo)*	Silika ve silikatein katkılı β-TCP mikrokürelerin, SaOS-2 hücreleri tarafından gerçekleştirilen mineralizasyonu belirgin şekilde teşvik ettiği ve kemik doku rejenerasyonunu olumlu yönde etkilediği belirlenmiştir [99].
Biemna fortis	Büyüme faktörleri (IGF-1 ve BMP-2) ile yüklü/yüksüz kolajenöz lifli sünger iskelet	*(in vivo)*	Kemik dokusunun güçlü ve organize bir şekilde oluştuğu gözlemlenmiştir [12].

SaOS-2 (Sarcoma Osteogenic-2): İnsan osteosarkom hücre hattı; MG63: İnsan osteosarkom hücre hattı; RAW 264.7: Fare kökenli makrofaj hücre hattı

Her ne kadar yapılan çalışmalar deniz süngerlerinin sert doku mühendisliği alanında kayda değer bir potansiyele sahip olduğunu ortaya koysa da, literatürde sünger kökenli iskelelerin hem sert hem de yumuşak doku mühendisliği uygulamalarında eş zamanlı kullanımlarını ele alan kapsamlı bir çalışmanın literatürde bulunmadığı dikkat çekmektedir. Süngerlerin sahip olduğu doğal gözenekli mimari, yüksek yüzey alanı, biyouyumluluk ve biyobozunurluk gibi avantajlar, onları sadece tek bir doku türü için değil, çoklu doku rejenerasyonu için de potansiyel adaylar haline getirmektedir. Ancak, bu potansiyel henüz bilimsel olarak yeterince araştırılmamıştır. Tez çalışmasında, *Demonspongiae* sınıfına ait, biyolojik ve mekanik özellikleriyle öne çıkan *Sarcotragus foetidus* süngeri, hem yumuşak hem de sert doku mühendisliği uygulamaları açısından değerlendirilmiş; böylece literatürdeki bu önemli boşluğun doldurulması ve sünger bazlı biyomalzemelere dair daha bütüncül bir yaklaşım geliştirilmesi amaçlanmıştır.

2.5. *Sarcotragus foetidus* Deniz Süngeri

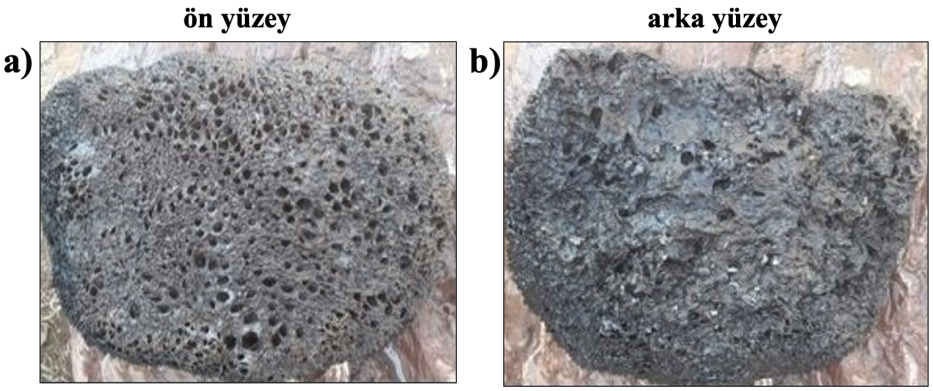
Tez çalışmasında kullanılan *Sarcotragus foetidus* süngeri, Porifera filumuna ve *Demospongiae* sınıfına ait olup, taksonomik sınıflandırması **Çizelge 2.3**'te yer almaktadır.

Çizelge 2.3. *Sarcotragus foetidus* süngerinin taksonomik sınıflandırması.

Taksonomik sınıflandırma	
Alem (Regnum)	Animalia (Hayvanlar)
Şube (Phylum)	Porifera (Süngerler)
Sınıf (Classis)	*Demospongiae*
Takım (Ordo)	*Dictyoceratida*
Aile (Familia)	*Irciniidae*
Cins (Genus)	*Sarcotragus*
Tür (Species)	*Sarcotragus foetidus*

Sarcotragus foetidus, Akdeniz Havzası'nda yaygın olarak bulunan, *Demospongiae* sınıfına ait bir deniz süngeridir. Bu tür, üç boyutlu sponjin temelli iskelet yapısıyla dikkat

çeker. İskelet sistemi; nanofibröz kolajen lifleri ve hiyerarşik olarak organize olmuş skleroproteinlerden oluşan yapısı sayesinde, bazı diğer sünger türlerine kıyasla yüksek mekanik dayanım sergilemektedir [16, 17]. Yapısında yer alan birincil ve ikincil lifler, bunlara eşlik eden ince filamentlerle birlikte, 100–300 µm aralığında gözenek çaplarına sahip, oldukça gözenekli ve bağlantılı bir ağ oluşturmaktadır. Bu mikro yapı, hücresel adezyon, göç ve anjiyogenez açısından elverişli bir ortam sağlar. İskeleti oluşturan sponjin lifleri, yüksek elastikiyet, dayanıklılık ve biyobozunurluk özelliklerine sahiptir. Buna ek olarak, sponjin liflerinin morfolojik düzeni, insan trabeküler kemiğinde görülen lif yönelimine benzerlik göstererek, yapıya hücre dışı matriksi (ECM) taklit eden biyomimetik bir karakter kazandırmaktadır [16, 18]. Bu yapısal ve biyofonksiyonel özellikleri sayesinde *Sarcotragus foetidus*, kemik doku mühendisliği uygulamaları için güçlü bir iskele adayı olarak değerlendirilmektedir [11, 18, 19]. *Sarcotragus foetidus* süngerine ait farklı açılardan elde edilen makroskobik görüntüler ise **Şekil 2.3**'te verilmiştir.



Şekil 2.3. *Sarcotragus foetidus* süngerinin farklı açılardaki makroskobik kamera görüntüsü a) ön yüzey, b) arka yüzey.

2021 yılında yayımlanan bir çalışmada, *Sarcotragus foetidus* ve *Ircinia oros* türlerinden kolajen filamentleri ilk kez izole edilerek biyokimyasal açıdan detaylı şekilde karakterize edilmiş ve rejeneratif tıpta kullanım potansiyelleri değerlendirilmiştir. Bu çalışmada, *Sarcotragus foetidus* kaynaklı 2B kolajen membranların, ticari olarak kullanılan memeli kökenli kolajen membranlara kıyasla daha yüksek termal stabiliteye sahip olduğu ve kolajenaz gibi yıkıcı enzimlere karşı daha dayanıklı olduğu belirlenmiştir. Ayrıca bu kolajen membranlar, belirgin antioksidan özellikler sergilemiş ve L929 fibroblastları ile HaCaT keratinosit hücreleri üzerinde yüksek biyouyumluluk göstermiştir. Gen

ekspresyon analizleri ile, bu yapıların ekstraselüler matriksle ilişkili genlerin ekspresyonlarında anlamlı düzeyde artış gözlemlenmiştir [16].

Sarcotragus foetidus'un kimyasal yapısı ve biyolojik aktivitelerine yönelik yapılan bir başka çalışmada, bu sünger türünün antimikrobiyal ve antikanser potansiyeli incelenmiştir. Araştırma sonuçlarına göre, *Sarcotragus foetidus* lipid açısından zengin metabolitler üretmekte ve bu bileşikler, özellikle metisiline dirençli *Staphylococcus aureus* (MRSA) gibi patojen bakterilere karşı güçlü antibakteriyel aktivite göstermektedir. Ayrıca, insan kolorektal karsinom hücre hattı (HCT-116) üzerinde yürütülen analizlerde, hem doğal ortamdan toplanan hem de laboratuvar koşullarında yetiştirilen *Sarcotragus foetidus* örneklerinin benzer düzeyde antikanser etkiler sergilediği bildirilmiştir [19].

Bu bulgular, *Sarcotragus foetidus* kaynaklı kolajen filamentlerin ve metabolitlerin, rejeneratif tıp ve doku mühendisliği uygulamalarında değerlendirilebilecek potansiyel biyomalzeme adayları olduğunu göstermektedir.

Sarcotragus foetidus'un doku mühendisliğinde doğrudan kullanımına yönelik literatürde sınırlı sayıda çalışma bulunmakla birlikte, mevcut çalışmalar genellikle süngerin radyoaktif metallerin biyosorbsiyonu, mikrobiyal taşıyıcı özellikleri ile deniz ve kıyı ekosistemlerindeki dağılımı gibi çevresel ve ekolojik özelliklerine odaklanmaktadır [100-102]. Ancak, sunulan tez kapsamında *Sarcotragus foetidus*'un kemik rejenerasyonunda iskele malzemesi olarak kullanılma potansiyeli ilk kez araştırılarak, literatürdeki önemli bir boşluğun giderilmesi hedeflenmiştir.

Kemik matriksi, hidroksiapatit (HAp) kristallerinden oluşan mineral faz ile glikoproteinler, proteoglikanlar ve sialoproteinler gibi bileşenleri içeren organik fazdan meydana gelmektedir. Bu iki fazın, özellikle tip I kolajen lifleri aracılığıyla bir araya gelmesiyle, güçlü ve kristalize bir yapı oluşur. Tip I kolajen, kemik dokusunda en yaygın bulunan protein olup, dokunun mekanik dayanıklılığında temel bir rol üstlenmektedir [4]. Saf hidroksiapatit, kimyasal olarak $Ca_{10}(PO_4)_6(OH)_2$ formülü ile tanımlanır ve kemik mineralinin başlıca inorganik bileşeni (yaklaşık %60'ı) olarak kabul edilir [87]. HAp, yüksek biyouyumluluğu ve osteokondüktif özellikleri sayesinde, özellikle kemik doku

mühendisliğinde iskele kaplamaları ve kemik defekti onarımları gibi birçok biyomedikal uygulamada yaygın biçimde tercih edilmektedir [21-23]. Biyomimetik HAp kaplamaları, kemik doku mühendisliği uygulamalarında iskelelerin osteojenik özelliklerini artırmak amacıyla yaygın olarak kullanılmaktadır. Bu doğrultuda, iskelelerin yüzeyine HAp kaplamak için plazma püskürtme, döndürerek kaplama, plazma gaz aşındırma, elektron ışını biriktirme, plazma daldırmalı iyon implantasyonu ve mikrodalga destekli kaplama gibi çeşitli yöntemler geliştirilmiştir. Bu yöntemler arasında, mikrodalga destekli kaplama, düşük işlem sıcaklığı, biyolojik partiküllerin homojen dağılımını sağlaması, uygulama kolaylığı ve ekonomik avantajları sayesinde öne çıkmaktadır [24, 27].

Literatürde, çinko (Zn), demir (Fe), gümüş (Ag) ve özellikle bor (B) gibi çeşitli iyon katkılarının, HAp kaplı iskelelerin kimyasal ve fiziksel özellikleri üzerindeki etkilerini araştıran çok sayıda çalışma bulunmaktadır [103, 104]. Bu katkıların, biyomimetik HAp kaplı iskelelerin biyolojik performansını artırarak hücre adezyonu, proliferasyonu ve osteojenik farklılaşma gibi süreçleri desteklediği bildirilmektedir. Bu katkılar arasında bor, hem insanlar hem de hayvanlar için gerekli bir eser element olması nedeniyle doku mühendisliği alanında özel bir ilgi görmektedir. Borun hormon metabolizması, hücre zarı fonksiyonlarının düzenlenmesi [105], enzim aktivitelerinin kontrolü, yara iyileşmesi [106] ve sert doku rejenerasyonu [25, 26, 107] gibi çeşitli biyolojik süreçlerde rol oynadığı bilinmektedir. Borun sahip olduğu çok yönlü biyolojik etkiler nedeniyle, bor katkılı biyomalzemelerin özellikle kemik doku mühendisliği uygulamalarında önemli bir potansiyele sahip olduğu belirtilmektedir.

Literatürde, farklı *in vitro* ve *in vivo* modellerde yapılan çalışmalar, bor katkısının osteojenik farklılaşmayı anlamlı düzeyde artırdığını göstermektedir [108, 109]. Özellikle bor katkılı hidroksiapatit (B-HAp), hücre canlılığını artırmakta ve mezenkimal kök hücrelerin ya da osteoprogenitör hücrelerin kemik dokuya özgü yönlendirilmiş farklılaşmasını desteklemektedir [27, 110, 111]. Borun kemik hücreleri üzerindeki biyolojik etkilerini hangi mekanizmalar üzerinden gerçekleştirdiği henüz tam olarak aydınlatılamamıştır. Ancak bazı çalışmalar, borun osteoblastlara özgü gen ekspresyonunu ve ekstraselüler matriks mineralizasyonunu düzenlemede önemli rol oynayan Wnt/β-katenin ve MAPK (Mitojen Aktive Protein Kinazı) gibi sinyal yolaklarını modüle ettiğini göstermektedir [112, 113].

Bu bilgiler doğrultusunda, sunulan tez çalışmasında *Sarcotragus foetidus* sünger iskeletinin, B-HAp ile kaplanarak hem yapısal bütünlüğünün hem de osteoindüktif potansiyelinin artırılması amaçlanmıştır. Geliştirilen biyohibrit iskelenin, doğal kemik dokusunu mükemmel şekilde taklit eden, tip I kolajen benzeri sponjin kaynaklı mimarisi sayesinde hücre adezyonu, proliferasyonu ve osteojenik farklılaşmayı etkin biçimde desteklemesi; ayrıca B-HAp kaplaması ile bu etkinin hücre içi sinyal yolakları üzerinden pekiştirilerek osteojenik farklılaşmanın belirgin biçimde artırılması öngörülmektedir. Bu bağlamda, çalışmanın temel hipotezi, sponjin temelli iskele yapısının kemik rejenerasyonuna yönelik biyofonksiyonel bir matriks sunduğu ve B-HAp kaplaması ile bu matriksin osteojenik etkinliğinin anlamlı düzeyde artırılabileceğidir.

2.6. Yumuşak Doku Mühendisliği

Yumuşak doku, geniş kapsamlı bir terim olup yağ dokusu, deri, tendon, kas, eklem kıkırdağı, sinirler, fasya, intervertebral disk, sinovyum, eklem kapsülü ve kan damarları gibi çeşitli dokuları kapsamaktadır [114]. Bu dokular genellikle vücut yapıları ve organlarını çevreleme, destekleme veya birbirine bağlama işlevlerini üstlenir.
Yumuşak dokular fizyolojik olarak yüksek bir rejenerasyon kapasitesine sahiptir. Ancak bu kapasite, büyük hacimli doku kayıplarında - örneğin tümör rezeksiyonları, travmatik yaralanmalar veya enfeksiyonlara bağlı tahribatlarda - yetersiz kalabilir. Bu tür defektlerin veya hastalıkların tedavisinde halen en yaygın kullanılan yöntem, otolog doku naklidir. Ancak, otolog dokunun vücut tarafından hızla emilerek hacmini kaybetme eğiliminde olması, bu yöntemin önemli bir dezavantajını oluşturmaktadır. Nitekim nakledilen yumuşak dokuların yalnızca %40–60'ı canlılığını koruyabilmektedir [115-117]. Ayrıca, verici bölgede oluşabilecek immün yanıtlar ve morbidite riski de otolog naklin yaygın kullanımını sınırlayan diğer önemli faktörlerdir [118].

Bu sınırlamaları aşmak amacıyla geliştirilen doku mühendisliği yaklaşımı, hasar görmüş veya hastalıklı yumuşak dokuların ve organların onarımı ile yeniden oluşturulmasında alternatif biyolojik çözümler sunan yeni ve umut vadeden bir yöntem olarak öne çıkmaktadır [119]. Bu yaklaşımda özgün görünüme ve işlevlere sahip olan iskele yapıları, yapay bir hücre dışı matriks olarak görev yapar ve hücre büyümesi ile farklılaşmasını

desteklemede hayati bir rol oynar. Biyolojik yumuşak dokuların doğal hücre dışı matriksi, genellikle karmaşık bir bileşim ve mikro yapıya sahip lifli bir ağ yapısında bulunur. Yumuşak dokuların temel yapısal bileşenlerini ise elastin ve kolajen lifleri oluşturur [120, 121]. Elastik proteinler, en belirgin doğrusal elastikiyete sahipken; kolajen lifleri, dokunun fiziksel ve mekanik özelliklerini doğrudan etkileyen ana yük taşıyıcı elemanlardır.

Yumuşak dokular (ör. cilt, kas, damarlar, sinir dokusu) yüksek esneklik ve elastikiyet gerektiren sistemlerdir; bu nedenle deniz süngerlerinin esnek ve üç boyutlu lifsel yapıları, bu tür dokuların yeniden oluşturulmasında avantaj sağlamaktadır. Ayrıca, deniz süngerlerinin gözenek çaplarının 100–300 µm aralığında olması, hücresel infiltrasyon, vaskülarizasyon ve besin-metabolit difüzyonu açısından da elverişli bir mikroçevre sunar [4]. Tüm bu özelliklere ek olarak, deniz süngerlerinin yenilenebilir ve çevre dostu kaynaklar olması, bu biyomalzemelerin sürdürülebilir doku mühendisliği uygulamaları için önemli bir avantaj sunduğunu göstermektedir.

Deniz süngerlerinden elde edilen kolajen ve sponjin yapılar, yumuşak doku mühendisliği alanında dikkat çeken doğal biyomalzemelerdendir. Literatürde, deniz süngerlerinden izole edilen bu proteinlerin, biyouyumlulukları ve doğal fibröz yapıları sayesinde hücresel proliferasyon ve doku onarımı süreçlerini desteklediği gösterilmiştir. Örneğin, *Chondrosia reniformis* türü süngerden izole edilen kolajen, glikozaminoglikan (GAG)-benzeri bileşikler içeren ve kendini onarabilen doğal bir hidrojel formuna dönüştürülmüş; yüksek su tutma kapasitesi ve viskoelastik özellikleri sayesinde enjeksiyonla uygulanabilen sistemler için uygun bulunmuştur. Bu yapılar, hücre-matriks etkileşimlerini desteklemiş ve yumuşak doku rejenerasyonu için biyolojik açıdan işlevsel bir ortam sunmuştur [122]. Benzer şekilde, *Demospongiae* sınıfına ait deniz süngerlerinden elde edilen kolajen filamentlerle hazırlanan membranların, yüksek termal ve mekanik stabiliteye sahip olduğu, enzimatik ortamlarda dayanıklılık gösterdiği ve antioksidan özellik taşıdığı bildirilmiştir. Ayrıca, *in vitro* çalışmalarda bu membranların fibroblast ve keratinosit hücreleriyle yüksek biyouyumluluk sergilediği; hücre yapışması, proliferasyonu ve ECM ile ilişkili gen ekspresyonlarını anlamlı düzeyde artırdığı gözlemlenmiştir [16].

Literatürdeki bu mevcut çalışmalardan yola çıkarak, tez kapsamında *Sarcotragus foetidus* süngerinden kolajen izole edilesi ve bu kolajenden, biyomürekkep olarak kullanılmak üzere hidrojel sistemlerin geliştirilmesi hedeflenmiştir. Bu sistemlerin, hücre canlılığını destekleyen, biyobozunur özellikleri ve biyouyumlulukları sayesinde 3B biyoyazıcı teknolojilerinde yumuşak doku mühendisliği için biyomürekkep olarak kullanılmaya uygun olduğu düşünülmektedir.

2.7. Yumuşak Doku Kanserleri

Yumuşak doku tümörleri, gelişim gösterdikleri hücre ve doku türüne bağlı olarak sınıflandırılan, oldukça çeşitlilik gösteren bir tümör grubudur. Bu tümörler genellikle köken aldıkları spesifik yumuşak dokuya göre adlandırılır; örneğin bağ dokusu, kas, yağ, damar veya sinir dokusundan türeyebilirler. Klinik ve patolojik özelliklerine göre iki ana gruba ayrılırlar: benign (iyi huylu) ve malign (kötü huylu) tümörler [123].

Benign yumuşak doku tümörleri, morfolojik olarak kaynaklandıkları normal dokulara büyük ölçüde benzerlik gösterir ve sınırlı hücre çoğalma kapasitesine sahiptir. Genellikle çevre dokulara agresif şekilde yayılmazlar ve uzak organlara metastaz yapma riski taşımazlar. Bununla birlikte, bazı benign tümörler lokal invazyon potansiyeline sahiptir ve bulundukları bölgede çevre dokulara baskı yaparak ağrı, hareket kısıtlılığı veya fonksiyon kaybı gibi klinik sorunlara yol açabilir. Ayrıca, tümörün cerrahi olarak çıkarılmasından sonra bile düşük bir oranda tekrarlama riski söz konusu olabilir [124]. Bu nedenle, benign yumuşak doku tümörlerinin tedavi planlamasında; tümörün büyüklüğü, yerleşim yeri ve potansiyel fonksiyonel etkileri dikkate alınarak bireyselleştirilmiş ve dikkatli bir yaklaşım benimsenmelidir.

Malign yumuşak doku tümörleri, sınırsız ve kontrol dışı hücre çoğalması, çevre dokulara ve organlara yayılarak metastaz yapabilme özellikleri ile tanımlanır. Bu tümörlerin büyük çoğunluğu "sarkom" olarak adlandırılan kötü huylu neoplazmlar grubuna girer. Sarkomlar, embriyonik mezoderm kökenli bağ doku hücrelerinden gelişir ve en sık ekstremitelerde, retroperitoneal bölgede ve baş-boyun bölgesinde görülür. Bu tümörler genellikle hızlı büyür, çevresindeki dokulara yayılır ve zamanında tedavi edilmezse metastaz yaparak yaşamı tehdit edebilir. Sarkomların seyri; tümörün histolojik alt tipi,

evresi, büyüme hızı ve metastaz varlığı gibi faktörlere bağlı olarak değişiklik gösterir [125].

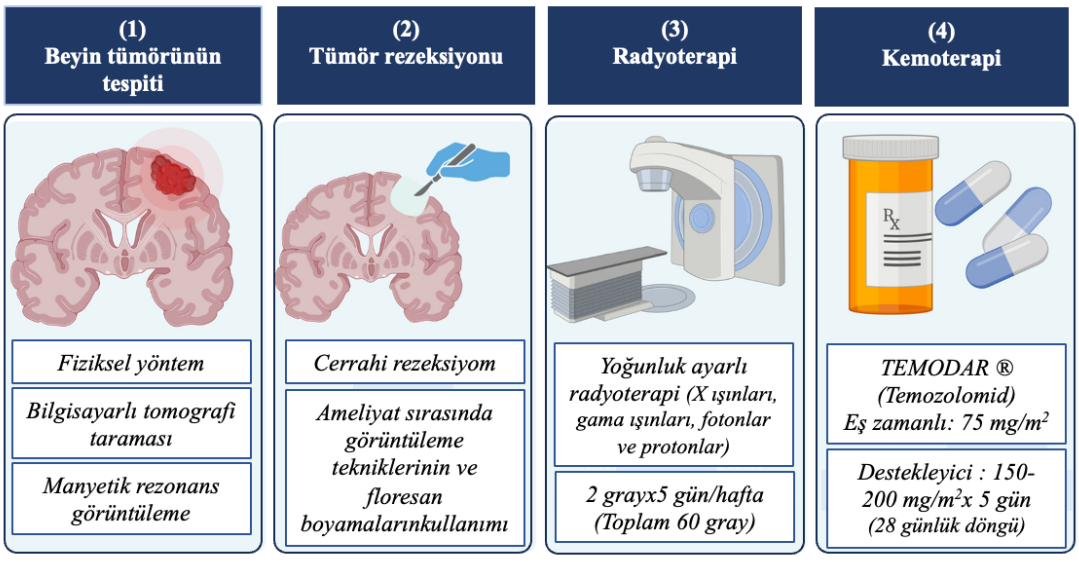
2.7.1. Beyin Kanseri - Glioblastoma Multiforme

Glioblastoma veya glioblastoma multiforme (GBM), beyindeki neoplastik glial hücrelerden - oligodendrositler, astrositler ve ependimal hücreler - kaynaklanan tümörlerden biri olan gliomların yüksek derecede malign bir formudur [126]. Dünya Sağlık Örgütü'ne göre GBM, merkezi sinir sistemi (MSS) malignitelerinin en agresif formunu temsil eden evre IV beyin tümörü olarak sınıflandırılmaktadır [127]. GBM, aynı zamanda en yaygın malign beyin tümörlerinden biri olup, her yıl 100 000 kişide yaklaşık 3,19 oranında görülmektedir [128].

GBM, oldukça heterojen bir genetik yapıya sahiptir. Bu genetik çeşitlilik, tümörün biyolojik davranışını ve tedaviye yanıtını önemli ölçüde etkilemektedir. Histopatolojik açıdan değerlendirildiğinde, GBM yüksek mitotik aktivite, yoğun hücresel proliferasyon, belirgin anjiyogenez ve yaygın nekroz gibi agresif özellikler sergilemektedir. Tümör hücrelerinin morfolojik çeşitliliği - farklı şekil ve büyüklüklerde olmaları "multiforme" (çok biçimli) ifadesiyle tanımlanmasının temel nedenidir [129]. GBM, genellikle MSS içerisinde lokal invazyon gösterir; sistemik yayılım ya da uzak organ metastazı ise nadiren görülmektedir [130].

GBM, tedaviye dirençli yapısı ve agresif biyolojik davranışları nedeniyle olumsuz klinik seyirle ilişkilendirilen bazı karakteristik özellikler sergilemektedir. Bunlardan ilki, hızla antikanser tedavilere direnç geliştirebilen çok sayıda malign hücre içermesidir. İkinci olarak, glioma hücreleri "yengeç kıskacı" benzeri bir yayılma modeli sergileyerek çevredeki sağlıklı dokulara sızar; bu durum, tümörle sağlam doku arasındaki sınırların belirsizleşmesine neden olur ve cerrahi sırasında tüm tümörün eksiksiz çıkarılmasını oldukça zorlaştırır. Üçüncü olarak, cerrahi müdahalenin kendisi kalan tümör hücrelerinin büyümesini tetikleyebilir. Son olarak, kan–beyin tümör bariyeri (BBTB), çoğu kemoterapi ilacının beyin tümörüne ulaşmasını engeller; bu da tedavi etkinliğinin azalmasına ve ilaç direncinin gelişmesine yol açar [131]. Tüm bu nedenlerden dolayı, GBM hastalarında ortalama sağkalım süresi yaklaşık 1 yıl ile sınırlıdır ve yalnızca hastaların %5'i 5 yıl veya daha uzun süre hayatta kalabilmektedir [132].

GBM tedavisinde geleneksel yaklaşım; patolojik tanı amacıyla yapılan biyopsiyi takiben, erişilebilir tümör dokusunun cerrahi olarak çıkarılması, ardından radyoterapi ve kemoterapi uygulanması şeklindedir [133] (**Şekil 2.4**). Ancak, bu tedaviye rağmen prognoz oldukça kötüdür. Yalnızca cerrahi müdahale uygulanan hastalarda ortalama sağkalım süresi yaklaşık 6 aydır ve sadece %7,5'i iki yıl hayatta kalabilmektedir. Cerrahiyi takiben uygulanan radyoterapi sağkalımı ortalama 9 aya kadar uzatsa da, sistemik kemoterapiler sınırlı etkinlik göstermektedir [134, 135]. Nöroradyoloji alanlarında kaydedilen teknolojik gelişmelere rağmen, GBM hastalarının uzun dönem sağkalımı anlamlı ölçüde artırılamamıştır. Bu nedenle, mevcut tedavilere alternatif olacak yeni terapötik stratejilere ve yenilikçi yaklaşımlara ihtiyaç duyulmaktadır. Tedavinin geliştirilmesinde çeşitli engeller bulunmaktadır. Daha geniş tümör rezeksiyonları, işlevsel beyin dokusunun çıkarılma riskini artırarak ciddi nörolojik bozukluklara ve kalıcı hasara neden olabilir. Benzer şekilde, radyasyon dozunun veya ışınlanan alanın artırılması, kabul edilemeyecek düzeyde akut ve kronik yan etkilere yol açabilir. Kemoterapinin etkinliğinin artırılabilmesi içinse daha güçlü ilaçlara veya mevcut ilaçların beyin tümörlerine etkin şekilde ulaştırılmasını sağlayacak yenilikçi taşıma sistemlerine ihtiyaç vardır [136].



Şekil 2.4. Standart Tedavi - SOC - olarak kabul edilen Stupp protokolüne göre tedavi yöntemi ([137]'den değiştirilerek).

Kan-beyin bariyeri (BBB), beyin tümörlerinin sistemik tedavisinde karşılaşılan en büyük engeli oluşturmaktadır. BBB, beyin ve omurilik kılcal damarlarını çevreleyen endotel hücrelerinden ve perisitler, astrositler, mikroglia hücreleri ve düz kas hücreleri gibi çeşitli perivasküler hücre tiplerinden meydana gelir [138]. BBB endotel hücrelerinin temel anatomik farklılığı, küçük ve lipofilik moleküllerin hücreler arası geçişini sınırlayan sıkı bağlantıların varlığıdır. Bu hücreler ayrıca porlara sahip değildir ve madde giriş-çıkışının sağlanabilmesi için yüksek mitokondri içeriğine sahiptir [139, 140]. Bu hücresel bileşenler arasındaki karmaşık etkileşimler, çoğu terapötik bileşiğin beyne ulaşmasını engelleyen güçlü bir bariyer fonksiyonu oluşturur.

Son yıllarda, GBM tedavisinde sistemik uygulamaların yol açtığı dezavantajları en aza indirmek amacıyla, lokal ilaç taşıma sistemleri ön plana çıkmıştır. Lokal tedavi yaklaşımları, kemoterapötikler, immünoterapiler veya gen tedavisi gibi terapötik ajanların doğrudan tümör bölgesine uygulanmasını esas alır. Lokal ilaç uygulamasının, BBB'yi bypass ederek [141] tümöre ulaşan ilaç konsantrasyonunu artırırken sistemik dolaşıma geçen miktarı azaltması beklenir; bu sayede, antikanser ajanların klinik etkinliği artırılabilirken, sağlıklı dokulara yönelik toksik etkiler de minimuma indirilebilir [142].

Bu kapsamda geliştirilen lokal ilaç taşıyıcı sistemler, genellikle aktif bileşeni uzun süre kontrollü olarak salabilen depo formülasyonları şeklinde tasarlanır. Bu sistemler; kemoterapötik ilaçların stabilitesini artırma, uzun süreli ve dengeli salım sağlayarak doz kontrolünü kolaylaştırma, kötü çözünürlükteki bileşenleri formülasyona entegre edebilme, toplam ilaç miktarını azaltma ve yan etki profilini iyileştirme gibi pek çok avantaj sunmaktadır [143]. Biyobozunur polimerlerden tasarlanan ilaç taşıyıcı sistemler, implantasyon sonrasında vücutta güvenli bir şekilde parçalanarak toksik olmayan ürünlere dönüşür ve böylece ikinci bir cerrahi müdahale gereksinimini ortadan kaldırır. Bu avantajları nedeniyle polimerik nanopartiküller, mikroküreler ve hidrojel bazlı yapılar gibi sistemler, hedefe yönelik ilaç salımı için yaygın biçimde tercih edilmektedir.

2.7.2. GBM Tedavisinde Kullanılan İlaçlar

GBM tedavisinde en yaygın kullanılan kemoterapötik ajan, DNA metilasyonu yoluyla tümör hücrelerinde apoptozu indükleyen alkilleyici bir ajan olan Temozolomid

(TMZ)'dir. Standart tedavi protokolü (Stupp rejimi), maksimum güvenli tümör rezeksiyonunu takiben radyoterapi ile birlikte eş zamanlı TMZ uygulamasını ve ardından adjuvan TMZ tedavisini içermektedir. TMZ'ye ek olarak, 1,3-bis(2-kloroetil)-1-nitrozüre (BCNU) içeren biyobozunur wafer implantları, tümör rezeksiyonu sonrası kaviteye yerleştirilerek lokal kemoterapi sağlar. Bu lokal uygulama sistemik toksisiteyi azaltırken, tümör bölgesinde daha yüksek ilaç konsantrasyonu elde edilmesine olanak tanır [144].

GBM tedavisinde ayrıca lomustin (CCNU), nimustin (ACNU) ve fotemustin gibi diğer nitrozüre türevleri de kullanılmaktadır. Bu ajanlar, özellikle TMZ'ye dirençli GBM modellerinde etkili antitümör etkiler göstermiştir. Ancak, yüksek toksisite profilleri ve sınırlı tedavi yanıtları nedeniyle dikkatli izlem gerektirirler. Bevacizumab, özellikle nüks GBM olgularında anti-anjiyogenik etki gösteren ve vasküler endotelyal büyüme faktörüne (VEGF) karşı geliştirilen bir monoklonal antikor olarak onaylanmış ve kullanıma sunulmuştur. Ancak genel sağkalım üzerindeki etkisi halen tartışmalıdır [145].

Günümüzde GBM tedavisinde yaygın olarak kullanılan sentetik ajanlar - TMZ, nitrozüre türevleri (BCNU, CCNU, ACNU, fotemustin) ve bevacizumab gibi -, ciddi yan etkiler oluşturarak tedaviye karşı direnç gelişimine neden olabilmekte ve aynı zamanda yüksek maliyetleriyle önemli bir sorun teşkil etmektedir [146]. Kemoterapiye karşı direnç, kanser tedavisinin etkinliğini sınırlayan en büyük engellerden biridir. Bu nedenle, düşük toksisiteye sahip ve tümörle ilişkili metastaz ile hücre çoğalmasını etkili biçimde kontrol edebilen yeni nesil antikanser ajanların geliştirilmesi, güncel araştırmaların öncelikli hedefleri arasında yer almaktadır [34].

Doğal kaynaklı terapötik ajanlar daha düşük yan etki profiline sahip ve sentetik ilaçlara kıyasla daha güvenli ve tolere edilebilirdir. Ayrıca, tümör büyümesi ve metastazdan sorumlu çeşitli hücresel yolakları etkiledikleri de yapılan araştırmalarla ortaya konmuştur [147]. Tüm bu bulgular, yeni antitümör ajanların keşfi için doğal kaynakların daha fazla araştırılmasını teşvik etmektedir [148]. Bu kapsamda, doğal kaynaklı biyoaktif bileşikler olan polifenoller, umut vadeden alternatifler arasında öne çıkmaktadır [149]. Polifenoller; doğal bitkisel besin kaynaklarında bolca bulunan, antioksidan özellikleriyle tanınan ve yapılarında en az bir hidroksil grubu içeren benzen halkasına sahip fitokimyasallardır.

Antioksidan ve antienflamatuar etkileri sayesinde, hem tek başına hem de konvansiyonel tedavilerle kombine olarak tümör ilerlemesini baskılayıcı potansiyele sahiptirler. [149].

2.7.2.1. Gallik Asit

Bitkisel kökenli bir bileşik olan gallik asit (GA), antioksidan, antikanser ve antimikrobiyal özellikleri ile iyi tanımlanmış bir doğal maddedir [150, 151]. Fenolik yapısı sayesinde serbest radikalleri nötralize edebilme kapasitesi, kimyasal olarak indüklenen karsinogenezi inhibe etme potansiyeli açısından büyük önem taşımaktadır [152, 153]. Meşe kabuğu, çay yaprakları ve mazıdan elde edilen doğal bir fenolik bileşik olan GA, kimyasal olarak 3,4,5-trihidroksibenzoik asit yapısına sahiptir ve kimyasal formülü $C_7H_6O_5$ veya $C_6H_2(OH)_3COOH$'dır. Moleküler ağırlığı 170,12 g/mol olan bu bileşik, 210 °C'de eriyen kristal formda bir katıdır [154].

GA, sahip olduğu güçlü antioksidan özelliklerin yanı sıra antimikrobiyal ve antiinflamatuar özellikleri sayesinde araştırmacıların ilgisini çekmektedir [155-157]. Ayrıca, GA'nın antitümör potansiyeli de dikkat çekicidir. Yapılan çeşitli çalışmalar, GA'nın prostat, akciğer, kolon, meme, serviks, mide ve özofagus kanseri gibi farklı tümör türlerine karşı antitümör etkiler gösterdiğini ortaya koymuştur [158-162]. Literatürde GA'nın glioma hücreleri üzerindeki etkilerine ilişkin sınırlı sayıda çalışma bulunmaktadır. Bu eksikliği gidermek amacıyla tez kapsamında, GA'nın glioma hücreleri üzerindeki etkileri ile GBM tedavisindeki potansiyel kullanımı araştırılmıştır. GA'nın farklı kanser türlerindeki etkilerine ilişkin bulgular **Çizelge 2.4**'de özetlenmiştir [37].

Çizelge 2.4. GA'nın bazı kanser türleri üzerindeki etkileri ([37]'den değiştirilerek).

Kanser hücre hattı	Hücre tipi	GA etki mekanizması
KATO III	Mide kanseri	Apoptoz
COLO 205	Kolon adenokarsinom	Apoptoz
3T3L1	Adiposit	Apoptoz
DU145	Prostat kanseri	Apoptoz
22Rv1	Prostat kanseri	Apoptoz
U87	Glioma	Anti-anjiyogenez
Calu-6	Akciğer kanseri	Apoptoz
A459	Akciğer kanseri	Apoptoz
HeLa	Rahim ağzı kanseri	Apoptoz
HL-60	Lösemi	Anti-proliferatif
HT-29	Kolon kanseri	Apoptoz
Caco-2	Kolon adenokarsinom	Apoptoz

Çizelge 2.4'te görüldüğü üzere, GA'nın kanser hücreleri üzerindeki en yaygın etki mekanizması apoptozdur. GA, bu mekanizmayı çeşitli moleküler yolaklar ve hücresel etkileşimler aracılığıyla tetiklemektedir [146]. Söz konusu etkileşimler genel olarak şu şekilde özetlenebilir: ***Gallik asit,***

(i) Kanser hücrelerinde reaktif oksijen türlerinin (ROS) üretimini artırarak oksidatif strese neden olur. Bu stres, mitokondriyal membran potansiyelinin bozulmasına, hücre içi kalsiyum seviyelerinin artmasına ve sitokrom c gibi apoptozu başlatan faktörlerin sitoplazmaya salınmasına yol açar. Böylece içsel (intrinsik) apoptoz yolu aktifleşir [163]. Öte yandan, sağlıklı hücrelerin, GA'nın neden olduğu apoptoza karşı bazı inhibitör proteinler üreterek bu sürece direnç gösterebildiği gösterilmiştir [164].

(ii) Hücre yaşamı ve çoğalması için kritik öneme sahip olan PI3K/Akt sinyal yolunu baskılar. Bu yolun inhibisyonu, GA'nın hem apoptozu artırmasını hem de tümör büyümesini engellemesini sağlar. Bu etki, genellikle NF-kB sinyal yolunun da baskılanmasıyla desteklenir; bu da apoptoz sürecini daha da güçlendirir [165].

(iii) Hücre stresine yanıt olarak p38 MAPK sinyal yolunu aktive eder; bu sayede, apoptoza yol açan alt düzey hedef proteinlerin fosforilasyonunu kolaylaştırarak hücre ölümünü teşvik eder [39].

(iv) Bax/Bcl-2 oranını düzenler; pro-apoptotik Bax protein düzeyini artırırken, anti-apoptotik Bcl-2 düzeyini azaltır ve hücre ölümünü destekleyen bir denge oluşturur [166].

(v) Apoptozun temel yürütücüleri olan kaspaz-3, -8 ve -9'u aktive ederek, bu enzimlerin hücre içi yapı taşlarını parçalamasına ve programlı hücre ölümünün gerçekleşmesine neden olur [166].

GA'nın yarı ömrü oldukça kısadır ve genellikle uygulamadan sonraki 24 saat içinde vücuttan tamamen atılmaktadır. Bu hızlı eliminasyon, toksisite riskini azaltma açısından avantaj sağlasa da, etkili terapötik düzeylerin uzun süre korunmasını zorlaştırmakta ve dolayısıyla GA'nın biyoyararlanımını artıracak stratejilere ihtiyaç duyulmasına neden olmaktadır. Bu farmakokinetik sınırlamaların aşılabilmesi için, GA'nın vücutta daha iyi emilmesini, dokulara etkili bir şekilde dağılmasını, uygun şekilde parçalanmasını (metabolizma) ve vücuttan atılmasını sağlayacak çeşitli yöntemler geliştirilmiştir. Bu yöntemlerden biri de, GA'nın taşıyıcı bir sistem içerisinde enkapsülasyonudur. Bu yaklaşım, GA'nın biyoyararlanımını artırarak hedef dokuya daha etkili bir şekilde ulaşmasını mümkün kılmaktadır [34]. Dorniani ve ark. (2016) tarafından yapılan bir çalışmada, GA, grafen oksit bazlı bir nanotaşıyıcıyla birlikte kullanılarak kanser tedavisinde kullanılabilecek bir sistem geliştirilmiştir [167]. Bu yeni sistemin, serbest GA'ya kıyasla karaciğer kanseri hücreleri (HepG2) üzerinde daha güçlü bir antikanser etki gösterdiği rapor edilmiştir. Benzer şekilde, Rosman ve ark. (2018), GA yüklü manyetik nanoyapılar tasarlamış ve bu sistemlerin A549 (akciğer), MCF-7 (meme) ve HT-29 (kolon) kanser hücre hatlarında, serbest GA'ya kıyasla daha yüksek antikanser etki sergilediğini ortaya koymuştur [168]. Bu çalışmalar, GA'nın uygun taşıyıcı sistemlerle birlikte kullanıldığında terapötik etkinliğinin önemli ölçüde iyileştirilebileceğini göstermektedir.

2.7.2.2. GA Taşıyıcı Sistemler

Literatürde, kanser tedavilerinde kullanılmak üzere GA için geliştirilmiş çeşitli ilaç taşıma sistemleri bulunmaktadır. **Çizelge 2.5**'te GA için kullanılan ilaç taşıma sistemleri, temel özellikleri ve GA üzerindeki etkileri özetlenmiştir [34].

Çizelge 2.5. GA için kullanılan ilaç taşıma sistemleri ([34]'den değiştirilerek).

Taşıyıcı sistem	Kullanımı	GA üzerindeki etkisi
Nanopartiküller	Çözünürlüğünü, stabilitesini ve biyoyararlanımını artırmak için GA nanopartiküller içinde enkapsüle edilebilir	GA'yı kontrollü ve hedefe yönelik şekilde taşıyarak etkinliğini artırır [169].
Hidrojeller	Hidrofilik polimerlerden oluşan üç boyutlu ağ yapısına sahip hidrojel sistemleri, GA'yı bünyelerine entegre ederek kontrollü salım sağlar.	Yüksek su tutma kapasiteleri sayesinde GA'nın uzun süreli ve stabil salımına olanak tanır [170].
Mikroküreler	Mikroskobik küresel formda partiküllerdir. GA enkapsüle edilen mikroküreler oral, enjeksiyon yoluyla veya topikal olarak uygulanabilir.	Kontrollü salım özellikleri sayesinde GA'nın uzun süreli etkinliğini sürdürmesini sağlar [171].
Misel Sistemleri	GA, amfipatik moleküllerin sulu çözeltilerde kendiliğinden organize olmasıyla oluşan misel yapılar içinde formüle edilebilir.	GA'nın çözünürlüğünü ve stabilitesini artırır. Ayrıca, hedefe yönelik ilaç taşıma potansiyeli sayesinde GA'nın tümör dokularına seçici olarak taşınmasına olanak sağlar ve bu özelliği, kanser tedavilerinde önemli avantajlar sunar [172].
Nanoemülsiyonlar	GA'nın dahil edilerek formüle edilebileceği, termodinamik olarak stabil yapılardır. Yağ damlacıklarının sulu ortamda dağılmasıyla oluşurlar.	GA'nın çözünürlüğünü ve emilimini artırarak daha etkili bir şekilde taşınmasını sağlarlar [173].
Siklodekstrinler	GA ile kompleks oluşturarak çözünürlük ve stabiliteyi artıran halkasal oligosakkaritlerdir. Oral ve lokal uygulamalarda kullanılırlar. En yaygın kullanılanları β-siklodekstrin, hidroksipropil-β-siklodekstrin ve γ-siklodekstrindir.	GA'nın çözünürlüğünü ve kimyasal stabilitesini iyileştirir [174].

Çizelge 2.5'te özetlenen sistemlerden en yaygın kullanılanı nanopartikül bazlı sistemlerdir. Özellikle polimerik nanopartiküller, lipozomlar ve katı lipid nanopartikülleri, GA'nın kontrollü ve hedefe yönelik salımını sağlayarak terapötik etkinliğini önemli ölçüde artırmaktadır. GA için uygun bir ilaç taşıma sisteminin seçimi; uygulanacağı tedavi şekline, istenen salım profiline ve hedeflenen etki bölgesine bağlı olarak değişiklik göstermektedir. GA'nın taşınmasında polimerik, lipit bazlı ve karbon temelli nanopartiküller arasında yapılacak tercih, çeşitli faktörler tarafından belirlenmektedir. Polimerik nanopartiküller yüzey modifikasyonuna olanak tanıyan çok yönlü yapıları sayesinde hedefe yönelik taşıma ve kontrollü salım avantajı sunar [175].

Literatürde, GA'nın nanopartikül bazlı sistemlerle kanser tedavisinde kullanımına yönelik çeşitli çalışmalar bulunmaktadır. Bu kapsamda yapılan bir çalışmada, aljinat bazlı partiküller kullanılarak GA'nın kontrollü salımı değerlendirilmiştir. Partiküllerden GA salımının ilk 60 dakikada %80'e ulaştığı tespit edilmiştir. Ayrıca, kolorektal adenokarsinomun epidermal hücrelerinden elde edilmiş Caco-2 hücre hattı ile yapılan testler, GA'nın partikül içerisinde doz ve zamana bağlı olarak antioksidan ve antikanser etkinliğini koruduğunu ortaya koymuştur [176].

Bir başka çalışmada, GA'nın karboksimetil kitosan (CMC) ile oluşturulan nanopartikül formülasyonlarının (GA-CMC NPs) meme (MCF-7) ve sağlıklı deri fibroblast (BJ1) hücre hatları üzerindeki etkisi MTT testi ile değerlendirilmiştir [177]. Dielektrik spektroskopi sonuçları, GA'nın CMC nanoparçacıkları içine başarıyla enkapsüle edildiğini; bu nanoparçacıkların 15–31 nm çapında, küresel şekilli ve yüksek süspansiyon stabilitesine sahip olduğunu göstermiştir. GA-CMC NPs, serbest GA'ya kıyasla HCT-116 ve MCF-7 hücrelerine karşı daha yüksek sitotoksik etki gösterirken ($p<0,05$), BJ1 hücrelerinde belirgin bir toksisite oluşturmamıştır. Bu bulgular, GA-CMC sisteminin seçici antikanser etkisini ve biyouyumluluğunu desteklemektedir Ayrıca GA yüklü nanoparçacıklarda dielektrik kaybı (ε'') ve elektriksel iletkenlik değerlerinin daha düşük olması, GA ile taşıyıcı sistem arasındaki güçlü etkileşimi ve yüksek sistem stabilitesini göstermiştir. Sonuç olarak, GA-CMC NPs, GA'nın biyoyararlanımını ve hedefleme kapasitesini artırarak etkili ve güvenli bir kemoterapötik yaklaşım seçeneği sunmuştur [177].

GA'nın kullanımına ilişkin diğer bir çalışmada ise, GA ve kuersetin içeren kitosan bazlı bir nanotaşıyıcı sistem geliştirilmiş ve kolorektal kanser tedavisindeki etkinliği değerlendirilmiştir [178]. Geliştirilen nanoparçacıklar, hedefe yönelik taşıma için uygun boyutlarda olup pozitif zeta potansiyeline sahiptir. *İn vitro* sonuçlar, GA ve kuersetin'in 24 sa boyunca kontrollü bir şekilde salındığını göstermiştir. *İn vivo* deneylerde ise, 1,2-dimetilhidrazin (DMH) ile kolorektal kanser indüklenen Wistar sıçanlarında, GA ve kuersetin yüklü kitosan nanoparçacıklarıyla tedavi edilen gruplarda tümörleşme belirtilerinde anlamlı bir azalma gözlenmiştir. Aynı zamanda, bu tedavi antioksidan enzim düzeylerini artırmış, oksidatif stres belirteçlerini düşürmüş ve kolonda inflamasyon ile tümör oluşumunu azaltmıştır. Elde edilen bulgular ile, GA'nın nanoparçacıklarla birlikte kullanımının kolorektal kanser tedavisi için etkili bir yaklaşım sunduğu gösterilmiştir [178].

Literatürde GA'nın glioma tedavisinde nanopartikül formülasyonlarıyla kullanıldığı çalışma sayısı sınırlı olmakla birlikte, mevcut veriler bu yaklaşımın oldukça umut verici olduğunu ortaya koymaktadır. You ve ark. (2011), U87 glioblastoma hücrelerinde serbest GA uygulamasının hücre içi reaktif oksijen türlerini artırarak glutatyon seviyesini azalttığını ve apoptozu indüklediğini bildirmiştir [35]. Ancak bu çalışma nanopartikül bazlı bir sistem içermemektedir. Öte yandan Jing ve ark. (2021), GA yüklü altın nanoparçacıklar (GA-GNP) geliştirerek bu sistemin insan glioma hücre hattı U251 üzerindeki etkilerini değerlendirmiştir [179]. Sonuçlar, GA-GNP sisteminin hem serbest GA'ya hem de yalnızca GNP'ye kıyasla radyasyona bağlı hücre ölümünü anlamlı düzeyde artırdığını göstermiştir. Bu etkinin, pro-apoptotik BAX protein seviyesindeki artış ve anti-apoptotik BCL-2 düzeyindeki azalma ile ilişkili olduğu belirlenmiştir. Ayrıca, GA-GNP uygulaması hücre döngüsünde S ve G2/M fazlarında duraksamaya yol açarak hücre proliferasyonunun baskılandığını ortaya koymuştur. Bununla birlikte, Chen ve ark. (2024) tarafından yürütülen bir başka çalışmada demir-gallik asit nanoparçacıkları (Fe-GA NPs), T98G glioblastoma hücre zarları ile kaplanarak homotipik hedefleme amacıyla tasarlanmıştır [180]. Bu sistem, manyetik rezonans görüntülemede kontrast ajanı olarak işlev göstermesinin yanı sıra, glioma hücrelerine seçici bağlanma yeteneğiyle tanı ve tedaviyi birleştiren theranostik bir potansiyel sunmuştur. Tüm bu çalışmalar, GA'nın nanopartikül formülasyonlarıyla birlikte kullanımının, glioma tedavisinde hem

terapötik etkinliği artırmak hem de hedefli görüntüleme imkânı sağlamak açısından önemli bir potansiyele sahip olduğunu göstermektedir.

Web of Science veri tabanında “gallic acid”, “polymeric nanoparticle” ve “glioma” anahtar kelimeleriyle yapılan taramalarda herhangi bir çalışmaya rastlanmamıştır. Bu durum, konunun literatürde yeterince araştırılmadığını ve önemli bir boşluk bulunduğunu göstermektedir. Bu tez çalışmasında, GA’nın polimerik nanopartikül sistemler içinde formüle edilerek glioma hücreleri üzerindeki biyolojik etkilerinin araştırılması amaçlanmıştır. Böylece, literatürdeki bu eksikliğin giderilerek glioma tedavisine yönelik yeni ve özgün bir yaklaşım sunulması hedeflenmiştir.

2.7.2.2.1. Polimerik Nanopartiküller

Polimerik nanopartiküller, 10 ile 1 000 nm arasında değişen boyutlara sahip, sentetik veya doğal polimerlerden oluşan organik tabanlı submikron parçacıklardır. Bu parçacıklar, tekrar eden polimer zinciri birimlerinden oluşan, kendine özgü özelliklere sahip kararlı yapılar oluşturur [181].

Polimerik nanopartiküller; yüksek kararlılıkları, düşük çözünürlüğe sahip ilaçların çözünürlüğünü artırma potansiyelleri, hedeflenen hücre veya dokulara yönelik taşıma sağlamaları ve ilaçları uzun süre boyunca dengeli şekilde salabilmeleri nedeniyle ilaç taşıma sistemleri için etkili bir seçenek sunmaktadır. Bu nanopartiküller, ilaç moleküllerini polimer matriks içine enkapsüle ederek ya da yüzeye bağlayarak kontrollü salım sağlayabilirler. Ayrıca fonksiyonel gruplar ve ligandlarla tasarlanan nanopartiküller, hücre veya dokular gibi biyolojik yapılarla etkileşime girebilecek özel yüzey özelliklerine sahiptir. Bu sayede, hücre yüzeyinde bulunan belirli reseptörlere veya belirteçlere bağlanarak aktif hedefleme imkânı sunar ve istenilen bölgeye ilacın hedefli bir şekilde ulaştırılmasını sağlar. Böylece çevre dokular üzerinde minimum yan etki ile etkili bir tedavi gerçekleştirilebilir [182].

Polimerik nanopartikül üretiminde, istenilen özelliklere göre özelleştirilebilmeleri nedeniyle sentetik biyobozunur polimerler sıklıkla tercih edilmektedir. Bu amaçla en çok kullanılan malzemelerden bazıları, kontrollü biyobozunma özellikleri nedeniyle poli

(laktik-ko-glikolik asit) (PLGA), poli (laktik asit) (PLA) ve poli (ε-kaprolakton) (PCL) gibi alifatik polyesterlerdir. Ancak bu polimerlerin mekanik dayanımlarının düşük olması, kullanım alanlarını sınırlamaktadır [45, 183]. Bu dezavantajı aşmak için geliştirilen alifatik-aromatik kopoliesterler, alifatik poliesterlerin biyobozunurluk özelliklerini korurken, aromatik poliesterlerin yüksek mekanik ve termal dayanım avantajlarını da sağlamaktadır [45]. Bu kopoliesterler arasında yer alan poli(bütilen adipat-ko-tereftalat) (PBAT), son yıllarda dikkat çeken yeni nesil biyomalzemelerden biridir. İlk olarak 1995 yılında BASF tarafından sentezlenen PBAT, 1,4-bütandiol, tereftalik asit ve adipik asidin polikondenzasyonu ile üretilmiş ve 1998'de Ecoflex® adıyla piyasaya sunulmuştur [184].

Alifatik-aromatik bir kopolyester olan PBAT, aromatik kısmı temsil eden butilen tereftalat (BT) ve alifatik kısmı temsil eden butilen adipat (BA) zincirlerinden oluşur. Tamamen biyobozunur, toksik olmayan ve esnek bir yapıya sahip olması nedeniyle PBAT, özellikle ambalaj ve tarım alanlarında yaygın olarak kullanılmaktadır [41, 42]. Gaz kromatografisi (GC), jel geçirgenlik kromatografisi (GPC) ve respirometrik testlerle yapılan analizler, PBAT'ın bozunması sonucunda toksik özellikte aromatik yan ürünlerin oluşmadığını göstermiştir [185]. PBAT'ın bozunması, ester bağlarının enzim aracılı hidroliziyle gerçekleşir ve bu süreç genellikle yüzeyden başlar. Bozunma ürünü olan tereftalik asit, düşük seviyelerde toksik etki gösterebilir; ancak çevrede biyolojik birikim yapmadığı ve insan sağlığına doğrudan zararlı olmadığı kabul edilmektedir. Ayrıca, tereftalik asit genellikle polimer yapısı içinde kimyasal bağlarla sabitlenmiş halde bulunduğundan, toksik etkisi sınırlı kalmaktadır [186].

Literatürde, PBAT'nin biyolojik sistemlerle uyumlu olduğunu gösteren birçok çalışma bulunmaktadır [44-46]. Örneğin, PBAT ve modifiye edilmiş PBAT membranlarla yapılan bir çalışmada, L929 fare fibroblast hücre hattı kullanılarak gerçekleştirilen 6 günlük hücre kültürü deneyleri sonucunda, tüm membranların hücre proliferasyonunu desteklediği belirlenmiştir. Başka bir çalışmada ise, karbon nanotüpler ile güçlendirilmiş elektroeğirilmiş PBAT fiberlerin MG63 osteosarkom hücreleri ile kültüre edildiği ve bu fiberlerin hücreler üzerinde toksik bir etki göstermediği raporlanmıştır [187]. PBAT'nin biyouyumluluğunu değerlendiren bir *in vivo* çalışmada ise, insan adipoz kök hücreleri ile kültüre edilen nano-hidroksiapatit katkılı PBAT nanofiberler ve filmler kemik implantı

olarak tasarlanmış ve sıçanların sırt bölgesine implante edilmiştir. Uygulamadan iki gün sonra, implant bölgesinde yalnızca çok düşük düzeyde inflamasyon gözlenmiş; bu bulgu, PBAT'nin biyouyumlu bir malzeme olduğunu desteklemiştir [188].

Web of Science verilerine göre, "PBAT" ve "tissue engineering" anahtar kelimeleriyle yapılan taramada çoğu elektroeğirilmiş fiber formda olmak üzere 21 çalışmaya ulaşılmıştır. Bu çalışmalar, PBAT'ın düşük kristalinite, hızlı biyobozunurluk, iyi mekanik özellikler ve antibakteriyel etkileri sayesinde doku mühendisliğinde başarılı sonuçlar verdiğini göstermiştir [189, 190]. Bununla birlikte, tüm bu olumlu özelliklerine rağmen PBAT'ın ilaç taşıyıcı sistemlerde partikül formunda kullanıldığı yalnızca üç çalışmaya rastlanmıştır. Bu sınırlı sayıda çalışmada PBAT, partikül, fiber ve kompozit formda kullanılmıştır.

PBAT, ilaç salım sistemlerinde güvenle kullanılabilecek bir polimerdir; çünkü yalnızca biyobozunur ve biyouyumlu olmakla kalmaz, aynı zamanda uzun süreli salım uygulamalarında kan akışına karşı gerekli mekanik dayanıklılığı da sağlar. Ayrıca hidrofilik yapısı, bozunma ürünlerinin toksik olmaması [43]ve hidrolitik koşullar altında kontrollü bir şekilde bozunabilmesi [44], PBAT'ı uzun süreli ve kontrollü ilaç salımı sağlayan ideal bir polimer adayı haline getirmektedir. Literatürde yer alan bir çalışmada, retinoik asit salımı amacıyla PBAT kullanılarak nanoparçacıklar üretilmiştir. Bu çalışmada, ilk gün ilacın yalnızca %10'u salınmış, 7. gün sonunda toplam salım %25'e ulaşmış ve 14. güne kadar lineer bir salım profili gözlemlenmiştir [191]. Elde edilen bu veriler, PBAT'ın kontrollü ilaç salımı sağlayabilen uygun bir polimer olduğunu desteklemiştir.

Sunulan tez çalışmasında GA'nın glioblastoma tedavisindeki potansiyelinin araştırırlması hefdeflenmiştir. GA'nın terapötik etkinliğine rağmen, düşük biyoyararlanımı, hedef bölgeye yeterli düzeyde ulaştırılamaması ve potansiyel toksisitesi gibi sınırlamaların üstesinden gelebilmek için, kontrollü salım sağlayabilen nanopartikül tabanlı taşıyıcı sistemlerin geliştirilmesi hedeflenmiştir. Bu bağlamda, GA'nın kontrollü ve uzun dönemli salımı önemli bir rol oynamaktadır. Bu doğrultuda, sahip olduğu avantajlı özellikler sayesinde PBAT nanopartikülleri uygun bir taşıyıcı sistem adayı olarak değerlendirilmiştir. Yapılan literatür incelemesine göre, bu tez çalışması, GA'nın

taşınmasında PBAT nanopartiküllerinin kullanıldığı ilk çalışmadır. Geliştirilen nanopartiküller, GBM tedavisinde kullanılmak üzere; doğrudan tümör bölgesine enjekte edilebilecek şekilde ya da transplantasyon amacıyla doku iskeleleri gibi matriks sistemlerine entegre edilecek biçimde tasarlanmıştır.

2.7.2.2. *Opuntia ficus indica* (Nopal)

Opuntia ficus indica (nopal), Türkiye'de özellikle Akdeniz bölgesinde sebze olarak tüketilen bir bitkidir. Bu bitkiden elde edilen bileşikler, yara iyileşmesi [192, 193], diyabet tedavisi [194], bağışıklık sisteminin güçlendirilmesi, kanser tedavisi [50], anjiyotensin dönüştürücü enzim inhibisyonu, mide rahatsızlıklarına karşı koruma ve antioksidan etkiler [48, 194] gibi birçok terapötik alanda etkili olduğu gösterilmiştir. *Opuntia ficus indica* bitkisinden izole edilen çeşitli bileşiklerin, farklı kanser türlerinde apoptozu uyararak antiproliferatif etkiler gösterdiği bildirilmektedir. Örneğin, bu bitkiden izole edilen opuntiol, oral karsinom hücrelerinde reaktif oksijen türü (ROS) üretimini artırarak apoptozu tetiklemiştir [195]. Benzer şekilde, isorhamnetin-3-O-glukozil-pentosid adlı flavonoid, kolon kanseri hücrelerinde kaspaz-bağımlı mitokondriyal hasara yol açmıştır [196]. Bitki ekstraktlarının, kolon kanseri hücrelerinde hücre döngüsünü durdurduğu, ROS üretimini artırdığı ve apoptozu desteklediği gösterilmiştir [197]. Ayrıca hayvan modellerinde tümör büyüme hızını azalttığı ve adenokarsinom hücrelerinde apoptoz oranını artırdığı da rapor edilmiştir [198, 199].

Opuntia ficus indica bitkisinden elde edilen müsilaj (ONM), ağırlıklı olarak polifenolik bileşikler ve heteropolisakkaritlerden oluşmaktadır [47]. ONM, kimyasal bileşimi, viskozitesi ve su tutma kapasitesi gibi fizikokimyasal özellikleri sayesinde gıda ve ilaç endüstrilerinde jel oluşturucu, emülsifiye edici, bağlayıcı, kaplayıcı ve koyulaştırıcı ajan olarak yaygın şekilde kullanılmaktadır [49]. Ekonomik bir biyopolimer olmasının yanı sıra, yüksek su tutma kapasitesi, güçlü bağlayıcılık ve jel oluşturma özellikleri ONM'yi, uzun süreli salım gerektiren ilaç taşıma sistemlerinde kaplama malzemesi olarak değerli bir aday haline getirmektedir [48].

Literatürde, müsilajın partikül temelli ilaç taşıma sistemlerinde kaplama ajanı olarak kullanıldığı yalnızca bir çalışmaya rastlanmıştır. Ghumman ve ark. (2019) tarafından

yapılan bu çalışmada, pregabalin salımı amacıyla taro yumrusu müsilajı (TCM) ile kaplanmış aljinat mikroküreler geliştirilmiş ve bu yöntem ile müsilajın, kontrollü ilaç salımında etkili bir yardımcı madde (eksipiyan) olarak kullanılabileceği gösterilmiştir [200].

Benzer şekilde, bu tez çalışmasında GA taşıyıcısı olarak ONM kaplı PBAT nanopartikülleri tasarlanmıştır. ONM kaplamasının, GA'nın uzun süreli salımını artırarak antikanser etkinliğini maksimize edeceği öngörülmüştür. Ayrıca ONM'nin fenolik bileşikler açısından zengin içeriğinin [47, 201] apoptozu indükleyici etkiler gösterebileceği hipotez edilmiştir. Mevcut bilgiye göre, bu çalışma ONM'nin partikül kaplama materyali olarak kullanıldığı ve GA ile etkileşiminin partikül bazlı bir sistemde, GBM tedavisi bağlamında değerlendirildiği ilk çalışmadır.

2.7.3. GBM Tedavisinde Kullanılan Lokal Taşıyıcı Sistemler

GBM için mevcut standart tedavi yöntemleri yeni tanı almış hastalarda kötü bir prognozla sonuçlanmaktadır. Bu nedenle, farklı tedavi stratejilerinin ve yeni yaklaşımların geliştirilmesine ihtiyaç vardır. Kemoterapötik ajanların ve diğer destekleyici maddelerin lokal olarak uygulanması, GBM tedavi sonuçlarını iyileştirme potansiyeline sahip umut verici bir yöntem olarak öne çıkmaktadır [202].

GBM tedavisinde lokal ilaç salım stratejilerini avantajlı hâle getiren çeşitli önemli faktörler bulunmaktadır. Öncelikle, GBM hastalarının yaklaşık %65–75'i cerrahi rezeksiyon geçirmekte olup, bu işlem sonrasında beyinde ilaç taşıyıcı sistemlerin yerleştirilebileceği bir boşluk, yani rezeksiyon kavitesi oluşmaktadır. Bu kavite, ilaç salım sistemlerinin doğrudan uygulanması için uygun bir alan sağlar [203]. Ayrıca, glioblastoma multiforme genellikle ilk tümör bölgesine iki santimetreden daha yakın bir alanda nüks ettiğinden, bu sistemler tümörün yeniden oluştuğu bölgeye oldukça yakın konumlandırılabilir [204]. Bu yöntem aynı zamanda BBB'yi geçemeyen kemoterapötik ajanların da doğrudan tümör bölgesine ulaştırılmasına olanak tanır. Bununla birlikte, ilaçların doğrudan tümör içine enjekte edilmesi veya implantlar yoluyla uygulanması, hipoksi gibi kemoterapi ve radyoterapiye direnç geliştiren lokal mikroçevresel faktörlerin modülasyonu ya da etkisizleştirilmesi açısından da avantaj sağlar. Ayrıca, ilaçların doğrudan tümör çevresine uygulanması lokal konsantrasyonu artırarak sistemik dolaşıma

karışımını sınırlar; böylece yaygın yan etkiler ve doz kısıtlamaları azaltılabilir. Tüm bu nedenlerle, lokal ilaç salım yaklaşımları, sistemik uygulamalara kıyasla GBM tedavisinde daha etkili, hedefe yönelik ve klinik sonuçları iyileştirme potansiyeline sahip bir strateji olarak öne çıkmaktadır.

GBM'ye yönelik tedavi edici ajanların lokal uygulanması genellikle beyin cerrahisi veya stereotaktik enjeksiyon gibi invaziv yöntemlerle gerçekleştirilir. Ancak bu şekilde verilen ajanlar genellikle beyinden hızla uzaklaştırıldıkları için kısa bir yarı ömre sahiptir [205]. Hedef bölgede terapötik konsantrasyonun korunabilmesi ve bu uygulamanın tekrarına gerek kalmadan etkin bir tedavi sağlanabilmesi için, ilaç salımını uzun süre boyunca kontrollü şekilde gerçekleştirebilen taşıyıcı sistemlere ihtiyaç vardır [206]. Bu tür sistemler, tedavi edici maddeyi taşıyan ve salımını kontrol eden biyomalzemeler kullanılarak geliştirilebilir. Söz konusu sistemler, tümör rezeksiyon kavitesine yerleştirilecek veya doğrudan tümöre enjekte edilecek şekilde tasarlanabilir.

Kemoterapi ilaçlarının lokal uygulanmasında kullanılan sistemler üç temel gruba ayrılır: implant edilebilir ilaç salım sistemleri, enjekte edilebilir taşıyıcılar ve hidrojel bazlı sistemler [205].

Lokal olarak uygulanan kemoterapi ilaçlarının tümör bölgesinde etkinliğini sürdürebilmesi için uzun süreli ve kontrollü salım sağlanması büyük önem taşımaktadır [205]. Bu hedefe ulaşmada literatürde en etkili yöntemlerden biri, ilacın öncelikle polimer bazlı nano/mikro taşıyıcılara yüklenmesi ve ardından bu sistemin bir hidrojel gibi matriks yapılar içine entegre edilmesidir. Literatürde bu yöntemin başarılı sonuçlar verdiğini gösteren birçok çalışma bulunmaktadır. Örneğin, paklitakselin (PTX) yüklü PLGA mikroküreleri aljinat bazlı hidrojele entegre edilerek, rezeksiyon kavitesine implante edilebilecek tekdüze küresel jel tanecikleri oluşturulmuştur [207]. Bu sistem, başlangıçta düşük bir salım oranı göstermiş ve ardından PTX'in salımını 60 günden daha uzun bir süre boyunca yaklaşık olarak sabit bir hızda sürdürerek, uzun süreli kontrollü salım profili sergilemiştir. Bir diğer örnekte ise, kemoterapik ajan yüklü nanoparçacıkların glioblastoma bölgesine lokal uygulanmasında fotopolimerize edilebilir hidrojeller kullanılmıştır [208]. Bu hidrojeller, kontrollü ve uzun süreli ilaç salımını desteklemiş, tümör rezeksiyon kavitesine kolaylıkla enjekte edilebilmiş ve ultraviyole (UV) ışık ile

yerinde jel oluşturma (*in situ* jelasyon) özelliği sayesinde uygulama sonrası hızlı bir şekilde katılaşarak tedavi bölgesinde stabil bir yapı sağlamıştır. Zhao ve ark. (2018), PTX yüklü PLGA nanoparçacıklarını fotopolimerize olabilen polietilen glikol dimetakrilat (PEG-DMA) yapısına entegre ederek, rezeksiyon boşluğuna enjeksiyonla uygulanabilir bir sistem geliştirmiştir [209]. Aynı çalışmada U87 hücre hattı ile oluşturulan fare tümör modelinde, bu hidrojel/nanoparçacık sisteminin uygulandığı grupta sağkalım süresi yaklaşık 150 gün olarak belirlenmiş ve boş hidrojelin sağlıklı farelerde dört ay boyunca herhangi bir toksisite göstermediği tespit edilmiştir.

Literatürde yer alan bu çalışmalar, hidrojel gibi matris sistemlerinin, nano ve mikro taşıyıcıları uygulama bölgesinde etkili bir şekilde tutabildiğini ve kemoterapötik ilaçların kontrollü ve uzun süreli salımını destekleyebildiğini göstermektedir. Bunun yanı sıra, farklı araştırmalar enjekte edilebilir polimer bazlı taşıyıcı sistemlerin, malign beyin tümörlerine doğrudan intratümoral enjeksiyonla uygulanabilirliğini de değerlendirmiştir [210-215]. Bu sistemler içinde, yüksek biyouyumluluğu ve biyobozunurluğu nedeniyle PLGA bazlı enjekte edilebilir nano/mikro taşıyıcılar en çok incelenen yapılardan biridir [216]. Emerich ve ark. (2000) tarafından yapılan çalışmada, karboplatin/BCNU yüklü PLGA mikroküreleri, glioma modeli oluşturulan sıçanlarda intratümoral enjeksiyon yoluyla kullanım potansiyeli değerlendirilmiştir. Elde edilen sonuçlar, bu sistemlerin kontrollü ilaç salımı sağladığını ve serbest ilaç formuna ve boş mikroküreleri kıyasla daha yüksek tedavi etkinliği gösterdiğini ortaya koymuştur [215]. Buna ek olarak, imatinib [210], kurkumin [217], temozolomid (TMZ) [211] ve doketaksel [213] gibi farklı kemoterapötik ajanları içeren enjekte edilebilir polimer bazlı sistemlerin GBM tedavisinde kullanımı da literatürde araştırılmıştır.

Sunulan tez çalışmasında, GBM tedavisine yönelik olarak GA yüklü, *Opuntia ficus indica* musilajı (ONM) ile kaplanmış PBAT nanopartiküllerinin doğrudan enjeksiyon yoluyla ya da hidrojel sistemlerine benzer şekilde bir iskele/taşıyıcı yapı içerisinde kullanılması amaçlanmıştır. Bu kapsamda, taşıyıcı sistem olarak ONM kaplı PBAT nanopartikülleri, iskele materyali olarak ise *Sarcotragus foetidus* süngerinden izole edilen, biyouyumlu ve biyobozunur özelliklere sahip doğal yapı tercih edilmiştir. Böylece, bu çalışma kapsamında *Sarcotragus foetidus* süngerinin yumuşak doku mühendisliğinde taşıyıcı iskele olarak kullanımı da ilk kez değerlendirilmiş ve literatüre kazandırılmıştır.

3. DENEYSEL ÇALIŞMALAR

Bu bölümde mali destekler ve tez çalışması kapsamında kullanılan malzemeler ve deneysel çalışmaların yöntemleri hakkında ayrıntılı bilgiler verilmiştir. Tez çalışması üç ana bölümden oluşmaktadır. İlk kısımda, *Sarcotragus foetidus* süngerinin kemik doku mühendisliği uygulamalarında doku iskelesi olarak kullanım potansiyeli *in vitro* çalışmalarla incelenmiştir. İkinci kısımda *Sarcotragus foetidus* süngerinden kollajen izolasyonu detaylı bir biçimde anlatılarak ilgili karakterizasyon çalışmalarından bahsedilmiştir. Üçüncü kısımda ise yumuşak doku kanseri türlerinden glioblastomanın mevcut tedavi yöntemlerine alternatif olarak doku mühendisliği yaklaşımı ile tedavisi üzerinde çalışılmıştır. Bu kapsamda bu bölümde antikanser ajan olarak GA ve ONM'nin partiküler sistemler ile *Sarcotragus foetidus* süngerine yüklenmesi anlatılmış ve geliştirilen sistemin karakterize edilerek *in vitro* etkinliğinin incelendiği hücre kültür çalışmalarına yer verilmiştir.

3.1. Deneysel Çalışmalarda Kullanılan Malzemeler

Tez çalışmasında kullanılan kimyasal ve biyolojik malzemeler ile temin edildiği firmalara ait bilgiler **Çizelge 3.1**'de ayrıntılı olarak sunulmuştur.

Çizelge 3.1. Deneysel çalışmalarda kullanılan malzemeler.

Malzeme	Firma	Ülke
Birinci Kısım		
Asetik Asit, Glacial	Merck	Almanya
5X HOT FIREPol EvaGreen qPCR Mix Plus	Solis Biodyne	Estonya
β-aktin Primerleri	Alpha DNA	ABD
β-gliserol Fosfat	Sigma-Aldrich	Almanya
Sığır Serum Albumini (BSA)	Sigma-Aldrich	Almanya
cDNA Reverse Transkripsiyon Kiti	Applied Biosystems	ABD
Dimetil Sülfoksit (DMSO)	Applichem	Almanya
Dulbecco Fosfat Tamponlu Tuz Çözeltisi (DPBS)	Capricorn Scientific	Almanya
Eozin	Bio-Optica	İtalya

Deneysel çalışmalarda kullanılan malzemeler (devamı)

Fetal Sığır Serumu (FBS)	Biowest	Fransa
Formaldehit	Merck	Almanya
Gluteraldehit (%25'lik h/h)	Sigma-Aldrich	Almanya
Hekzametildisilazan (HMDS)	Merck	Almanya
Hematoksilen	Bio-Optica	İtalya
Hidrojen Peroksit (%35'lik h/h)	Merck	Almanya
Hidroklorik Asit (HCl)	Sigma-Aldrich	Almanya
İzopropanol	Sigma-Aldrich	Almanya
Kalsiyum Klorür ($CaCl_2$)	Merck	Almanya
Kalsiyum Klorür Dihidrat ($CaCl_2.2H_2O$)	Merck	Almanya
Kloroform	Merck	Almanya
Kolajen Tip 1 Primerleri (*Col1a1*)	Alpha DNA	ABD
Ksilen	Merck	Almanya
L-askorbik Asit	Sigma-Aldrich	Almanya
Lizozim	Sigma-Aldrich	Almanya
L-glutamin	Biowest	Fransa
Magnezyum Klorür Hekzahidrat ($MgCl_2.6H_2O$)	Merck	Almanya
Minimum Essential Medium Alpha Modification (α-MEM)	Biowest	Fransa
MTT	Merck	Almanya
Osteokalsin Primerleri (*Ocn*)	Alpha DNA	ABD
Paraformaldehit	Merck	Almanya
Penisilin-Streptomisin	Biowest	Fransa
P-nitrofenil Fosfat Sıvı Substrat Sistemi (pNPP)	Sigma-Aldrich	Almanya
Potasyum Klorür (KCl)	Merck	Almanya
Propidyum İyodür	Sigma-Aldrich	Almanya
RNEasy Kit	Qiagen	ABD
RNase İnhibitörü	Thermo Fisher	ABD
Tripan Mavisi	Sigma-Aldrich	Almanya
Trizol	Qiagen	Almanya
Sodyum Azid (NaN_3)	Sigma-Aldrich	Almanya
Sodyum Bikarbonat ($NaHCO_3$)	Merck	Almanya

Deneysel çalışmalarda kullanılan malzemeler (devamı)

Sodyum Dihidrojen Fosfat Monohidrat $(NaH_2PO_4.H_2O)_2$	Merck	Almanya
Sodyum Hidroksit (NaOH)	Merck	Almanya
Sodyum Klorür (NaCl)	Merck	Almanya
Tripsin/EDTA Çözeltisi	Sigma-Aldrich	Almanya
İkinci Kısım		
Asetonitril	Merck	Almanya
Etilendiamin Tetraasetik Asit (EDTA)	Merck	Almanya
Etanol	Isolab	Türkiye
Hidroksiprolin Analiz Kiti	Biovision	ABD
Merkaptoetanol	Sigma-Aldrich	Almanya
Sodyum Klorür (NaCl)	Merck	Almanya
Sodyum Dodesil Sülfat (SDS)	Merck	Almanya
Sodyum Hidroksit (NaOH)	Merck	Almanya
Tris Tamponu	Merck	Almanya
Üre	Merck	Almanya
Üçüncü Kısım		
Annexin V-FITC/PI Apoptoz Kiti	Biovision	ABD
DAPI	Invitrogen	ABD
Diklorometan (DCM)	Sigma-Aldrich	Almanya
Didodesil Dimetil Amonyum Bromür (DMAB)	Sigma-Aldrich	Almanya
Dulbecco's Modified Eagle Medium F12 (DMEM F12)	Biowest	Fransa
Dimetil Sülfoksit (DMSO)	Applichem	Almanya
Dulbecco Fosfat Tamponlu Tuz Çözeltisi (DPBS)	Biowest	Fransa
EthD-1	Sigma-Aldrich	Almanya
Fetal Sığır Serumu (FBS)	Biowest	Fransa
Floresan İzotiyosiyanat (FITC)	Sigma-Aldrich	Almanya
Gallik Asit (GA)	Sigma-Aldrich	Almanya
Gluteraldehit (%25'lik h/h)	Sigma-Aldrich	Almanya
İzopropanol	Sigma-Aldrich	Almanya
Kalsein AM	Sigma-Aldrich	Almanya
Kristal Viyole	Sigma-Aldrich	Almanya

Deneysel çalışmalarda kullanılan malzemeler (devamı)

L-glutamin	Biowest	Fransa
Mutlak Etanol (%99,5 h/h)	Isolab	Türkiye
MTT	Sigma-Aldrich	Almanya
Paraformaldehit	Merck	Almanya
Poli(bütilenadipat-ko-tereftalat) (PBAT) Polimeri	BASF	Türkiye
PBS Tablet	Sigma-Aldrich	Almanya
Penisilin-Streptomisin	Biowest	Fransa
RPMI 1640 Medium	Biowest	Fransa
SUDAN I (Dye Content ≥ 95 %)	Sigma-Aldrich	Almanya
Tripsin/EDTA Çözeltisi	Capricorn Scientific	Almanya
Triton X-100	Acros Organics	Almanya
Tween-80	Sigma-Aldrich	Almanya

**Malzemeler kullanıldıkları bölümler içerisinde alfabetik sıraya göre verilmiştir.*

3.2. Mali Destekler

Tez çalışmasının mali desteği, "*Sarcotragus foetidus* Süngerinin Sert ve Yumuşak Doku Mühendisliği Uygulamaları için Fabrikasyonu ve *In-vitro* Karakterizasyonu" başlıklı Lisansüstü Tez Projesi (FDK-2020-18871) ve "Gallik Asitin *Opuntia* Nopal Müsilajı Kaplı Poli(bütilenadipat-ko-tereftalat) Nanopartiküllerden Salımı ve Glioblastoma Hücreleri Üzerindeki Etkisi" başlıklı Hızlı Destek Projesi (FHD-2024-21229) Hızlı Destek Projesi kapsamında Hacettepe Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Koordinasyon Birimi tarafından sağlanmıştır.

KISIM I

Kemik enfeksiyonları, kemik kırıkları, osteoporoz ve kemik tümörlerine bağlı kemik hasarının boyutu her geçen gün artmakta olup, kemiğin onarımı/yenilenmesi için yapılacak çalışmalar son yıllarda büyük önem taşımaktadır. Konu ile ilgili günümüzde yapılan çalışmalar kemik doku mühendisliği yaklaşımına yönelmiştir. Yaklaşımın temel hedefi, hücreleri, biyosinyal molekülleri ve doku iskelelerini kullanarak kemiğin

onarımını/yenilenmesini sağlamaktır. Yaklaşımın kritik noktaları, doku iskelelerinde kemiğin doğal yapısının iyi bir şekilde taklit edilebilmesi ve mineralize dokunun yeterli miktarlarda elde edilebilmesidir. Kemik doku mühendisliği laboratuvar koşullarında üç boyutlu, canlı ve fonksiyonel kemik oluşumunu amaçlamaktadır. Bu kapsamda, kullanılacak doku iskelelerinin biyouyumlu, biyobozunur, biyo-inert ve gözenekli süngerimsi bir yapıya sahip olması gerekmektedir. Sert doku mühendisliği uygulamaları kapsamında üretilen doku iskelelerinin mekanik dayanımının ve yapısal bütünlüğünün sağlanamaması klinikte karşılaşılan en önemli sorunlardan birisidir. Diğer bir sorun ise hücrelerin doku iskelelerine immobilize olmalarında, yayılıp çoğalmalarında ve farklılaşmalarındaki eksikliklerdir. Sunulan tez çalışması ile mevcut sorunların giderilmesi hedeflenmektedir. Bu kapsamda tez çalışmasının ilk amacı, doğal ve yenilenebilir bir kaynak olan *Sarcotragus foetidus* süngerinin 3B sponjin iskeletinin izole edilmesi, fiziksel, kimyasal ve morfolojik yapılarının karakterize edilerek *in vitro* deneylerle sert doku mühendisliği uygulamalarında doku iskelesi olarak kullanım potansiyelinin araştırılmasıdır. Tez çalışmasının bu kısmında belirtilen amaçlar doğrultusunda *Sarcotragus foetidus* süngerlerinden sponjin iskeleler elde edilerek karakterize edilmiş ve hücre kültür çalışmaları yapılmıştır. Böylece, sponjin iskelelerin sentetik doku iskelelerine alternatif olarak kullanılabilirliği incelenmiştir. Ardından, sponjin iskelelerin osteoaktivitesini artırmak amacıyla iskelelere HAp ve B-HAp kaplaması yapılarak özgün biyohibrit doku iskeleleri geliştirilmiştir. Geliştirilen iskeleler karakterize edilmiş ve ardından hücre ve bakteri kültürü çalışmaları ile osteojenik ve antibakteriyel özellikler incelenmiştir. Deneysel çalışmaların ayrıntıları aşağıda detaylı olarak verilmiş olup çalışma aşağıdaki açılardan "**özgün**"dür.

1. Hayvanlar aleminin, Porifera şubesinin, *Demospongiae* sınıfının, *Keratosa* takımının *Irciniidae* ailesinin bir üyesi olan *Sarcotragus foetidus* süngerinin kemik doku mühendisliği uygulamalarında 3B doku iskelesi olarak kullanımının incelendiği **ilk** çalışmadır.
2. Doku mühendisliği çalışmalarında doku iskelesi olarak genellikle biyopolimer temelli matriksler kullanılmaktadır. Bu matrikslerin üretimi zor, pahalı ve uzun bir süreç gerektirmektedir. Geliştirilen sistemde hem üretim maliyeti azaltılıp hem de üretim süresi kısaltılarak yenilenebilir bir kaynak olan *Sarcotragus foetidus*

süngerinden HAp ve B-HAp içeren doğal sponjin doku iskelesi **ilk** kez bu çalışmada elde edilmiştir.

3. Literatürde yer alan ve klinikte antibakteriyel amaçlı olarak kullanılan iyonları (gümüş vb.) içeren preparatların toksik olması, biyoçözünür ve biyouyumlu olmaması gibi dezavantajlarının giderilmesi için doğal ve yenilenebilir kaynakların kullanıldığı etkin bir yöntem literatürde bulunmamaktadır. Çalışma kapsamında, bu tür problemleri giderecek doğal bir ürün **ilk** kez yenilenebilir bir kaynak olan *Sarcotragus foetidus* süngerinden geliştirilmiştir. Böylece, bu açıdan da literatürde önemli bir boşluk doldurulmuştur.
4. *Sarcotragus foetidus* süngerinden elde edilecek olan gözenekli matriksin HAp ve BHAp ile kaplanması sonucu elde edilen doğal doku iskelesinden borun salımı değerlendirilerek hem kemik doku rejenerasyonu hem de antibakteriyel özellikler sistematik ve kapsamlı bir şekilde **ilk** kez bu çalışmada incelenmiştir. Bu kapsamda, içerdiği kolajen, hidroksiapatit ve bor sayesinde klinikte kemik doku rejenerasyonunda kullanılırken enfeksiyon riskini de minimize edecek osteojenik sponjin iskeleler özgün bir yaklaşımla elde edilmiştir.

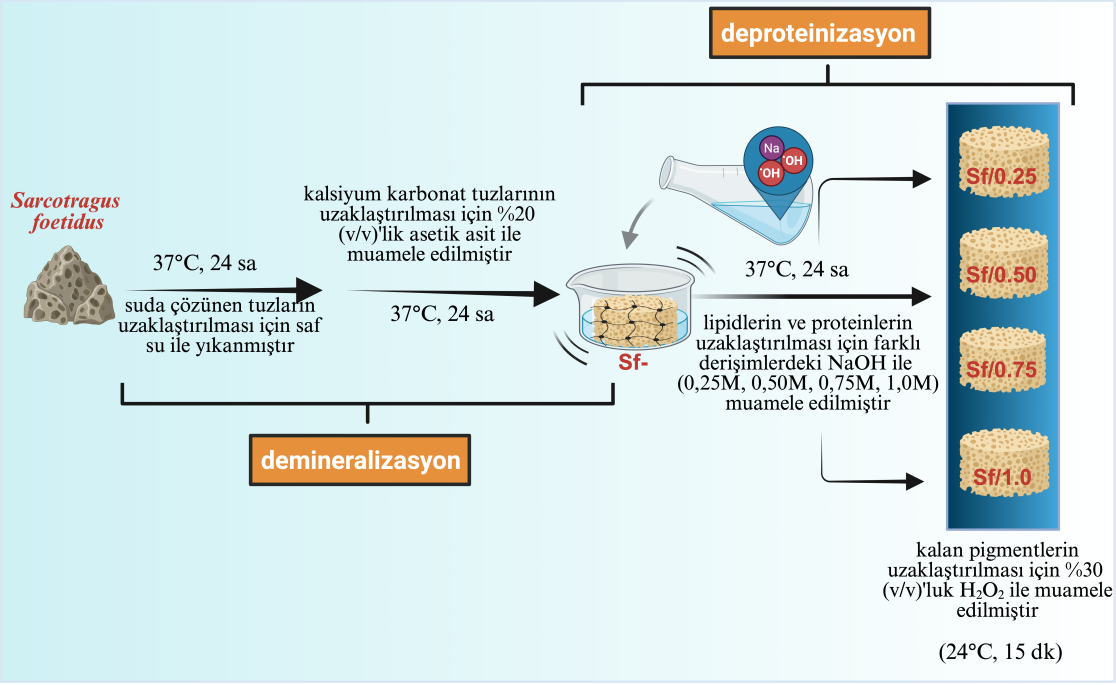
Kemiğin inorganik bileşeni olan hidroksiapatit (HAp) ve hem osteojenik hem de antibakteriyel etkileriyle bilinen bor ile kaplanmış *Sarcotragus foetidus* sünger iskelelerinin klinik öncesi etkinliğini araştırmaya yönelik tez çalışmasının devamı niteliğindeki *in vivo* çalışmalar için gerekli etik kurul ve proje onayları alınmış, çalışmalar tamamlanmıştır.

3.3. *Sarcotragus foetidus* Süngerlerinin İskelet Yapılarının İzole Edilmesi ile 3B Sponjin Doku İskelelerinin Eldesi

13.08.2016 tarihinde 29800 sayısı ile resmî gazetede yayınlanarak yürülüğe giren Gıda, Tarım ve Hayvancılık Bakanlığının "4/1 Numaralı Ticari Amaçlı Su Ürünleri Avcılığının Düzenlenmesi Hakkında Tebliğ'de Değişiklik Yapılmasına Dair Tebliği" nde sünger avcılığnın açık alanda sadece dalma yöntemiyle yapılabileceği belirtilmiştir. Sünger avcılığı yapacak balıkçı gemilerinin ise avcılık izin belgesi almasının zorunlu olduğu vurgulanmıştır. Çalışma kapsamında kullanılan olan *Sarcotragus foetidus* süngerleri dalma yöntemi ile TSSF/CMAS Dalış Eğitmeni ve TSSF Çevre Kurulu Üyesi Su Ürünleri

Mühendisi Özgür Dara tarafından Muğla/Ortaca/Sarıgerme/Baba adası kıyısından (koordinatlar: 360 41’ 37” Kuzey / 280 41’ 40” Doğu; Derinlik: 3,7 metre) avlanmıştır. İlgili tebliğin ikinci bölümünde yer alan Ege Denizi’ndeki yer yasakları (Madde 5) incelendiğinde Muğla/Ortaca/Sarıgerme/Baba adası kıyısının (koordinatlar: 360 41’ 37” Kuzey / 280 41’ 40” Doğu) yasak alanına girmediği görülmektedir.

Akdeniz Havzası’ndan *avlananan Sarcotragus foetidus* süngerlerinin nanofibröz iskelet yapılarının izole edilerek 3B sponjin doku iskelelerinin elde edilmesi için süngerlere demineralizasyon ve deproteinizasyon işlemleri uygulanmıştır [218] (**Şekil 3.1**). İlk olarak, hacimce %50’lik (h/h) etanolde muhafaza edilen süngerler, 1x1 cm^2 boyutlarında kesilmiş ve bir gece boyunca -20°C'de dondurulmuştur. Ardından süngerler 2 gün boyunca -80°C'de liyofilizatörde dondurarak kurutulmuştur ve birkaç izolasyon basamağından geçirilmiştir. Bu izolasyon basamakları; asidik işlem, alkali bazlı işlem, hidrojen peroksit (H_2O_2) ile muamele ve nötralizasyon için her adımdan önce ve sonra saf su (dH_2O) ile yıkama basamaklarını içermektedir.



Şekil 3.1. *Sarcotragus foetidus* süngerlerinin iskelet yapılarının izole edilmesi ile 3B sponjin doku iskelelerinin eldesinin şematik gösterimi (BioRender.com ile oluşturulmuştur; https://BioRender.com).

3.4. Sponjin Doku İskelelerinin Karakterizasyonu ve Hücre Canlılığına Etkisinin Belirlenmesi

Sponjin doku iskelelerinin karakterizasyonu kapsamında aşağıda belirtilen analizler gerçekleştirilmiştir.

Kimyasal yapı analizi: Doku iskelelerinin kimyasal yapıları toplam reflektansı azaltılmış-Fourier dönüşümlü kızılötesi spektroskopisi (ATR-FTIR) (Thermo Scientific, Nicolet 6700, ABD) ile 400-4000 cm^{-1} dalga boyu aralığında incelenmiştir.

Morfolojik incelemeler: Doku iskelelerinin yüzey morfolojileri taramalı elektron mikroskobu (SEM) (EVO50; Zeiss, Germany) ile incelenmiştir. İskeleler altın-paladyum ile kaplanmış ve analizler gerçekleştirilmiştir. İskelelerin ortalama gözenek boyutları SEM analizleri sonucunda elde edilen görüntüler ile ImageJ programı kullanılarak farklı büyütmeler için belirlenmiştir.

Şişme analizi: Örneklerin su tutma kapasiteleri, şişme testi yöntemiyle değerlendirilmiştir. Bu işlem, pH 7,4'te fosfat tampon çözeltisi (PBS) içerisinde, $1x10^{-5}$ g/mL sodyum azid içeren 10 mL'lik çözelti kullanılarak gerçekleştirilmiştir. Yaklaşık 10 mg ağırlığında tartılan örnekler, sodyum azidli PBS çözeltisi içeren santrifüj tüplerine yerleştirilmiş ve 37 °C'de karıştırmalı ortamda 7 gün süreyle inkübe edilmiştir. Belirli aralıklarla örnekler çözelti içerisinden alınarak, yüzeydeki fazla sıvı filtre kağıdı ile uzaklaştırıldıktan sonra terazide tartılmış ve tekrar aynı çözeltiye geri konulmuştur. Bu döngü, örneklerin su tutma kapasiteleri dengeye ulaşıncaya kadar sürdürülmüştür. Yaş ağırlık değerleri ile başlangıç kuru ağırlıklar, Eşitlik-1'de belirtilen formüle uygulanarak örneklerin "Su Tutma Kapasitesi (%)" hesaplanmıştır.

$$\text{Su tutma kapasitesi (\%)} = \frac{\text{Yaş ağırlık-Kuru ağırlık}}{\text{Kuru ağırlık}} x100 \qquad \text{Eşitlik-1}$$

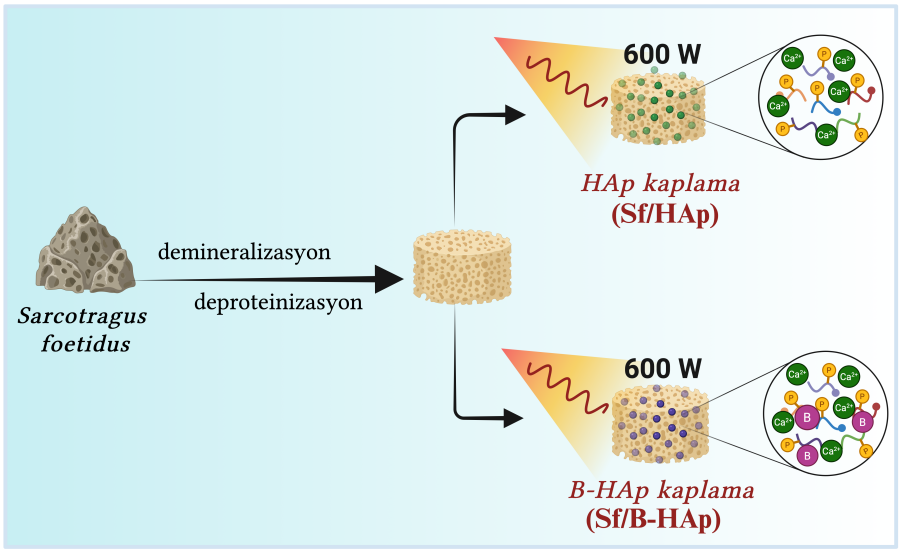
Karakterizasyonu tamamlanan doku iskelelerinin hücre canlılığına etkisi MC3T3-E1 fare preosteoblastik hücre hattı ile *in vitro* koşullarda incelenmiştir. Doku iskeleleri 9 mm çapta ve 2 mm kalınlıkta olacak şekilde hazırlanarak 1 sa boyunca %70 (h/h)'lik etanol çözeltisi içerisinde bekletilmiş, ardından, 1 sa boyunca UV ışık altında bekletilerek steril

edilmiştir. Çalışmalar sterilizasyonu tamamlanan ve proliferasyon ortamı içerisinde (%10 (h/h) FBS, %1 (h/h) L-glutamin, %1 (h/h) penisilin/streptomisin içeren α-MEM) $1,0x10^6$ hücre/iskele yoğunluğunda ekimi yapılan 3 paralel örnek üzerinden statik koşullarda yürütülmüştür. Çalışmada muamele edilmemiş sünger iskele (Sf-), Sf/0.25 ve Sf/0.50 olmak üzere 3 farklı doku iskelesi kullanılmıştır.

Hücre ekili iskeleler 7 günlük kültür süresi boyunca hücresel fonksiyonlar açısından takip edilmiştir. Hücre canlılığı ve uyumluluğu kültürün belirli günlerinde gerçekleştirilen MTT (3-[4,5-dimetiltiazol-2-il]-2,5-difeniltetrazolyum bromür) analizi ile belirlenmiştir. MTT analizi kapsamında belirlenen günlerde örnekler üzerindeki kültür ortamı aspire edilmiş ve örneklere 600 µL serumsuz besi ortamı ile 60 µL MTT reaktifi (2,5 mg/mL MTT) eklenmiştir. Örnekler üç saat boyunca 37°C'de %5 CO_2 atmosferinde inkübe edildikten sonra oluşan formazan kristalleri izopropanol içeren 400 µL (0,04 M HCl) ile çözdürülmüş ve elde edilen mor çözeltilerin optik yoğunlukları, mikro plaka okuyucusu (ASYS, UVM 340 plaka okuyucusu, Avusturya) ile 570 nm dalga boyunda (referans 690 nm) ölçülmüştür. Analiz sonucuna göre 3B iskelet yapısını koruyan ve en yüksek hücre canlılığına sahip olan iskele grubu Sf/0.50 olarak belirlenmiştir. Sf olarak isimlendirilen bu grubun ilerleyen çalışmalarda kullanılmasına karar verilmiştir.

3.5. HAp ve B-HAp Kaplı Sponjin Bazlı Biyohibrit Doku İskelelerinin Hazırlanması

Sarcotragus foetidus deniz süngerinden izole edilen doku iskelelerinin biyoaktivitesini artırmak amacıyla, bu iskeleler hidroksiapatit (HAp) ve bor katkılı hidroksiapatit (B-HAp) ile kaplanarak biyohibrit doku iskeleleri geliştirilmiştir. HAp kaplama için 10 kat derişik SBF (yapay vücut sıvısı) kullanılmıştır ve çözelti "10xSBF" olarak isimlendirilmiştir. Gümüşderelioğlu grubunun önceki çalışmalarında çözeltinin hazırlanması ayrıntılı olarak anlatılmıştır [219]. Kaplama için öncelikle iskeleler 100 mL 10xSBF benzeri çözeltisi içerisine 7 adet iskele olacak şekilde daldırılmıştır. İskelenin de içerisinde bulunduğu 10xSBF çözeltisine 600 W gücünde 9 kez 30 saniye boyunca mikrodalga enerjisi uygulanmıştır [24]. B-HAp kaplama için ise 10 mg/mL H_3BO_3 içeren 10xSBF çözeltisi (10xB-SBF) kullanılarak iskelelere HAp kaplama prosedürü uygulanmıştır [27] (**Şekil 3.2**).



Şekil 3.2. Üç boyutlu sponjin doku iskelelerinin HAp ve B-HAp kaplanmasına ve biyohibrit doku iskelelerinin üretimine ait şematik gösterim (BioRender.com ile oluşturulmuştur; https://BioRender.com).

Saf ve homojen bir kaplama elde etmek için kaplama basamakları 4 kez tekrarlanmıştır. Her kaplama işleminden sonra iskeleler istenmeyen fazları gidermek için 2 dk boyunca dH_2O ve etanol ile yıkanmıştır. Son kaplama işleminden sonra iskeleler, 30 dk boyunca dH_2O ve etanol ile yıkanarak gece boyunca -20°C'de dondurulmuştur. Dondurulan iskeleler -80°C'de liyofilizatörde (Christ, Almanya) 2 gün boyunca kurutulmuştur.

3.6. Sponjin Bazlı Biyohibrit Doku İskelelerinin Karakterizasyonu

Karakterizasyon çalışmaları kapsamında Sf, Sf/HAp ve Sf/B-HAp olmak üzere üç grup iskele kullanılmış ve iskelelerin kemik doku mühendisliği uygulamalarındaki kullanım potansiyelleri karşılaştırmalı olarak incelenmiştir. Doku iskelelerinin karakterizasyonu aşağıda detaylı olarak belirtilen analizler ile gerçekleştirilmiştir.

3.6.1. ATR-FTIR Analizi

Doku iskelelerinde fonksiyonel grupların varlığı ve iskelelerin kimyasal yapısı, 400-4000 cm^{-1} dalga sayısı aralığında ATR-FTIR analizi (Thermo Scientific, Nicolet 6700, ABD) ile incelenmiştir.

3.6.2. SEM Analizi

Üç boyutlu süngerimsi gözenekli iskelelerin morfolojik özelliklerini ve iskelelerdeki HAp ve B-HAp kaplamaların dağılımını incelemek için SEM analizi (Tescan, FIB-SEM, GAIA 3, Çek Cumhuriyeti) gerçekleştirilmiştir. Analiz öncesi iskeleler altın-paladyum ile kaplanmıştır. İskelelerin ortalama gözenek boyutları SEM analizleri sonucunda elde edilen görüntüler ile ImageJ programı kullanılarak farklı büyütmelerdeki 10 adet görüntü için belirlenmiş ve ortalama olarak hesaplanmıştır.

3.6.3. Termogravimetrik Analiz (TGA)

Biyohibrit iskelelerin ısısal karakteristik özellikleri EXSTAR 6000 TG/DTA 6300 (SII Nanotechnology Inc., Japonya) kullanılarak incelenmiştir. Örnekler, azot atmosferi altında, oda sıcaklığından 700°C'ye kadar, dakikada 10°C hızla ısıtılmış; elde edilen termogramlar kullanılarak kütle kaybı ve termal özellikleri analiz edilmiştir.

3.6.4. Diferansiyel Taramalı Kalorimetre (DSC) Analizi

İskelelerin HAp ve B-HAp kaplamalar varlığında termal özelliklerinin nitel karakterizasyonu DSC (Perkin Elmer, ABD) analizi ile belirlenmiştir. Azot atmosferinde ve 10°C.dk^{-1} ısıtma hızıyla kompozit iskeleler 0-400°C arasında ısıtılarak analiz gerçekleştirilmiştir.

3.6.5. Elementel Analiz

İskele yüzeylerindeki elementel bileşiminin tayin edilebilmesi için SEM cihazına takılı EDX mikroanalizörü ile SEM-EDX (Enerji Dağılımlı X-ışını Spektroskopisi) analizi yapılmıştır. İskeleler altın-paladyum ile kaplanarak analiz gerçekleştirilmiştir.

3.6.6. Şişme Analizi

Şişme analizi kapsamında **Bölüm 3.4'te** detaylı olarak anlatılan yöntem kullanılmış ve iskelelerin denge durumundaki su tutma kapasiteleri belirlenmiştir.

3.6.7. Mekanik Analizler

Doku iskelelerinin mekanik dayanımları sıkıştırma testi ile belirlenmiştir. Çapı 9 mm, yüksekliği 2 mm olmak üzere silindir şeklinde kesilen 3B örneklere sıkıştırma testi uygulanmıştır. Örnekler, ölçüm öncesinde 1 sa boyunca PBS (pH:7,4, 37°C) içerisinde bekletilmiştir. Sıkıştırma testi 50 N'luk yük ve 1,8 mm/dk sabit piston başlığı hızı ile gerçekleştirilmiştir. Analiz sonucunda örneklere ait sıkıştırma dirençleri (kPa) ve elastik modülleri (kPa) hesaplanmıştır.

3.6.8. *İn vitro* Biyobozunurluk Çalışması

Sponjin iskelelerin *in vitro* biyobozunurluk çalışmaları, 10 µg/mL lizozim içeren 10 mL PBS içerisinde gerçekleştirilmiştir. Ağırlığı 10 mg olacak şekilde tartılan örnekler, lizozimli PBS çözeltisi içeren 15 mL'lik santrifüj tüplerine konulmuş ve örnekler 37°C'de karıştırmalı ortamda bekletilmiştir. Bozunurluk ortamı haftada bir değiştirilerek örneklerin ağırlıkları 40 gün boyunca takip edilmiştir. Belirli günlerde örnekler tüplerden alınarak liyofilize (Christ, Almanya) edilmiş ve ardından kuru ağırlıkları kaydedilmiştir. Elde edilen bu kuru ağırlıklar kullanılarak, doku iskelelerinin kütlece değişimleri (%) Eşitlik-2 ile hesaplanmıştır.

$$\text{Kütlece değişim (\%)} = \frac{W_t - W_0}{W_0} \text{x} 100 \qquad \text{Eşitlik-2}$$

Eşitlikte W_t herhangi bir t anındaki doku iskelesinin kütlesini, W_0 doku iskelesinin başlangıç kütlesini ifade etmektedir.

3.6.9. Mikro-Bilgisayarlı Tomografi (Mikro-CT) Analizi

İskelelerin açık/kapalı gözenek yüzdeleri ve gözeneklilik özellikleri mikro-CT cihazı (Bruker, Skyscan 1272, Almanya) ve mikro-CT analizör yazılımı (CTAn, sürüm 1.13 SkyScan, Bruker, Belçika) kullanılarak değerlendirilmiştir.

3.7. *İn Vitro* Hücre Kültür Çalışmaları

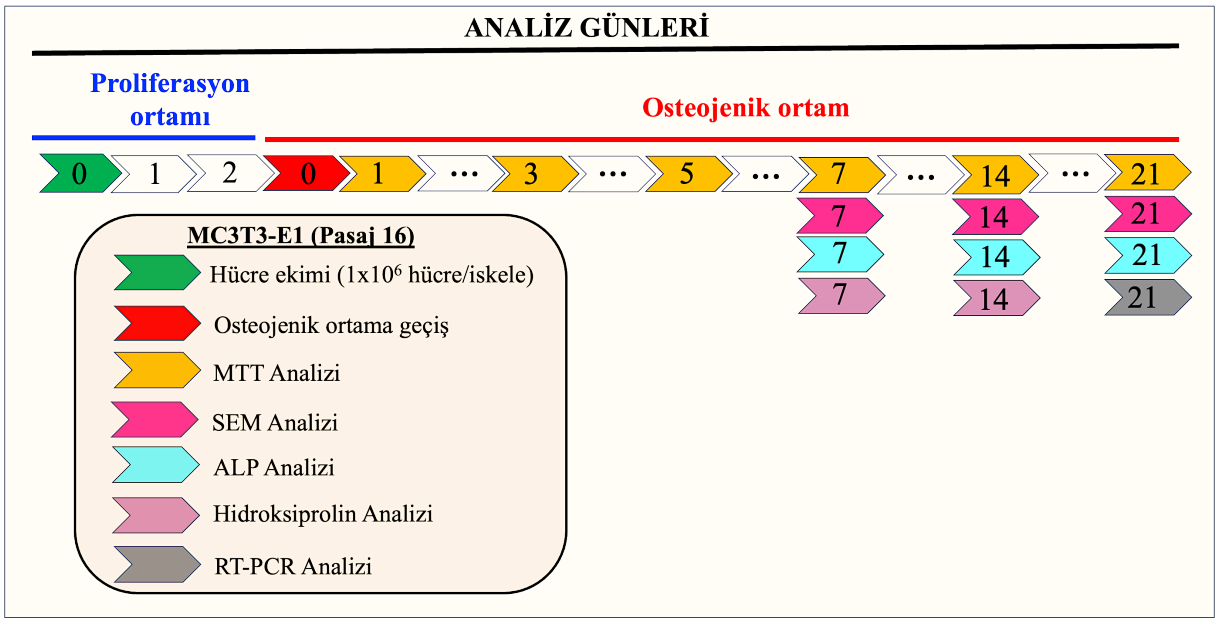
Hidroksiapatit ve bor katkılı hidroksipapatit kaplı sponjin doku iskelelerinin hücre canlılığına ve kemik dokuya farklılaşmaya etkisinin incelenebilmesi için 21 gün süren hücre kültür çalışmaları gerçekleştirilmiştir. Çalışmalar kapsamında üç farklı doku iskelesi kullanılmıştır, bu iskeleler: Sf, Sf/HAp ve Sf/B-HAp. Sterilizasyon işlemi için, çapı 9 mm ve kalınlığı 2 mm olacak şekilde kesilen iskeleler, %70 (h/h) etanol içerisinde vakum etüvünde çöktürülerek 1 sa bekletilmiştir. Ardından iskeleler steril koşullarda DPBS ile üç kez yıkanmış ve her yüzey için 1 sa olacak şekilde UV ışık altında bekletilmiştir. Tüm hücre kültür çalışmaları steril bir ortamda Tip II laminer akışlı kabin (Bioair, Type II Laminer Akış Kabini, İtalya) içerisinde gerçekleştirilmiştir.

3.7.1. MC3T3-E1 Hücreleri ile Yürütülen Hücre Kültür Çalışmaları

MC3T3-E1 preosteoblastik hücre hattı ile yürütülen hücre kültürü çalışmalarında, %10 (h/h) FBS, %1 (h/h) L-glutamin ve %1 (h/h) P/S içeren α-MEM proliferasyon ortamı kullanılmıştır. Steril doku iskeleleri bir gece boyunca proliferasyon ortamında bekletilerek şartlandırılmıştır. Ertesi gün iskeleler üzerindeki ortam çekilmiş ve iskeleler steril koşullarda kurumaya bırakılmıştır. Hücre ekimi için %90 doygunluğa ulaşan pasaj 15'deki hücreler 75T flasktan kaldırılmış ve hücrelerin $1x10^6$ hücre/iskele hücre yoğunluğunda (30 µL büyüme ortamı içerisinde) steril-kuru iskelelere ekimi gerçekleştirilmiştir. İskeleler, %5 CO_2 bulunduran 37ºC'deki inkübatörde 48 sa boyunca proliferasyon ortamında bekletilmiş ve ardından proliferasyon ortamı osteojenik ortam ile değiştirilmiştir.

3.7.2. Osteojenik Farklılaşma Çalışmaları

Farklılaşma çalışmalarında osteojenik ortam olarak 10 mM β-gliserol fosfat ve 50 µg/mL askorbik asit içeren proliferasyon ortamı kullanılmıştır. Kültür sürecinde osteojenik ortam 2 gün ara ile taze ortam ile yenilenmiştir. Hücre ekili iskeleler 21 günlük kültür süresi boyunca hücresel fonksiyonlar ve farklılaşma belirteçleri açısından takip edilmiştir. Bu kapsamda aşağıda ayrıntılı olarak anlatılan analizler gerçekleştirilmiş olup analiz günlerine ait akış şeması **Şekil 3.3**'te sunulmuştur.



Şekil 3.3. Hücre kültürü çalışmalarının akış şeması.

3.7.3. MTT Analizi

Kültürün 1., 3., 5., 7., 14. ve 21. günlerinde hücrelerin üreme ve canlılık özellikleri MTT (3-[4,5-dimetiltiazol-2-il]-2,5-difeniltetrazolyum bromür) analizi ile incelenmiştir. Kısaca, belirlenen günlerde örnekler üzerindeki kültür ortamı aspire edilmiş, örnekler yeni bir 24-gözlü TCPS'e aktarılmış ve ardından her bir örneğe 600 µL serum içermeyen kültür ortamı ve 60 µL MTT (2,5 mg/mL, DPBS içinde) çözeltisi eklenmiştir. Örnekler 37°C'de 3 sa inkübe edildikten sonra MTT içeren ortam uzaklaştırılmış ve elde edilen mor formazan kristallerini çözmek için her bir örneğe 400 µL izopropanol çözeltisi (0,04 M HCl içeren) eklenmiştir. Elde edilen mor renkli çözeltiden 200 µL alınarak, 96-gözlü TCPS'e aktarılmış ve çözeltinin absorbansı 570 nm'de (690 nm referans dalga boyu ile) UV spektrofotometre (Labomed Double Beam UV-görünür spektrofotometre, ABD) kullanılarak ölçülmüştür.

3.7.4. SEM Analizi

MC3T3-E1 hücrelerinin iskeleler üzerindeki morfolojisi ve tutunması, SEM analizi ile gözlemlenmiştir. Kültürün 7., 14. ve 21. günlerinde, hücre ekilmiş iskeleler gluteraldehit (2.5%, v/v) ile karanlıkta 30 dk süreyle fikslenmiş ve üç kez PBS ile yıkanmıştır. Ardından, iskeleler etanol serisi (hacimce %30, %50, %70, %90 ve %100) ile 2 dk süreyle

dehidre edilmiştir ve 5 dk boyunca heksametildisilazan (HMDS) ile muamele edilmiştir. Daha sonra, örnekler bir gece boyunca kurutulmuş ve SEM görüntülemesi için altın-paladyum ile kaplanmıştır.

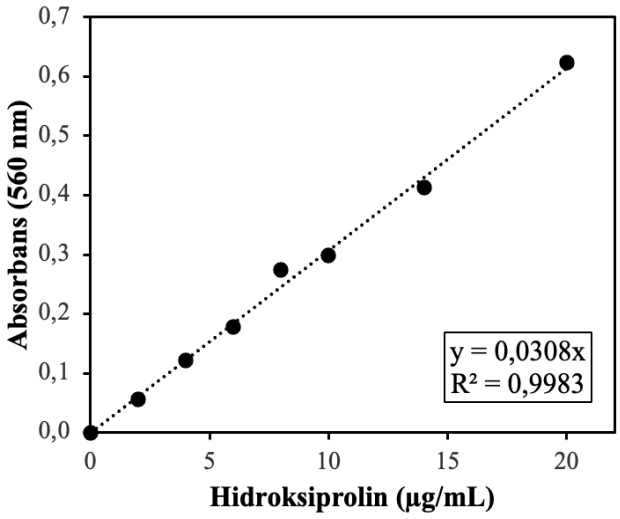
3.7.5. ALP Aktivitesinin Tayini

MC3T3-E1 hücreleri fare kalvaryum dokusundan izole dilen kemik öncül hücrelerdir. Bu hücrelerin kemiğe farklılaşması osteojenik farklılaşmanın erken dönem belirteçlerinden biri olan alkalin fosfataz (ALP) analizi ile tayin edilmiştir. Alkalin fosfataz, fosfat esterlerinin hidrolizini katalizleyen bir enzim olup kemik matriksi mineralizasyonunda önemli bir role sahiptir. Hücrelerin ALP aktiviteleri, kültürün 7., 14. ve 21. günlerinde pNPP'nin p-nitrofenol (pNP)'e hidrolizi ile analiz edilmiştir. Belirlenen günlerde, iskeleler üzerindeki ortam çekilmiş ve analiz gününe kadar iskeleler -80ºC'de muhafaza eilmiştir. Örnekler analiz öncesi dondurarak-kurutma cihazında kurutularak ağırlıkları not edilmiş ve steril mikromakasla küçük parçalara ayrılmıştır. Örnekler, -20ºC'de 500 µL lizis çözeltisi (0,1% (h/h) Triton-X-100 çözeltisi) içinde dondurulmuştur. Hücre zarlarının tamamen parçalanması için üç kez dondurup çözme işlemi uygulanmıştır. Son dondurup çözme işleminin ardından, örnekler buzlu su içinde 10 dk boyunca homojenize edilmiştir. Ekstraktlar, 2 000 rpm'de 10 dk süreyle santrifüjlenmiştir. Örneklerden 50 µL süpernatan alınarak 96-gözlü TCPS'lerde 50 µL ALP çözeltisi (1 mM $MgCl_2$ ve 56 mM 2-amino-2-metil-1-propanol içeren 10 mL p-nitrofenil fosfat sıvı substrat sistemi) ile karıştırılmış ve karışım 37°C'de 30 dk inkübe edilmiştir. İnkübasyonun ardından, her bir göze 50 µL 1 N NaOH eklenerek reaksiyon durdurulmuştur. Mikroplaka okuyucu ile 405 nm'de örneklerin spektrofotometrik olarak absorbansları ölçülmüştür. Ölçülen absorbans değerleri MTT değerlerine bölünerek canlılık bazında ALP aktivitesi belirlenmiştir.

3.7.6. Hidroksiprolin Analizi

Kolajen sentezi hücrelerin erken dönem farklılaşmasında artış göstermektedir. İnsan vücudunda hidroksiprolin (Hyp) sadece kolajende bulunur ve kolajenin yaklaşık %10'unu oluşturur [220]. Kolajen sentezi sırasında pirolin, kolajenin polipeptit prekürsörüne bağlanarak sentezin son aşamasında hidroksillenir ve hidroksiproline dönüşür. Hidroksiprolin analizi dokudaki kolajen miktarını tayin edebilmek için

kullanılan indirekt bir yöntemdir. Tez kapsamında hücreler tarafından sentezlenen kollajen miktarı, standart kalibrasyon eğrisi ile hidroksiprolin testi kullanılarak analiz edilmiştir. Kültürün 7. ve 14. günlerinde örnekler üzerindeki ortam uzaklaştırılmış ve örnekler steril Eppendorf tüplerine alınmıştır. Analizden iki gün önce örnekler liyofilizatörde kurutulmuş ve sonrasında kuru ağırlıkları ölçülmüştür. Hidroksiprolin miktarının hesaplanmasında kullanılan kalibrasyon grafiğini oluşturmak için 0-20 µg aralığında hidroksiprolin standart çözeltileri hazırlanmıştır. Analiz aşamasında kuruyan örnekler küçük parçalar halinde kesilmiş ve her bir örneğe 200 µL 2 M NaOH eklenmiştir. Böylece örnekler hidrolize edilmiştir. Ardından, örnekler 121°C'de 15 dk otoklavlanmıştır. Böylece örnekler hidrolize edilmiştir. Her bir örnekten 50 µL süpernatan alınarak 450 µL 0,059 M Kloramin T reaktanı ile karıştırılmış ve hidroksiprolinin pirole oksidasyon reaksiyonun gerçekleşmesi için oda sıcaklığında 25 dk inkübe edilmiştir. Inkübasyon sonunda örneklere ve hidroksiprolin standart çözeltilerine 500 µL 1 M Ehrlich reaktantı eklenmiş ve karışım 65°C'de 20 dk inkübasyona bırakılmıştır. Sıcaklık oluşan pirol ile Ehrlich reaktantında bulunan p-dimetil amino benzaldehitin reaksiyona girmesini indüklemiş ve sonuçta renkli çözeltiler elde edilmiştir. Çözeltilerden 200 µL alınıp 96-gözlü TCPS'lere aktarılmış ve çözeltilerin absorbansı UV spektrofotometre kullanılarak 560 nm dalga boyunda ölçülmüştür. Elde edilen veriler ve kalibrasyon **Şekil 3.4**'te verilen eğrisi kullanılarak iskelelerdeki toplam Hyp miktarları hesaplanmıştır. Bu değerler iskele kuru ağırlığına bölünerek gram başına Hyp miktarları (µg Hyp/g iskele) belirlenmiştir.



Şekil 3.4. Hidroksiprolin kalibrasyon grafiği (560 nm).

3.7.7. Gerçek Zamanlı Polimeraz Zincir Reaksiyonu ile Gen İfadesi Analizi

Osteojenik farklılaşmanın moleküler düzeyde incelenmesi amacı ile kültürün 21. gününde gerçek zamanlı polimeraz zincir reaksiyonu (RT-PCR) analizi gerçekleştirilmiştir. Osteojenik farklılaşma, geç dönem farklılaşma belirteçleri osteokalsin (*Ocn*) ve tip I kolajen (*Col1a1*) gen ifadeleri ile takip edilmiştir. RT-PCR çalışmalarında kontrol geni (housekeeping gen) olarak *β-aktin* kullanılmış ve *β-aktin* genine göre normalize edilen gen ifadeleri ve $2^{-\Delta\Delta Ct}$ yöntemi ile bağıl olarak belirlenmiştir. Sf grubu kontrol grubu olarak alınmış ve gen seviyeleri kontrol grubunun katları şeklinde ifade edilmiştir. Çalışma kapsamında kullanılan primerlere ait diziler **Çizelge 3.2**'de verilmiştir.

Çizelge 3.2. RT-PCR analizinde kullanılan primer dizileri.

Gen bölgeleri		Primer dizileri
β-aktin	**Forward**	5'-CACCATTGGCAATGAGCGGTTC-3'
	Reverse	5'-AGGTCTTTGCGGATGTCCACGT-3'
Ocn	**Forward**	5'-CTTTCTGCTCACTCTGCTG-3'
	Reverse	5'-TATTGCCCTCCTGCTTGG-3'
Col1a1	**Forward**	5'-CAAGATGTGCCACTCTGACT-3'
	Reverse	5'-TCTGACCTGTCTCCATGTTG-3'

Kültürün 21. gününde iskeleler üzerindeki ortam aspire edilmiş ve örnekler steril Eppendorflar içersisinde analiz gününe kadar -80ºC'de saklanmıştır. Analiz gününde örnekler oda sıcaklığına getirildikten sonra steril mikro makas yardımıyla küçük parçalar halinde kesilmiştir. Ardından, RNeasy Mini Kiti (RNeasy Mini Kit, Qiagen, Almanya) kullanarak Trizol yöntemi ile mRNA izolasyonu gerçekleştirilmiştir. Yöntem kapsamında küçük parçalar haline getirilen örneklere 500 µL trizol eklenmiş ve hücrelerin lizize uğraması ile hücre zarının bozunması ve hücre içeriklerinin serbest kalması sağlanmıştır. Örnekler vorteklenmiş ve 5 dk inkübasyon sonrasında örneklere 100 µL kloroform ilave edilmiştir. Elde edilen karışım alt-üst edilerek karıştırılmış ve 5dk oda sıcaklığında bekletilmiştir. Ardından 13 000 rpm'de 15 dk santrifüj işlemi yapılmış ve santrifüj sonrası üstteki şeffaf RNA fazı alınarak steril bir Eppendorfa aktarılmıştır. Örnekler üzerine %70'lik (h/h) etanol ilave edildikten sonra Qiagen RNAeasy mini kiti ile RNA izolasyonuna devam edilmiştir. Bu aşamada kite ait protokol uygulanmış ve oda

sıcaklığında çalışılmasına dikkat edilmiştir. Kolondan RNA free su ile kapaklı tüplere toplanan RNA örnekleri cDNA sentez gününe kadar -80ºC'de muhafaza edilmiştir. Elde edilen RNA miktarı ve kalitesi Nanodrop cihazında 260 nm dalga boyunda tayin edilmiştir. Kalitesi ve miktarı belirlenen RNA'lardan reverse transkripsiyon ile cDNA sentezi aşaması yüksek kapasiteli cDNA reverse transkripsiyon kiti (Applied Biosystems Kit cDNA, ABD) kullanılarak SimpliAmpTM termal kontrol cihazında (Life Technologies, ABD) gerçekleştirilmiştir. Cihazın sıcaklık profili cDNA sentezi için 10 dk 25°C (10 dk), 37°C (120 dk) ve 85°C (5 dk) olacak şekilde üç aşamaya ayarlanmıştır. cDNA sentezinin ardından PCR analizi gerçekleştirilmiş ve analiz Light Cycler NanoInstrument (Roche, İsviçre) cihazında 5X HOT FIREPol EvaGreen qPCR Mix Plus kullanılarak kit protokolüne göre yürütülmüştür. PCR analizi, aktivasyon (95˚C'de 15 dk), uzatma (95˚C'de 15s, 60˚C'de 20s, 72˚C'de 20s) ve ayrılma (60˚C'de 4s ve 95˚C'de 20s) basamaklarından oluşan 45 döngü üzerinden yürütülmüştür.

3.7.8. Histolojik Boyamalar

Doku iskeleleri üzerindeki MC3T3-E1 hücrelerinin osteojenik farklılaşma ve mineralizsyon kapasitesini ve gözlemleyebilmek için "Hematoksilen&Eozin", "ALP", "Alizarin Red" ve "Von Kossa" boyama yapılmıştır. Boyamalar kapsamında kültürün 21. gününde iskeleler üzerindeki ortam aspire edilmiş ve iskeleler 2 kez DPBS ile yıkanmıştır. Yıkama işeminin ardından iskeleler karanlıkta %4'lük (h/h) paraformaldehit çözeltisi içerisinde 45 dk bekletilerek fiksasyon işlemi gerçekleştirilmiştir. Analiz öncesi iskeleler dehidrasyon işlemine tabi tutulmuştur. Bu amaçla aşağıdaki basamaklar uygulanmıştır:

Dehidrasyon

- Fikse edilen doku iskeleleri histoloji kasetleri içerisine yerleştirilmiştir.
- Kasetler 30 dk süresince %70'lik (h/h) etanolde bekletilmiştir.
- Otuz dk sonunda kasetler %70'lik (h/h) etanolden çıkarılarak %95'lik (h/h) etanol içerisine alınmış ve 30 dk bekletilmiştir. Bu işlem iki kere tekrarlanmıştır.
- Ardından kasetler 30 dk süresince %100'lük (h/h) etanol içerisinde bekletilmiş ve bu işlem yeni etanol çözeltileri ile iki kere daha tekrarlanmıştır.

- Etanol serilerinin ardından kasetler ksilen içerisine aktarılmış ve 30 dk bekletilmiştir. Kasetler yeni ksilen çözeltileri içerisine alınarak yeniden 30 dk bekletilmiş ve bu işlem bir kere daha olmak üzere toplamda 3 kez tekrarlanmıştır.

Etanol ve ksilen basamaklarının tamamlanması ile dehidrasyon tamamlanmış ve kasetler 1 gece parafin içerisinde bekletilmiştir. Bir gün sonra kasetler içerisindeki doku iskeleleri parafin içerisine gömülmüş ve parafinin sertleşmesi için -20ºC'de bekletilmiştir. Ardından, mikrotom (Leica, Almanya) ile 5 µm kalınlığında kesitler alınmış ve bu kesitler deparafinizasyon için aşağıdaki işlemlere tabi tutulmuştur:

Deparafinizasyon

- Kesitler 4 dk ksilende bekletilmiş ve bu işlem iki kere tekrarlanmıştır.
- Kesitler %100'lük (h/h) etanollerde sırasıyla 2 dk ve 3 dk bekletilmiştir.
- Ardından, %95'lik (h/h) etanolde 1 dk ve %70'lik (h/h) etanolde 1 dk bekletilmiştir.
- Etanol serilerinin ardından kesitler deiyonize suda 2 dk bekletilmiştir.

Deparafinizasyon işleminin tamamlanmasının ardından "Hematoksilen&Eozin (H&E)", "ALP", Alizarin Red" ve Von Kossa" boyamaları için kesitlere aşağıdaki işlemler uygulanmıştır.

H&E boyama

Kesitler,

- Yüzde 95, %80, %70 ve %60 (h/h) etil alkol serilerinde 2'şer dakika bekletilmiş ve 5 dk boyunca saf su ile yıkanmıştır.
- Yıkama işleminin ardından 5 dk süresince Hematoksilen boya çözeltisinde bekletilmiş ve sonrasında tekrar 5 dk saf su ile yıkanmıştır.
- Eozin boya çözeltisine alınarak 3 dk boyunca bekletilmiş ve bir kez daha saf su ile 5 dk yıkanmıştır.
- Birer dk süresince sırasıyla %80'lik (h/h) ve %95'lik (h/h) alkol çözeltileri içerisinde bekletilmiştir.
- Son olarak 1 sa ksilen içerisinde bekletilmiş ve kurumaya bırakılmıştır.

H&E boyamada hücre çekirdekleri mor, sitoplazma ve kolajen lifleri ise pembe renkte görüntülenmiştir.

ALP boyama

- Kesitler Vector Blue subsrat kitindeki (Vector Laboratories, ABD) protokol uygulanarak boyanmıştır. Bu kapsamda kesitler kit içerisindeki çözelti içerisinde 1 sa boyunca inkübe edildikten sonra optik mikroskop (Keyence BZ-X700, Itasca, IL, ABD) ile görüntülenmiştir.

Alizarin Red boyama

- Kesitler deiyonize suda bekletildikten sonra %2'lik (k/h) Alizarin Red (Fisher Scientific, ABD) çözeltisi içerisine alınarak 5 dk bekletilmiştir.
- Boyanmış kesitler deiyonize su ile tekrar yıkanmış ve kurumaya bırakılmıştır.
- Ardından kuruyan kesitler optik mikroskop (Olympus) kullanılarak analiz edilmiştir. Hücre içermeyen iskeleler negatif kontrol olarak kullanılmıştır.

Von Kossa boyama

Kesitler,

- Gümüş nitrat (%1'lik (k/h)) çözeltisi içerisine alınarak 1 sa UV ile muamele edilmiştir.
- Deiyonize suda ikişer dk süre ile birkaç kez yıkanmış ve %5'lik (k/h) sodyum tiyosülfat çözeltisinde 5 dk bekletilerek reaksiyona girmeyen gümüş nitrat uzaklaştırılmıştır.
- Yeniden deiyonize su ile yıkanmış ve Eozin çözeltisinde 1 dk süresince bekletilerek boyama işlemi gerçekleştirilmiştir.
- Ardından, dehidrasyon için %100, %95 ve %70'lik (h/h) alkol serilerinde ve ksilende bekletilmiştir.
- Boyanmış kesitler tekrar deiyonize suda yıkanmış ve kurumaya bırakılmıştır.
- Kuruyan kesitler, optik mikroskop (Olympus) ile incelenmiş ve örnekler mineralizasyon açısından değerlendirilmiştir. Negatif kontrol grubu olarak hücre içermeyen doku iskeleleri kullanılmıştır.

3.8. *İn Vitro* Bakteri Kültürü Çalışmaları

Bakteri kültür çalışmaları kapsamında CLSI (Clinical and Laboratory Standards Institute) standartları çerçevesinde agar difüzyon ve optik yoğunluk yöntemleri kullanılarak Sf, Sf/HAp ve Sf/B-HAp doku iskelelerinin antibakteriyel aktiviteleri incelenmiştir. Bu yöntemlerde model suşlar olarak Gram pozitif bakteri suşlarından *Staphylococcus aureus* (*S. aureus*, ATCC 25923) ve Gram negatif bakteri suşlarından *Escherichia coli* (*E. coli*, ATCC 25922) kullanılmıştır.

Agar difüzyon yöntemi Mueller Hinton Agar (MHA) ortamında gerçekleştirilmiştir. Bu kapsamda, ilk olarak bakteri kültür çalışmalarında kullanılacak biyohibrit doku iskeleleri 1 sa %70 (h/h)'lik etanol ve 1 sa UV ışını (her yüzey) ile muamele edilerek sterilize edilmiştir. İlk olarak, 20 ml steril MHA (Conda, İspanya) steril Petri kaplarına dökülmüş ve katılaşmaya bırakılmıştır. Ardından, 0.5 McFarland bulanıklık standartlarına eşdeğer konsantrasyona sahip bakteri süspansiyonu, MHA petri kaplarına uniform olarak ekilmiştir. Sterilize edilmiş iskeleler peti kaplarının ortasına yerleştirilmiş ve 37°C'de 8 sa inkübe edilmiştir. İnkübasyon sonunda örneklerin etrafındaki inhibitör bölgelerin çapı ölçülmüş ve dijital kamera ile görüntülenerek antibakteriyel etkinlikleri incelenmiştir [221]. Bu yöntem, iki model bakteri suşu ile tekrarlanmıştır.

Optik yoğunluk yöntemi ise Mueller Hinton Broth (MHB) ortamında gerçekleştirilmiştir. Bu kapsamda da benzer şekilde, ilk olarak bakteri kültür çalışmalarında kullanılacak olan doku iskeleleri 1 sa %70 (h/h)'lik etanol ve 1 sa UV ışını (her yüzey) ile muamele edilerek sterilize edilmiştir. Daha sonra, her iki bakteri suşu için 2 mL MHB büyüme ortamı steril tüplere alınmış ardından 0.005 g/mL sponjin iskeleler eklenmiştir. Tüplere daha sonra 100 µL taze bakteri kültürü (0.5 MacFarland konsantrasyonda) eklenerek 37°C'de çalkalamalı etüvde 8 sa inkübe edilmiştir. Doku iskelesi içermeyen bakteri süspansiyonu kontrol grubu olarak kullanılmıştır. Ortamın bulanıklığı, UV spektrofotometre (Thermo Fisher Scientific, ABD) kullanılarak 610 nm'de çeşitli zaman aralıklarında nicel olarak belirlenmiş ve sponjin iskelelerin aktibakteriyel aktiviteleri elde edilen büyüme eğrileri değerlendirilerek incelenmiştir [222]. Bu yöntem, iki model bakteri suşu ile tekrarlanmıştır.

KISIM II

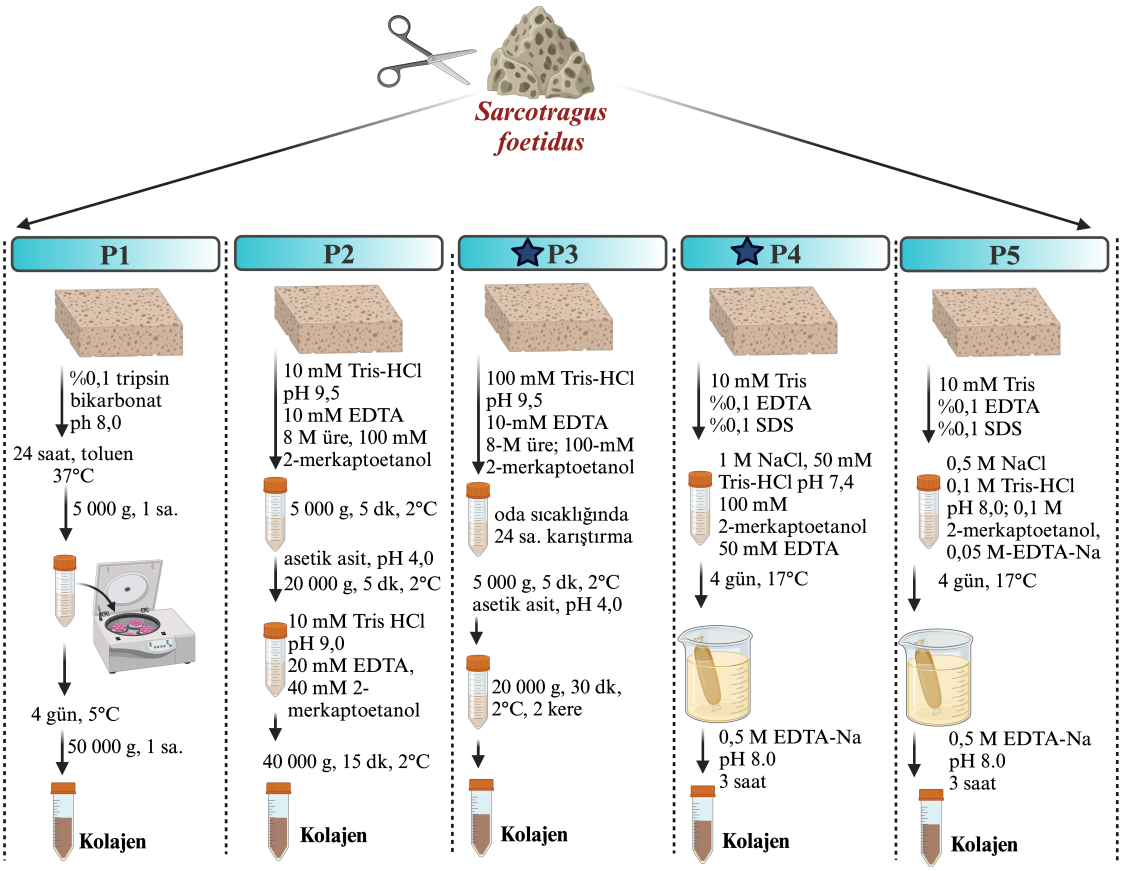
Kolajen, hayvanlar aleminde en bol bulunan proteindir ve özellikle çeşitli fibrilsel ağların oluşumunda yer alarak, dokuların yapısal bütünlüğünü sağlamaktadır. Kolajen düşük immünojenitesi ve mekanik özellikleri sayesinde doku mühendisliği ve rejeneratif tıp çalışmalarında biyomateryal olarak sıklıkla kullanılmaktadır. Deniz süngeleri (Porifera), en eski metazoan gruptur ve diğer hayvan gruplarından farklı olarak, basit bir organizasyon seviyesine sahiptirler. Süngerler gerçek doku ve organlara sahip değildirler ve yalnızca uzmanlaşmış hücre tipleri (örneğin, choanositler ve pinaositler) tarafından oluşmuşlardır. Bu hücreler, *Demospongiae* sınıfında sponjin olarak adlandırılan kolajenle zengin karmaşık 3B matriks ağına gömülüdür. Bu ağ, proteoglikanlar, glikoproteinler, kolajen fibrilleri ve büyük yapılara eşlik edebilen ince kolajen mikrofilamentlerinden oluşmaktadır. Moleküler düzeyde hala yeterince karakterize edilmemiş olmasına rağmen, sponjin ekstratları memeli hücre tutunması, göçü ve osteoprogenitor hücrelerin proliferasyonu için uygun bir iskelet sağlamaktadır.

Tez çalışması kapsamında yumuşak doku mühendisliği uygulamalarında kullanılabilecek deniz süngeri kaynaklı kolajen molekülünün izole edilmesi hedeflenmiştir. Bu amaçla, farklı formülasyonlarla izolasyon işlemleri gerçekleştirilmiş, en yüksek verimi sağlayan yöntem belirlenmiş ve izole edilen molekülün fiziksel ve kimyasal özellikleri detaylı olarak analiz edilmiştir. Deneysel çalışmaların ayrıntıları aşağıda verilmiş olup çalışmanın **özgün** değerleri şu şekildedir:

1. Bu çalışmada, literatürdeki mevcut yöntemlere alternatif olarak geliştirilen yeni formülasyon sayesinde, yenilenebilir ve doğal bir kaynak olan *Sarcotragus foetidus* süngerinden kolajen **ilk** kez başarıyla izole edilmiştir.
2. Çalışma kapsamında detaylı ve kapsamlı bir şekilde analizleri tamamlanan sünger kolajeninin ilerleyen çalışmalarda piyasadaki mevcut hayvansal kolajenlere alternatif olarak piyasaya sunulup ticarileştirilmesi hedeflenmiştir.

3.9. *Sarcotragus foetidus* Sünger Kolajenin İzole Edilmesi

Literatürde deniz süngerinden kolajen izolasyonu için farklı protokoller bulunmakta olup bu protokollerin ayrıntıları izolasyon basamakları ile birlikte **Şekil 3.5**'te sunulmuştur [223-227]. Protokollerde izolasyon süresinin yaklaşık 4 gün olduğu görülmektedir. Bu süreyi kısaltmak ve izolasyon verimini artırmak çalışma kapsamında hedeflenmiş ve bu amaç için literatür araştırmaları doğrultusunda modifiye bir yöntem geliştirilmiştir.



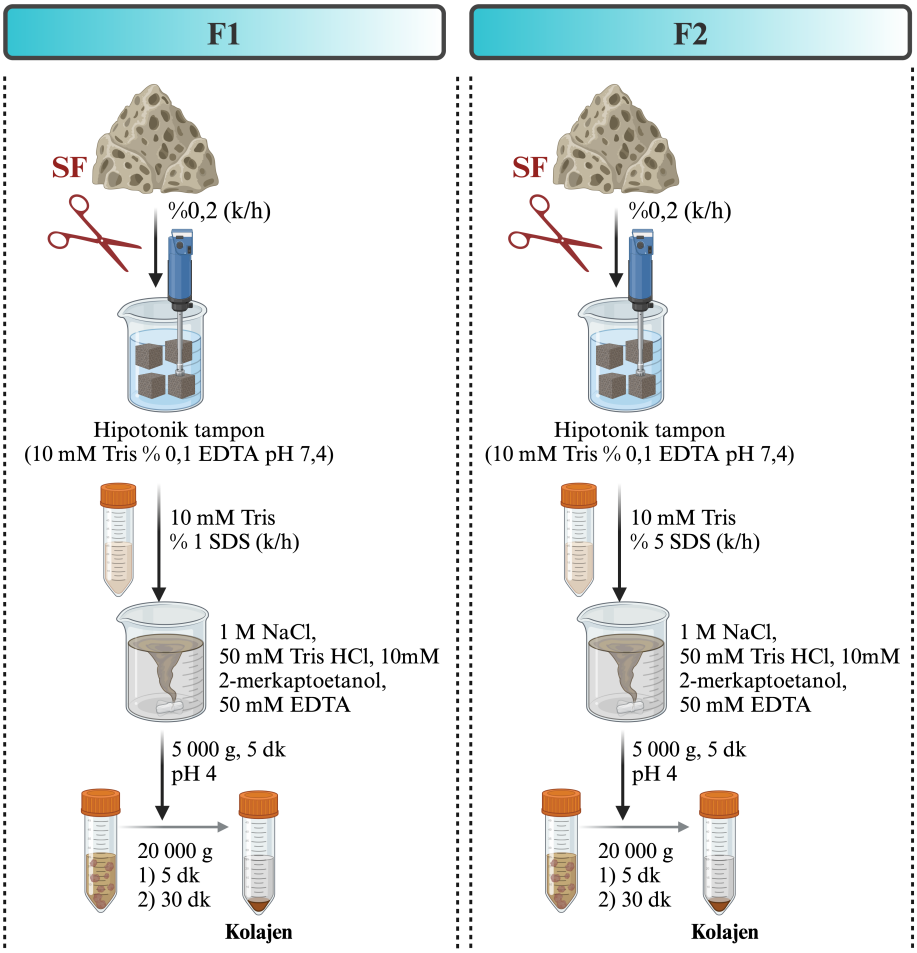
Şekil 3.5. Kolajen izolasyonu için literatürde kullanılan protokoller (yıldız işareti geliştirilen modifiye yöntemde temel alınan formülasyonları ifade etmektedir) (BioRender.com ile oluşturulmuştur; https://BioRender.com).

Tez kapsamında dondurarak kurutma yöntemi ile muhafaza edilen *Sarcotragus foetidus* süngerinden kolajen izolasyonu için **Şekil 3.5**'te üçüncü (P3) ve dördüncü (P4) protokoller modifiye edilerek uygulanmıştır. Bu yöntemde hücresizleştirme ajanı olarak literatürle uyumlu olan iki farklı sodyum dodesil sülfat (SDS) konsantrasyonu seçilerek

tris-buffer ve üre tampon çözeltileri kullanılmıştır (F1 ve F2). Yöntemin detayları aşağıda verilmiş olup **Şekil 3.6**'da şematize edilmiştir:

- Süngerler üç kez musluk suyu ile yıkanmış ve küçük parçalar halinde kesilerek %0,2 (k/h) oranında olacak şekilde hipotonik bir tamponda (pH 7,4; 10 mM Tris; kütlece %0,1 EDTA) homojenize edilmiştir.
- Ardından, oda sıcaklığında hücresizleştirme solüsyonu (10 mM Tris; kütlece % 1-5 SDS) ile yıkananıp PBS içerisine alınmıştır.
- PBS içerisinde birkaç kez yıkama işleminden sonra, çözelti dağıtıcı bir çözelti (1 M NaCl; 50 mM Tris-HCl; pH 7,4; 100 mM 2-merkaptoetanol; 50 mM EDTA) ile değiştirilmiştir.
- Çözelti oda sıcaklığında 4 sa karıştırıldıktan sonra 2°C'de 5 000 g'de 5 dk santrifüjlenmiştir. Pellet atılarak elde edilen supernatantın pH'ı asetik asit ile 4'e ayarlanmıştır.
- Ardından, 2°C'de 20 000 g'de 5 dk santrifüjleme işlemi yapılmıştır
- Santrifüjleme sonrasında elde edilen çökelti saf su içinde süspanse edilerek santrifüjleme işlemi tekrarlanmıştır. (20 000 g; 30 dk; 2°C).

Çalışmalarda yüksek dönme gücü gerektiren santrifüjleme basamakları Hacettepe Üniversitesi Kimya Bölümü Öğretim Üyesi Prof. Dr. Adil Denizli'ye ait araştırma laboratuvarında gerçekleştirilmiştir.



Şekil 3.6. Tez çalışması kapsamında kullanılan kolajen izolasyon protokolleri (BioRender.com ile oluşturulmuştur; https://BioRender.com)

3.10. Sünger Kolajeninin Karakterizasyonu

Sarcotragus foetidus süngerinden F1ve F2 formülasyonları kullanılarak izole edilen kolajenin karakterizasyonu aşağıda belirtilen analizler ile gerçekleştirilmiştir.

3.10.1. Optik Mikroskop ile Analiz

Sünger kolajeninin morfolojik özellikleri ters ışık mikroskobu (Olympus IX73, A.B.D.) ile belirlenmiştir.

3.10.2. SEM Analizi

Sünger kolajeninin morfolojisi ters ışık mikroskobuna ek olarak SEM (GAIA3, Tescan, Czech Republic) ile de incelenmiştir. Bu kapsamda **Bölüm 3.6.2**'de belirtilen protokol uygulanmış ve örnekler altın-palladyum ile kaplanarak farklı büyütmelerde görüntülenmiştir.

3.10.3. Kimyasal Özelliklerin Belirlenmesi

Kolajen örneklerinin kimyasal yapısı, 400-4000 cm^{-1} dalga boyu aralığında ATR-FTIR cihazında (Thermo Scientific Nicolet iS10, A.B.D.) ATR tekniği kullanılarak tespit edilmiştir.

3.10.4. Kristalografik Özelliklerin Belirlenmesi

Kolajen örneklerinin kristalografik özellikleri X-Işını kırınım yöntemi (XRD) ile analiz edilmiştir. XRD ölçümü Hacettepe Üniversitesi Fizik Mühendisliği bölümü emekli öğretim üyesi Prof. Dr. Şadan Özcan'ın araştırma laboratuvarında 1°/dk tarama hızı ile 0°-80° tarama aralığında gerçekleştirilmiştir.

3.10.5. Termal Özelliklerin Belirlenmesi

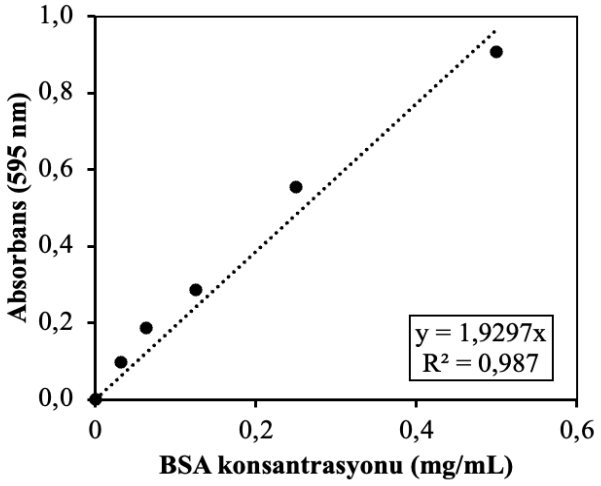
Kolajen örneklerinin termal özelliklerinin belirlenebilmesi için örnekler 10°C.dk^{-1} hızla azot atmosferinde 25°C'den 600°C'ye kadar ısıtılarak EXSTAR 6000 TG/DTA 6300 (SII Nanotechnology Inc., Japonya) ve Diamond DSC (Perkin Elmer, ABD) cihazları ile incelenmiştir. Elde edilen termogramlardan, örneklere ait kütle kayıpları ve ısısal özellikler tespit edilmiştir.

3.10.6. Toplam Protein Miktarının Belirlenmesi

Toplam protein miktarı "Bradford Protein Testi" kullanılarak spektrofotometrik ölçümlerle hesaplanmıştır. Bradford protein tayininde boya reaktifleriyle renk üretimi proteinlerdeki belirli bazik amino asitlerin (başlıca arginin, lizin ve histidin) varlığıyla

ilişkilendirilmektedir. Van der Waals kuvvetleri ve hidrofobik etkileşimler boyanın protein tarafından bağlanmasına katılmaktadır. Protein molekülüne bağlanan boya ligandlarının sayısı, proteindeki pozitif yüklerin sayısıyla yaklaşık olarak orantılıdır. Protein çözeltisiyle karıştırıldığında, asidik boya reaktifi, örnekteki protein miktarı ile orantılı olarak kahverengiden maviye renk değiştirir. Serbest amino asitler, peptitler ve düşük molekül ağırlıklı proteinler, boya reaktifleriyle renk üretmez. Genel olarak, ölçüm alınabilmesi için bir peptit veya proteinin kütlesinin en az 3 000 Da olması gerekmektedir.

Protein miktarlarının belirlenmesi için ilk aşamada BSA ile protein stok çözeltisi hazırlanmıştır. Ardından stok çözelti PBS ile seyreltilmiş ve farklı derişimlerde BSA dilüsyon seti oluşturularak protein standartları hazırlanmıştır. Kütlece %20'lik 200 µL Bradford boyası 10 µL standart ve kollajen örnekleri ile karıştırılmıştır. Oda sıcaklığında 10 dk inkübasyon sonrasında 595 nm'de UV spektrofotometre (Labomed Double Beam UV-görünür spektrofotometre, ABD) ile çözeltilerin absorbans ölçümü gerçekleştirilmiştir. Farklı derişimlerdeki BSA standart çözeltileri ile oluşturulan kalibrasyon grafiği (**Şekil 3.7**) kullanılarak ölçüm sonuçlarından örneklere ait toplam protein konsantrasyonları hesaplanmıştır.



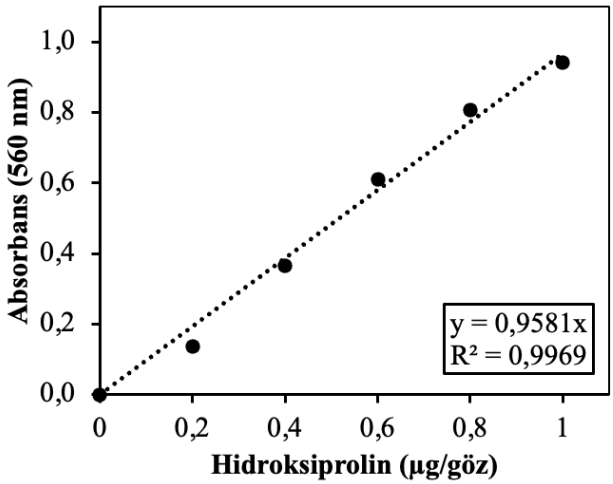
Şekil 3.7. BSA kalibrasyon grafiği (595 nm).

3.10.7. Hidroksiprolin Analizi

İzole edilen kolajen örneklerinin hidroksiprolin içerikleri kantitatif olarak Hidroksiprolin assay kiti (Invitrogen, ABD) ile belirlenmiştir. Kit kapsamında hidroksiprolin

konsantrasyonu, oksitlenmiş hidroksiprolinin 4-(Dimetilamino) benzaldehit (DMAB) ile reaksiyonu sonucu oluşan ve mevcut hidroksiproline orantılı olan kolorimetrik (560 nm) ürün ölçülerek hesaplanmıştır.

Analiz için ilk aşamada kit içeriğindeki 1 mg/mL hidroksiprolin standart çözeltisinden 10 µL alınmış ve 90 µL saf su ile seyreltilerek 0,1 mg/mL standart çözelti hazırlanmıştır. Daha sonra 96-gözlü plakalara 0,1 mg/mL hidroksiprolin standart çözeltisinden sırasıyla 0, 2, 4, 6, 8 ve 10 µL eklenmiş ve 0 (boş), 0,2, 0,4, 0,6, 0,8 ve 1,0 µg/göz standartları oluşturulmuştur. On mg kolajen örnekleri 100 µL saf su ile homojenize edilmiştir. Örnekler ve standart çözeltiler üzerine 100 µL konsantre hidroklorik asit (HCl, 12 M) eklenmiş ve 120°C'de 3 saat bekletilerek hidrolize edilmiştir. Hidrolizasyon sonunda süpernatanlar 10 µL olarak 96-gözlü plakaya aktarılmış ve 60 °C'lik etüvde vakum altında tamamen kurutulmuştur. Ardından her örneğe 100 µL kloramin T/oksidasyon tamponu karışımı (6 µL kloramin T/94 µL oksidasyon tamponu) eklenmiş ve örnekler oda sıcaklığında 5 dk inkübe edilmiştir. Sonrasında örnekler üzerine 100 µL seyreltilmiş DMAB reaktifi (50 µL DMAB/50 µL perklorik asit-izopropanol) eklenerek 60°C'de 90 dk bekletilmiştir. Son olarak UV spektrofotometre (Labomed Double Beam UV-görünür spektrofotometre, ABD) ile örneklerin 560 nm'de absorbansları ölçülmüş ve standart çözeltilerle oluşturulan kalibrasyon grafiği (**Şekil 3.8**) kullanılarak kollajen örneklerinin hidroksiprolin miktarları hesaplanmıştır.



Şekil 3.8. Hidroksiprolin kalibrasyon grafiği (560 nm'de ölçüm yapılarak kit protokolüne göre hazırlanmıştır).

3.10.8. Sodyum Dodesil Sülfat Poliakrilamid Jel Elektroforezi (SDS-PAGE)

Sodyum dodesil sülfat poliakrilamid jel elektroforezi (SDS-PAGE), proteinlerin saflığını karakterize etmek için kullanılan yöntemlerden biridir. Jel elektroforezi ile moleküller, yüklerine göre ayrılır ve molekülün yüküyle ilişkili olarak hareket hızı belirlenir. Bu yöntemde, SDS ve indirgeyici ajan kullanımı, proteinin üçüncül yapısını bozarak ve proteinin doğal yükünü maskeleyerek, negatif yüklü doğrusal bir yapı oluşturur. SDS ile muamele edilmiş proteinler, elektrik alanı altında jel matriksine yüklendiğinde, negatif yüklü proteinler farklı hızlarda anoda doğru hareket ederek, moleküler eleme etkisiyle protein ayrımı sağlanır. Tez çalışması kapsamında kolajen örneklerinin saflığını ve molekül ağırlıklarına göre tiplerini belirleyebilmek için Laemmli tarafından tanımlanan SDS-PAGE yöntemi kullanılmıştır [228, 229]. Bu amaçla, kolajen lizatlarındaki protein örnekleri 2-merkaptoetanol (indirgeyici ajan) içeren 4x yükleme tamponu ile karıştırılmış ve örnekler 95°C'de 5 dk ısıtılarak denatüre edilmiştir. Elli µl örnek ile 3 µl önceden boyanmış çift renkli protein moleküler ağırlığı belirteci SDS-poliakrilamid jelde eş zamanlı olarak 100V sabit voltajda 100 dk boyunca yürütülmüştür. SDS-PAGE jelleri, Coomassie boyası ile boyanmış ve fotoğraflanmıştır. Coomassie boyama için, jel 5 dakikalık 3 yıkama işleminden sonra oda sıcaklığında 1 sa boyunca hafif sallama ile boyanmıştır. Daha sonra, arka plan net olana ve ayrılmış proteinler jel görüntüleme sistemi ile görüntülenene kadar en az 2 sa su ile yıkanmıştır. SDS-PAGE analizi Hacettepe Üniversitesi Kimya Mühendisliği Öğretim üyesi Doç. Dr. Eda Çelik Akdur'a ait araştırma laboratuvarında gerçekleştirilmiştir.

3.10.9. Sıvı Kromatografi-Kütle Spektrometrisi (LC-MS) Analizi

Kolajen örneklerinin aminoasit profili ve proteomik özellikleri LC-MS analizi ile belirlenmiştir. LC-MS, sıvı kromatografisinin fiziksel ayırma yetenekleri ile kütle spektrometresi analizinin birleştirildiği bir kimya tekniğidir. LC-MS, çok yüksek duyarlılık ve seçicilik özelliklerine sahip olup, birçok uygulama alanında kullanılmaktadır. Analiz kapsamında kolajen örnekleri 24 sa süresince 10 mL %0,25'lik (k/h) kalsiyum hidroksit içinde yavaş çalkalama ile karıştırılmıştır. Üç kez saf su ile yıkandıktan sonra, örnekler üzerine 10 mL %1,7'lik (h/h) sülfürik asit eklenmiş ve oda sıcaklığında 4 sa boyunca karıştırılmıştır. Ardından örnekler tekrar 3 kere saf su ile

yıkanmış ve kolajenin denatürasyonu için 80°C'de 30 dk saf su içerisinde bekletilmiştir. Saf su uzaklaştırıldıktan sonra, 37°C'de 4 sa boyunca 200 µL 100 mM Tris-HCl/1 mM kalsiyum klorür (pH 7,6) içinde 50 µg tripsin ile sindirim gerçekleştirilmiştir. Tripsin sindiriminden elde edilen örnek, hacimce %1,0 olacak şekilde formik asit ile asitlendirilmiş ve 0,45 µm filtreden geçirilerek süzülmüştür. Filtrelenen örnekler Dionex UltiMate 3000 LC- Quantiva Triple Quadrupol marka LC-MS cihazı ile analizine tabi tutulmuştur [230].

3.11. Kolajen Hidrojellerin Üretimi

Deniz süngerinden izole edilen kolajen, EDC/NHS ile çapraz bağlanarak stabil yapıdaki hidrojeller oluşturulmuştur. Bu amaçla, literatürdeki bilgiler doğrultusunda [231, 232] farklı kolajen ve EDC konsantrasyonları ile çeşitli EDC/NHS molar oranları (mol:mol) test edilmiş olup, bu oranlara ilişkin veriler **Çizelge 3.2**'de sunulmuştur.

Çizelge 3.2. Kolajen hidrojel üretim koşulları.

Kolajen konsantrasyonları (mg/mL)	5, 10, 20
EDC konsantrasyonları (% k/h)	1, 5
EDC/NHS oranları (mol:mol)	1:1, 5:1

Öncelikle kolajen, belirlenen oranlarda %1'lik (k/h) asetik asit çözeltisi içinde çözülmüştür. Çapraz bağlanma reaksiyonu için pH değeri 6'ya ayarlanmıştır. Ardından, uygun çapraz bağlanma oranına göre EDC (1-etil-3-(3-dimetilaminopropil)) karbodiimid hidroklorür) ve NHS (N-hidroksisüksinimid) ilave edilmiştir. Karışım, oda sıcaklığında manyetik karıştırıcıda 1 - 4 saat süreyle inkübe edilerek çapraz bağlanma reaksiyonu başlatılmıştır. Bu aşamada, karboksil ve amin grupları arasında kovalent bağlar oluşmuştur. Reaksiyon tamamlandığında, fazla reaktifler PBS ile yıkanarak uzaklaştırılmıştır.

3.12. Kolajen Hidrojellerin Karakterizasyonu

Tez çalışması kapsamında hazırlanan hidrojellerin biyobozunma davranışları hidrolitik ortamda gravimetrik yöntemle değerlendirilmiştir. Başlangıç ağırlıkları kaydedilen

örnekler sodyum azid içeren fosfat tamponlu çözelti (PBS, pH 7,4) içerisine alınarak 7 gün boyunca 37 °C'de inkübe edilmiştir. Bozunma ortamları haftada bir yenilenerek, örneklerin ağırlıkları 7 gün boyunca düzenli olarak takip edilmiştir. Biyobozunurluk oranları ise % ağırlık kaybı şeklinde, Eşitlik-3 yardımıyla hesaplanmıştır.

$$\text{Ağırlık kaybı (\%)} = \frac{W_t - W_0}{W_0} \text{x} 100 \qquad \text{Eşitlik-3}$$

Eşitlikte W_t herhangi bir t anındaki hidrojel kütlesini, W_0 ise başlangıç kütlesini ifade etmektedir.

Kolajen hidrojellerin su alım kapasiteleri, gravimetrik ölçüm yöntemi ile değerlendirilmiştir. Otuz yedi derecede (°C) PBS (pH 7,4) içerisinde inkübe edilen hidrojeller, belirli zaman aralıklarında tartılmış ve elde edilen ağırlıklar başlangıç ağırlıklarıyla karşılaştırılmış ve Eşitlik-4 ile % şişme değerleri hesaplanmıştır.

$$\text{Şişme (\%)} = \frac{\text{şişmiş ağırlık-başlangıç ağırlığı}}{\text{başlangıç ağırlığı}} \text{x} 100 \qquad \text{Eşitlik-4}$$

KISIM III

Glioblastoma, en yaygın ve tedavisi en zor beyin tümörlerinden biridir. Özellikle 40-50 yaş arası erkeklerde görülme sıklığı artmaktadır. Geleneksel tedavilerin hem sağlıklı hem de kanserli hücreleri etkilemesi nedeniyle, doğal bir polifenol olan gallik asit (GA), glioblastoma tedavisinde umut vadeden yeni bir ajan olarak öne çıkmaktadır. Tez çalışmasının bu bölümünde standart kemoterapi yöntemine tamamlayıcı olabilecek doku mühendisliği yaklaşımı ile GA içeren partikül/doku iskelesi temelli ilaç taşıyıcı sistemler geliştirilmesi amaçlanmıştır. Öncelikle GA'yı içerisine hapsedeceğimiz PBAT nanopartiküller üretilmiştir. Hazırlanan bu nanopartiküller ONM ile kaplanmış ve ONM/PBAT temelli sistemin glioblastoma üzerindeki etkisini incelemek için T98G hücreleri ile *in vitro* hücre kültür çalışmaları yapılmıştır Böylece, GA ve ONM'nin glioblastoma üzerindeki ikili etkisi tek bir sistemde incelenmiştir. Gallik asit yüklü ONM/PBAT nanopartiküller (GA-ONM-PBAT NPs) *Sarcotragus foetidus* sponjin iskelelere yüklenerek (Sf/GA-ONM-PBAT) glioblastoma tedavisinde lokal olarak

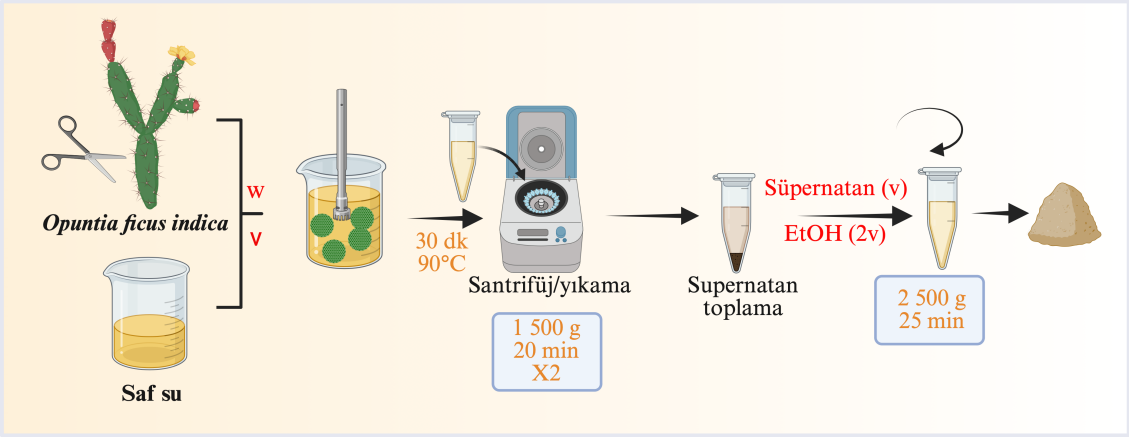
kullanılacak 3B bir sistem geliştirilmiş ve *Sarcotragus foetidus* deniz süngerinin yumuşak doku mühendisliğinde taşıyıcı bir doku iskelesi olarak kullanım potansiyeli incelenmiştir.

Deneysel çalışmaların ayrıntıları aşağıda detaylı olarak verilmiş olup çalışmanın **özgün** noktaları şöyle sıralanabilir:

1. İlaç taşıyıcı sistemler olarak nopal müsilaj kaplı PBAT nanopartikül sistemlerinin geliştirilmesi,
2. GA ve nopal müsilajının sinerjik etkisinin glioblastoma tedavisine yönelik olarak "doku mühendisliği" yaklaşımında değerlendirilmesi,
3. GA taşıyan nopal müsilaj kaplı PBAT nanopartiküller (GA-ONM-PBAT NPs) ile bölgeye özgü kontrollü ve uzun süreli biyoaktif ajan salımı yapan nanopartikül temelli bir sistemin geliştirilmesi,
4. GA-ONM-PBAT nanopartiküllerin *Sarcotragus foetidus* sponjin iskelelere yüklenmesi ve *Sarcotragus foetidus* süngerlerinin yumuşak doku mühendisliği uygulamalarında taşıyıcı sistem olarak kullanımının incelenmesi,
5. Geliştirilen sistemin insan glioblastoma hücreleri üzerindeki antikanser etkinliğinin *in vitro* hücre kültür çalışmaları ile ortaya konması.

3.13. *Opuntia ficus indica* (Nopal) Müsilajının (ONM) İzolasyonu

Opuntia ficus indica müsilajı (ONM) konu ile ilgili Trevino-Garza ve ark.'nın 2017 yılında yayınlanan çalışmasında belirtilen yöntemden faydalanılarak izole edilmiştir [233]. ONM kaynağı olarak ülkemizin Adana ilinden getirtilen *Opuntia ficus indica* yaprakları kullanılmıştır. Yapraklar küçük parçalar haline getirildikten sonra 1:1 (k/h) oranında distile su içerisine alınmış ve 30 dk boyunca blender ile karıştırılmıştır. Elde edilen viskoz karışım 90ºC'de 30 dk bekletilmiş ve sonrasında oda sıcaklığında 1 500g'de 20 dk santrifüjlenmiştir. Süpernatanta 1:2 (h/h) oranında mutlak etanol eklenmiş ve karışım tekrar 2 500g'de 25 dk santrifüjlenmiştir Çöken müsilaj süpernatandan ayrılmış ve 48 sa boyunca 60ºC'lik etüvde kurutulmuştur. Nopal müsilajının (ONM) izolasyonu **Şekil 3.9**'da görsel olarak ifade edilmiştir.



Şekil 3.9. ONM izolasyonuna ait şematik gösterim (BioRender.com ile oluşturulmuştur; https://BioRender.com).

3.14. Boş PBAT Nanopartiküllerin Üretimi

Boş PBAT nanopartiküller tekli emülsiyon hazırlama-çözücü buharlaştırma yöntemi ile üretilmiştir. Organik faz içeriği hazırlanırken farklı konsantrasyonlarda PBAT (%0,5, %1,0, %2,5 k/h) dikolorometan (DCM) içinde çözünmüştür. Sulu faz oluşumu için ise emülgatör olarak didodesil dimetil amonyum bromür (DMAB) distile su içerisinde çözünmüştür. Ardından organik faz (o) sulu faza (w) farklı oranlarda (1:4 ve 1:2) ilave edilerek yüksek hızlı homojenizatör (Heidolph, Almanya) ile 24 000 rpm'de 10 dk homojenize edilmiştir. Safsızlıkların uzaklaştırılması için partiküller yıkanmış ve ardından dondurarak-kurutma cihazı (Christ, Almanya) ile -80°C'de kurutulmuştur. Nanopartiküllerin hazırlanmasında kullanılan formülasyonlar **Çizelge 3.3**'te sunulmuştur.

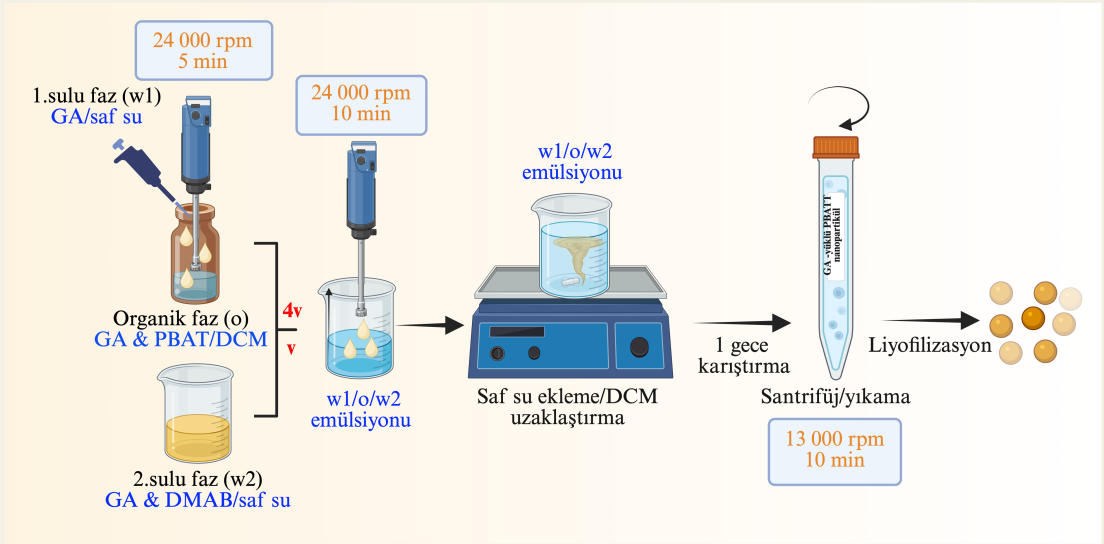
Çizelge 3.3. Boş PBAT nanopartikül üretim formülasyonları.

Formülasyon	% PBAT (k/h)	% DMAB (k/h)	o/w oranı (h/h)
F1	0,5	0,1	1:4
F2	0,5	0,1	1:2
F3	1,0	0,1	1:4
F4	1,0	0,1	1:2
F5	2,5	0,1	1:4
F6	2,5	0,1	1:2
F7*	**0,5**	**1,0**	**1:4**

**: F7 formülasyonu en iyi formülasyon olarak seçilmiş ve GA yüklemesi için bu formülasyon kullanılmıştır.*

3.15. GA Yüklü PBAT Nanopartiküllerin Üretimi

Gallik asit (GA) yüklü PBAT nanopartiküller (GA-PBAT NPs), emülsiyon hazırlama-çözücü buharlaştırma yöntemi ile hazırlanmış ve PBAT nanopartiküllere GA yüklenmesi işleminin şematik gösterimi **Şekil 3.10**'da sunulmuştur. Bu yöntem, tek emülsiyon, ikili emülsiyon ve modifiye ikili emülsiyon hazırlama-çözücü buharlaştırma olarak üç ana kategoriye ayrılır. Hidrofilik ilaçların polimerik taşıyıcılara yüklenmesi için yaygın olarak kullanılan ikili emülsiyon hazırlama-çözücü buharlaştırma yönteminin bazı sınırlamaları vardır; örneğin, ilaç fazlar arasında geçiş yapabilir. Bu geçişleri engellemek ve enkapsülasyon verimini artırmak için orijinal yöntemde çeşitli modifikasyonlar yapılmıştır. Bu modifiye edilmiş yöntemde, nanopartiküllerin oluşumu sırasında gallik asidin sulu faza difüzyonunu önlemek için gallik asit hem organik hem de sulu fazlara eklenmiştir.



Şekil 3.10. GA-PBAT nanopartiküllerin modifiye ikili emülsiyon hazırlama-çözücü buharlaştırma yöntemi ile üretiminin şematik gösterimi (BioRender.com ile oluşturulmuştur; https://BioRender.com).

GA-PBAT nanopartiküllerin üretimi için **Şekil 3.10**'da şematize edilen modifiye ikili emülsiyon hazırlama-çözücü buharlaştırma yöntemi kullanılmış ve hazırlanan organik faz içerisine, PBAT'a oranı %5 - %20 (k/k) olacak şekilde GA eklenmiştir. Birinci ve ikinci sulu fazlara ise, nanopartikül oluşumu sırasında GA'nın suya difüzyonunu önlemek amacıyla %0,1 - %0,2 (k/h) oranında GA eklenmiş ve çözelti 1 sa boyunca karıştırılmıştır. Birinci sulu faz organik faza hacimce 1:4 oranında eklenmiş ve karışım 24 000 rpm'de 5 dk homojenize edilerek birinci emülsiyon (w1/o) oluşturulmuştur. Ardından bu emülsiyon (w1/o), damla damla ikinci sulu faza eklenmiş ve karışım 24 000 rpm'de 10 dk boyunca karıştırılarak ikinci emülsiyon (w1/o/w2) elde edilmiştir. Üretimin ileriki aşamalarında boş PBAT nanopartikül üretimindeki işlemler uygulanarak GA-PBAT nanopartiküller hazırlanmıştır.

GA-PBAT nanopartiküllerin sentez parametreleri, istenilen partikül çapına (~ 200 nm) ve mümkün olan en yüksek enkapsülasyon verimliliğine ulaşmak amacıyla yüzey yanıt metodolojisi (RSM) kullanılarak optimize edilmiştir. Bu kapsamda, farklı GA miktarları %5 ile %20 (k/k) oranları arasında değişen dozlarda organik faza eklenmiştir. Ayrıca, GA, birinci ve ikinci sulu fazlara %0,1 ile %0,2 (k/h) oranları arasında olacak şekilde

ilave edilmiştir. Polimer konsantrasyonu, emülgatör konsantrasyonu ve karıştırma hızı sırasıyla %0,5 (k/h), %1 (k/h) ve 24 000 rpm olarak belirlenmiştir.

3.16. Tepki Yüzey Metodolojisi (RSM) ile GA-PBAT Nanopartikül Üretim Prosesinin Optimizasyonu

Tepki Yüzey Metodolojisi (RSM), bağımsız değişkenlerin (sunulan çalışmada GA/PBAT oranı ve sulu fazlardaki GA konsantrasyonu) uzayının belirlenmesi için gerekli deneysel koşulların elde edilmesi, bağımsız değişkenlerin hem kendi arasında hem de sistem yanıtları (sunulan çalışmada nanopartikül çapı ve enkapsülasyon verimi) üzerinde oluşturduğu etkinin belirlenmesi ve böylece prosese ait modellemenin yapılabilmesi için kullanılan modelleme ve optimizasyon tekniklerinden oluşmaktadır. RSM kullanılarak yapılan optimizasyonun temel amacı, kısa sürede az sayıda deneme yaparak belirli bir alanda istenen sistem tepkisini ve/veya parametrelerini verimli bir şekilde bulmaktır. RSM ile optimizasyonda, öncelikle bağımsız değişkenlerin sayısı (faktör) ve her bir değişkenin çalışma aralıkları ile bu çalışma aralığındaki adım değeri (minimum ve maksimum değerler arasındaki fark) belirlenmektedir. Parametreler belirlendikten sonra bu değerlere uygun deneme desenleri seçilmektedir. Deneme deseni belirlendikten sonra sistemin modellemesi yapılmakta ve model denkliğin uygunluğu istatistiksel yöntemler ile tespit edilmektedir. Çalışma kapsamında 2 bağımsız değişkene (GA/PBAT oranı ve sulu fazlardaki GA konsantrasyonu) ait alt ve üst sınır değerlerinde oluşturulan her bir deney seti parametrelerinde Merkezi Birleşik Tasarım (Central Composite Design CCD) uygulanarak 13 farklı deney seti oluşturulmuştur. Bu deney setlerindeki değerler kullanılarak nanopartikül üretimi gerçekleştirilmiş, her bir sete ait SEM fotoğrafları kullanılarak ImageJ yazılımında 100 farklı noktadan gerçekleştirilen ölçümler ile partikül çap değerleri belirlenmiştir. Ayrıca, her set için **Bölüm 3.18.5**'te anlatılan yöntem kullanılarak GA enkapsülasyon verimleri belirlenmiştir. Elde dilen her cevap 2 faktörlü ve 2 seviyeli CCD sistemine girilmiş ve Design-Expert® v11 (Design Expert Inc., A.B.D.) programında sistem tepkisi olarak polinomik bir denklem modeli elde edilmiştir. Elde edilen model denkliğinin sisteme uygunluğu varyans analizi (ANOVA) ve katsayı belirleme (R^2) ile değerlendirilmiştir. İstatistiksel olarak anlamlı parametreler *p* değerinin %95 güven seviyesinde seçilmiştir.

3.17. GA-PBAT Nanopartiküllerin ONM ile Kaplanması

GA-PBAT nanopartiküllerin ONM ile kaplanmasında Ghumman ve ark.'nın 2019 yılında yayınlanan çalışmalarında [200] belirtilen yöntem modifiye edilerek kullanılmıştır. Yönteme göre çeşitli derişimlerde hazırlanan ONM (1 mg/mL, 5 mg/mL ve 10 mg/mL) 30 dk süresince distile su ile sonike edilmiştir. Beş mg/mL olacak şekilde nanopartiküller ONM sulu çözeltisi içerisine eklenmiş ve tekrar sonikasyon yapılmıştır. Yüzey modifiyelerinin çapraz bağlama işlemi için çözeltiye %1 (h/h) olacak şekilde $CaCl_2$ (bağlayıcı) eklenmiş ve çözelti 37ºC'de karıştırılmıştır. Kaplanmış nanopartiküller iki defa distile su ile yıkandıktan sonra 5 000 rpm'de 10 dk santrifüjlenmiş ve 48 sa boyunca -80°C'de dondurarak-kurutma cihazında kurutulmuştur.

3.18. Karakterizasyon Çalışmaları

Karakterizasyon çalışmaları 4 farklı grup üzerinden gerçekleştirilmiştir.
Bu gruplar;

1. *Opuntia ficus indica* (nopal) müsilajı (ONM),
2. Boş PBAT nanopartiküller (PBAT NPs),
3. GA yüklü PBAT nanopartiküller (GA-PBAT NPs),
4. GA yüklü ONM kaplı PBAT nanopartiküller (GA-ONM-PBAT NPs)

şeklinde olup örneklerin karakterizasyonunda kullanılan yöntemler aşağıda detaylandırılmıştır.

3.18.1. Kimyasal Yapı Analizi

Nanopartiküllerin kimyasal yapıları ATR-FTIR (Thermo Scientific, Nicolet 6700, ABD) ile 400-4000 cm^{-1} dalga boyu aralığında incelenmiştir.

3.18.2. Morfolojik İncelemeler

Nanopartiküllerin yüzey morfolojileri SEM (EVO50; Zeiss, Germany) ile incelenmiştir. PBAT nanopartiküller su ile seyreltilerek yüzeye damlatılmış ve kurutulmuştur. Kurutma işleminin ardından örnekler altın-paladyum ile kaplanmış ve analizler gerçekleştirilmiştir.

Partiküllerin ortalama çapları SEM analizleri sonucunda elde edilen görüntüler ile ImageJ programı kullanılarak 100 adet partikül için belirlenmiş ve ortalama olarak hesaplanmıştır.

Morfolojik incelemeler kapsamında GA-ONM-PBAT nanopartiküllerde kaplamanın varlığı SEM analizine ek olarak boyamalarla da gösterilmiştir. Bu bağlamda ilk olarak floresan ışıma veren FITC (floresan izotiyosiyanat) yüklü PBAT nanopartiküllerin üretimi gerçekleştirilmiştir. FITC yüklü PBAT nanopartiküllerin üretimi için boş PBAT nanopartiküllerin üretimindeki yöntem izlenmiştir. Farklı olarak, 5 mg FITC 1 mL dimetilsülfoksit içerisinde çözünmüş ve hazırlanan çözelti organik faza eklenmiştir. Yıkama işlemleri sonrasında partiküller 48 sa boyunca -80°C'de dondurarak-kurutma cihazında karanlıkta kurutulmuştur. ONM ise %0,05 (k/h) olacak şekilde organik bir bileşik olan Sudan I ile boyanmıştır. Ardından, FITC yüklü PBAT nanopartiküller **Bölüm 3.17**'de ayrıntılı olarak anlatılan yöntem kullanılarak Sudan I ile boyanmış ONM ile kaplanmıştır. Kaplı nanopartiküller floresan mikroskobu kullanılarak görüntülenmiş ve kaplamanın varlığı gösterilmiştir.

3.18.3. Termal Özelliklerin Belirlenmesi (Termogravimetrik ve Diferansiyel Termal Analiz)

Nanopartiküllerin termal özellikleri EXSTAR 6000 TG/DTA 6300 (SII Nanotechnology Inc., Japonya) ve Diamond DSC (Perkin Elmer, ABD) kullanılarak incelenmiştir. Örnekler, azot atmosferinde 25°C'den 600°C'ye kadar 10°C.dk^{-1} hızla ısıtılmıştır. Elde edilen termogramlardan, kütle kayıpları ve ısısal özellikler tespit edilmiştir.

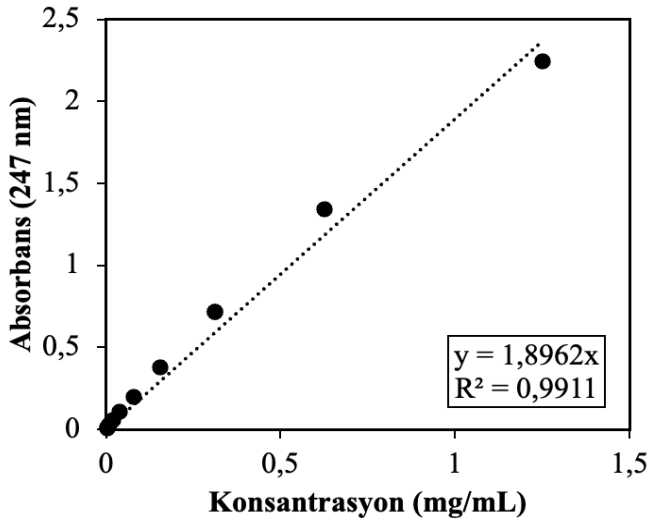
3.18.4. Nanopartiküllerin Stabilite ve Morfolojik Değerlendirmesi

Nanopartiküllerin stabilitesi, Zetasizer Analyzer (3000 HSA, Malvern, İngiltere) cihazı kullanılarak 7 günlük bir süre boyunca zeta potansiyeli ölçümü ile değerlendirilmiştir. Analiz kapsamında, nanopartiküller tümör mikroçevresini taklit edebilmek için saf suda ve asetat tamponunda (pH 5,5) disperse edilmiş ve 37 °C'de inkübe edilmiştir. Zeta potansiyeli ölçümleri 0. ve 7. günlerde alınmış; sonuçlar ise üç bağımsız tekrarın ortalama ± standart sapma değerleriyle ifade edilmiştir. Ayrıca, nanopartiküllerin morfolojik

değişikliklerini değerlendirmek amacıyla 7. günde SEM analizi yapılmış ve **Bölüm 3.18.2**'de açıklandığı şekilde ortalama partikül boyutu, SEM görüntülerinde gözlenen 100 nanopartikül kullanılarak ImageJ yazılımı ile belirlenmiştir.

3.18.5. GA'nın Enkapsülasyon Veriminin Belirlenmesi

GA'nın enkapsülasyon verimi 247 nm dalga boyunda NanoDrop 2000c spektrofotometre (Thermo Scientific, USA) ile tayin edilmiştir. Bu amaçla partikül üretim prosesinde yıkama ile toplanan çözeltideki GA miktarının tayinine dayalı "in-direkt yöntem" uygulanmıştır. GA'nın kalibrasyon grafiğinden (**Şekil 3.11**) faydalanılarak yıkama çözeltisindeki GA konsantrasyonu belirlenmiş, Eşitlik-5 kullanılarak GA enkapsülasyon verimi (EE, %) ve Eşitlik-6 kullanılarak GA yükleme miktarı (µg GA/mg NPs) hesaplanmıştır.



Şekil 3.11. GA kalibrasyon grafiği (247 nm).

İn-direkt yöntem;

$$\text{EE (\%)} = \frac{\text{başlangıçtaki GA miktarı-yıkama ile uzaklaştırılan GA miktarı}}{\text{başlangıçtaki GA miktarı}} \text{x100} \qquad \text{Eşitlik-5}$$

$$\text{Yükleme miktarı } \left(\frac{\mu\text{g GA}}{\text{mg NPs}}\right) = \frac{\text{başlangıçtaki GA miktarı-yıkama ile uzaklaştırılan GA miktarı}}{\text{üretilen nanopartikül miktarı}} \qquad \text{Eşitlik-6}$$

3.18.6. ONM Kaplama Veriminin Belirlenmesi

ONM kaplama verimi 310 nm dalga boyunda NanoDrop 2000c spektrofotometre ile tayin edilmiştir. Bu amaçla "in-direkt yöntem" uygulanmıştır. ONM'nin kalibrasyon grafiğinden (**Şekil 3.12**) faydalanılarak yıkama çözeltisindeki ONM konsantrasyonu belirlenmiş ve Eşitlik-7 kullanılarak kaplama verimi hesaplanmıştır.

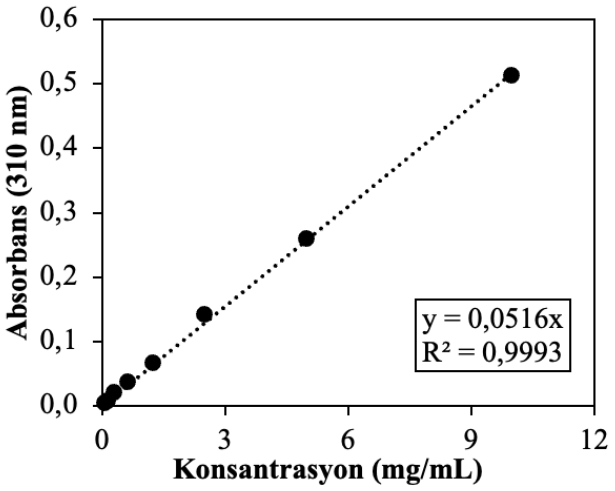
İn-direkt yöntem;

$$\text{Kaplama verimi (\%)} = \frac{\text{başlangıçtaki ONM miktarı-yıkama ile uzaklaştırılan ONM miktarı}}{\text{başlangıçtaki ONM miktarı}} \text{x100}$$

Eşitlik-7

Benzer şekilde, kaplamanın kararlılığı da 310 nm'de NanoDrop 2000c spektrofotometre ile tayin edilmiştir. Bu amaçla, GA-ONM-PBAT nanopartiküller Eppendorf tüplerine yerleştirilen örneklerin üzerine, pH 7,4'te PBS veya pH 5,5'te asetat tamponu olacak şekilde 1,5 mL tampon çözeltileri eklenmiş ve stabilite çalışmaları her iki pH koşulunda da 37 °C'de, 70 rpm'de çalkalamalı inkübatörde gerçekleştirilmiştir.. Yetmiş iki saat sonunda tampon ortamından örnek alınarak 310 nm'de NanoDrop 2000c spektrofotometre ile analiz edilmiştir. Kalibrasyon grafiği kullanılarak ortamdaki ONM konsantrasyonu belirlenmiş ve kaplamanın yüzde stabilitesi aşağıdaki gibi hesaplanmıştır.

$$\text{Yüzde stabilite (\%)} = \frac{\text{kaplanan ONM miktarı-tampon ortamındaki ONM miktarı}}{\text{kaplanan ONM miktarı}} \text{x100}$$ Eşitlik-8



Şekil 3.12. ONM kalibrasyon grafiği (310 nm).

3.18.7. *İn Vitro* GA Salım Çalışmaları ve Salım Kinetiğinin Belirlenmesi

Gallik asidin GA-PBAT ve GA-ONM-PBAT nanopartiküllerden salımı, fizyolojik ve asidik pH'daki tampon çözeltilerinde gerçekleştirilmiştir. Salım çalışmaları, dört paralel ile 4 mg nanopartikül kullanılarak yapılmıştır. Hazırlanan nanopartiküller, 1 mg/mL konsantrasyonunda olacak şekilde PBS ortamında (pH 7,4) ve asetat tampounda (pH 5,5) dağıtılmış ve çapı 10 mm, uzunluğu 15 cm olan dializ selüloz membranlar içerisine yerleştirilmiştir (cut off değeri = 14 000). Örnekler, 37°C sabit sıcaklıkta ve 100 rpm karıştırma hızında inkübe edilmiştir. Sink koşulunu sağlamak için her numuneye %0,3 (k/h) sodyum azit içeren 10 mL tampon çözeltisi eklenmiştir. Belirlenen zaman dilimlerinde, salım ortamından 900 µL örnek alınmış ve her alınan örneğe 900 µL taze tampon çözeltisi eklenmiştir. Toplanan örneklere 100 µL saf su eklenmiş ve örneklerin absorbansı NanoDrop 2000c spektrofotometre kullanılarak ölçülmüştür. Kümülatif salım değerleri, GA kalibrasyon eğrisinden hesaplanarak (**Şekil 3.11**) salım profilleri oluşturulmuştur. Son olarak, salım sonuçları sıfırıncı derece, birinci derece, Hixson-Crowell ve Higuchi kinetik model denklemlerine tabi tutulmuştur ve regresyon katsayıları hesaplanarak GA'nın salım davranışına en uygun model belirlenmiştir. Model denklemler aşağıda tanımlanmıştır.

Sıfırıncı derece kinetik model: $Q_t=Q_0+K_0t$ **Eşitlik-8**

Birinci derece kinetik model: $\log Q_t=\log Q_0+K_1t$ **Eşitlik-9**

Higuchi kinetik model: $Q_t=Q_0+K_Ht^{\frac{1}{2}}$ **Eşitlik-10**

Hixson-Crowell kinetik model: $Q_0^{\frac{1}{3}}=Q_t^{\frac{1}{3}}+K_{HC}t$ **Eşitlik-11**

3.19. Hücre Kültür Çalışmaları

Tez çalışması kapsamında üretilen nanopartikül sistemlerinin glioblastoma tedavisindeki kullanım potansiyeli insan glioblastoma hücre hattı (T98G) ile incelenmiştir. Ayrıca, GA'nın normal sağlıklı hücreler üzerindeki etkileri de insan umbilikal damar endotel hücreleri (HUVEC) kullanılarak incelenmiştir. Glioblastoma hücre hattı (T98G), %10 (h/h) FBS ve %1 (h/h) penisilin-streptomisin içeren DMEM-F12 ortamında kültüre

edilmiştir. HUVEC'ler ise %10 (h/h) FBS, %1 (h/h) penisilin-streptomisin ve %1 (h/h) L-glutamin ile zenginleştirilmiş RPMI-1640 ortamında kültüre edilmiştir. Inkübasyon işlemleri, 37°C sıcaklıkta ve %5 CO_2 içeren etüvde gerçekleştirilmiştir (Heraeus Instruments, Almanya).

3.19.1. GA'nın Farklı Konsantrasyonlarının HUVEC ve T98G Hücreleri Üzerindeki Etkisinin İncelenmesi

Gallik asitin farklı konsantrasyonlarının HUVEC ve T98G hücreleri üzerindeki sitotoksisitesini analiz etmek amacıyla 5 gün süren *in vitro* hücre kültürü deneyleri gerçekleştirilmiştir. T98G hücreleri 17. pasajda ve HUVEC'ler 20. pasajda, 24 gözlü kültür kaplarına (TCPS) 1 mL kültür ortamında $4x10^4$ hücre/mL inokülasyon yoğunluğu ile ekilmiştir. Gallik asit, sterilizasyon için 30 dk ultraviyole (UV) ışığına maruz bırakılmış ve ardından stok çözeltisi hazırlamak için kültür ortamında çözdürülmüştür. Stok çözelti, 0,22 µm membran filtreden geçirilmiş ve istenen GA konsantrasyonlarına (0-1000 µM) seyreltmiştir. Hücre ekiminden 72 sa sonra, kültür ortamı çekilmiş ve hücrelere farklı GA konsantrasyonları eklenmiştir. Hücreler 5 gün süreyle inkübe edilmiş ve hücre canlılığı, kültürün 1., 3. ve 5. günlerinde MTT (3-(4,5-dimetiltiazol-2-yl)-2,5-difeniltetrazolyum bromür) analizi ile değerlendirilmiştir. Ayrıca, hücre morfolojisi de aynı günlerde kristal viyole boyama yöntemi ile incelenmiştir.

3.19.1.1. MTT analizi

MTT analizi **Bölüm 3.4**'te anlatılmış olup, kültürün 1., 3. ve 5. günlerinde hücre canlılığını değerlendirmek için kullanılmıştır. Kısaca, örnekler üzerinden kültür ortamı aspire edilmiş ve sonrasında her örneğe 600 µL serum içermeyen kültür ortamı ve 60 µL MTT (2,5 mg/mL, DPBS içinde) eklenmiştir. Örnekler 37°C'de 3 sa inkübe edildikten sonra, MTT içeren ortam uzaklaştırılmış ve her örneğe oluşan mor formazan kristallerini çözmek için 400 µL izopropanol çözeltisi (0,04 M HCl içeren) eklenmiştir. Elde edilen çözeltiden 200 µL, 96-well kültür kaplarına aktarılmış ve çözeltinin absorbansı, UV spektrofotometre (Labomed Double Beam UV-visible spektrofotometre, ABD) kullanılarak 570 nm'de (690 nm referans dalga boyu ile) ölçülmüştür. GA ile muamele

edilmeyen hücreler kontrol grubu olarak kullanılmış ve deneyler üç paralel örnek ile gerçekleştirilmiştir. Hücre canlılığı, aşağıdaki denklem kullanılarak belirlenmiştir:

$$\text{Hücre canlılığı (\%)} = \frac{\text{GA ile muamele edilen örneğin absorbansı}}{\text{Kontrol grubunun absorbansı}} \text{x100} \qquad \text{Eşitlik-12}$$

3.19.1.2. Morfolojik Analiz

Hücrelerin nükleus ve sitoplazması hakkında bilgi edinmek ve hücreleri morfolojik olarak değerlendirmek amacıyla, hücreler kültürün 1., 3. ve 5. günlerinde kristal viyole ile boyanmıştır. Bu amaçla, öncelikle örnekler üzerindeki kültür ortamı uzaklaştırılmış ve DPBS (pH 7,4) ile 3 kez yıkanmıştır. Yıkama işleminin ardından, hücreler 4°C'de 20 dk süreyle asetat/metanol karışımında 1:1 (h/h) fikse edilmiştir. Fiksasyonun ardından, hücreler %20'lik (h/h) metanol çözeltisi içinde hazırlanan %0,5'lik (k/h) kristal viyole çözeltisi ile muamele edilerek 30 dk inkübe edilmiştir. Son olarak, boyanan örnekler akan su altında yıkanmış ve hücreler optik mikroskop (Olympus IX71, Japonya) ile incelenmiştir.

3.19.2. PBAT Nanopartikülleri ile Yürütülen Hücre İçerisine Alım Çalışmaları

PBAT nanopartiküllerinin hücresel alımını araştırmak amacıyla, PBAT nanopartiküllere floresan izotiyosiyanat (FITC) yüklenmiştir. FITC yüklü PBAT nanopartiküller T98G (pasaj 17) ve HUVEC (pasaj 20) hücreleri ile 24 sa boyunca muamele edilerek optik ve floresan mikroskop (Olympus IX71, Japonya) altında incelenmiştir. Yüzde 0,25'lik (h/h) tripsin kullanılarak yüzeyden kaldırılan hücreler 24-well TCPS plakalarına $4x10^4$ hücre/mL yoğunluğunda ekilmiştir. Yirmi dört saat sonra 1mL ortam ile homojenize edilmiş FITC yüklü PBAT nanopartiküller 0,1 mg/mL konsantrasyonunda hücreler üzerine eklenmiştir. Kültürün 1., 12. ve 24. saatlerinde, nanopartikül içeren kültür ortamı aspire edilmiş, ardından hücreler DPBS ile iki kez yıkanarak optik mikroskop altında görüntülenmiştir. Floresan mikroskobu ile görüntüleme için ise hücreler oda sıcaklığında 20 dk boyunca %4'lük (k/h) formaldehit çözeltisi ile fikse edilmiş, üç kez PBS ile yıkanmıştır. Hücre membran geçirgenliğini artırmak için 5dk süresince %0,1 (h/h) Triton X-100 (PBS içerisinde) ile muamele edilmiş ve ardından karanlıkta %0,1'lik (h/h) DAPI (BSA'lı PBS içerisinde) çözeltisinde bekletilerek hücre çekirdekleri boyanmıştır. Hücre

içine alım yüzdeleri her iki görüntüleme yönteminden 10X büyütme ile elde edilen görüntüler kullanılarak hesaplanmıştır.

3.19.2.1. FITC Yüklü PBAT Nanopartiküllerin Üretimi

FITC yüklü PBAT nanopartiküllerin üretiminde, boş PBAT nanopartiküllerinin üretilmesinde uygulanan prosedür takip edilmiştir (**Bölüm 3.14**). Farklı olarak, 5 mg FITC, 1 mL dimetil sülfoksit içinde çözülmüş ve elde edilen çözelti organik faza eklenmiştir. Yıkama adımlarının ardından, nanopartiküller karanlıkta -80°C'de dondurarak kurutma cihazında kurutulmuştur.

3.19.3. PBAT Nanopartiküllerin T98G Hücreleri Üzerindeki Etkisinin İncelenmesi

Boş PBAT, GA-PBAT ve GA-ONM-PBAT nanopartiküllerin T98G insan glioblastoma hücreleri (17. pasaj) üzerindeki etkilerini araştırmak amacıyla 3 gün süren hücre kültür çalışmaları gerçekleştirilmiştir. Hücreler, 24-well TCPS plakalarına her bir göz 1 mL olacak şekilde $4x10^4$ hücre/mL yoğunluğunda ekilmiştir. Ekim öncesi, nanopartiküller UV ışığı ile 30 dk sterilize edilmiştir. Ekimden 72 sa sonra canlı hücreler üzerinde toksik etki göstermeyen GA konsantrasyonuna sahip belli miktardaki nanopartikül (0,2 mg/mL) kültür ortamı ile karıştırılarak homojen hale getirilmiş ve TCPS gözlerine eklenmiştir. Nanopartikül içermeyen TCPS yüzeyinde kültüre edilen hücreler kontrol grubu olarak kullanılmıştır. Hücre canlılığı ve proliferasyonu kültürün 1., 2. ve 3. günlerinde MTT analizi ile incelenmiştir. Ayrıca, hücrelerin optik mikroskop görüntüleri alınmış, ardından kültürün 3. gününde canlı/ölü hücre boyama ve Annexin V-FITC/PI analizleri gerçekleştirilmiştir.

3.19.3.1. MTT Analizi

Nanopartiküllerin T98G hücrelerinin proliferasyonu üzerindeki etkileri MTT analizi ile belirlenmiştir. Özetle, analiz günlerinde hücreler üzerindeki kültür ortamı çekilmiş ve partikül kalıntılarını temizlemek için hücreler kültür ortamı ile iki kez yıkanmıştır. Ardından, **Bölüm 3.19.1.1**'de belirtilen yöntem uygulanmış ve Eşitlik-13 kullanılarak canlılık yüzdeleri hesaplanmıştır.

$$\text{Hücre canlılığı (\%)} = \frac{\text{Nanopartikül ile muamele edilen örneğin absorbansı}}{\text{Kontrol grubunun absorbansı}} \text{x100} \qquad \text{Eşitlik-13}$$

3.19.3.2. Optik Mikroskop ile Analiz

Nanopartiküller ile muamele edilen hücrelerin morfolojisini incelemek amacıyla, kültürün 3. gününde optik mikroskop (Olympus IX71, Japonya) kullanılarak görüntüler alınmıştır.

3.19.3.3. Alexa Fluor® 488 Phalloidin/DAPI

Kültürün üçüncü gününde Alexa Fluor® 488/DAPI boyama ile hücre iskeleti organizasyonunu belirlenmiştir. Analiz gününde hücreler 4°C'de 30 dk boyunca %4 (k/h) paraformaldehit (PFA) ile fikslenmiştir. Fikslenen hücreler, PBS içinde %0,1 Triton-X 100 ile 15 dk boyunca permeabilize edilmiştir. Hücre iskeletinin filamentöz aktin yapılarını (F-Aktin) görselleştirmek için %2,5'luk (h/h) Alexa Fluor® 488 Phalloidin kullanılmış ve hücreler 20 dk Alexa Fluor 488 Phalloidin ile muamele edilmiştir. Hücre çekirdeklerini boyamak için 5 dk DAPI boyaması (1:1000; h/h) uygulanmıştır. Son olarak, hücreler %1 (k/h) BSA çözeltisi (PBS içerisinde) ile birkaç kez yıkanmıştır ve floresan mikroskobu (Olympus, Japonya) kullanılarak incelenmiştir. Tüm gruplarda görüntüler üç paralel örnek üzerinden alınmıştır.

3.19.3.4. Canlı/Ölü Hücre Boyama

Hücre canlılığının niteliksel olarak değerlendirilmesi için, kültürün 3. gününde canlı/ölü boyama işlemi gerçekleştirilmiştir. Canlı hücreler tarafından alınan ve hücre içi esteraz aktivitesi nedeniyle yeşil floresansa (ex/em 494/517 nm) dönüştürülen Calcein AM, canlı hücreleri etiketlemek için kullanılmıştır. Ölü hücreler için ise, yalnızca hasar görmüş hücre zarlarından geçebilen ve nükleik asitlere bağlanarak kırmızı floresans (ex/em 528/617 nm) yayan etidyum homodimer-1 (EthD-1) kullanılmıştır. Analiz günü örnekler üzerindeki ortam uzaklaştırılmış ve hücreler Ca^{2+} ve Mg^{2+} içeren PBS (PBS+) ile iki kez yıkanmıştır. Ardından, hücreler karanlık bir ortamda 30 dk boyunca 1 mM Calcein AM ve 1 mM EthD-1 içeren 250 µL boyama çözeltisi ile oda sıcaklığında inkübe edilmiştir.

Boya çözeltisi daha sonra aspire edilmiş ve PBS+ ile iki yıkamadan sonra boyanan hücreler hızlı bir şekilde floresan mikroskop (Olympus, ABD) altında incelenmiştir. Her grup için üç paralel örnekten görüntüleme yapılmıştır. Ayrıca niteliksel verilere ek olarak "canlılık yüzdesi", on adet görüntü kullanılarak ImageJ yazılımı (NIH, Bethesda, MD) ile hesaplanmıştır (Büyütme: 10X).

3.19.3.5. Apoptoz Tespiti: Anneksin V-FITC/PI Yöntemi

Glioblastoma hücrelerinde hücre ölüm mekanizmaları, Annexin V-FITC/PI boyama yöntemi kullanılarak floresan mikroskop ve akış sitometrisi analiziyle yapılan apoptoz testi aracılığıyla belirlenmiştir. Normal koşullar altında, hücre zarının sitoplazmik (iç) yüzeyinde bulunan fosfatidilserin (PS) molekülleri, erken apoptoz aşamasında dış yüzeye transloke olur. Anneksin V-FITC/PI yöntemi, transloke olmuş fosfatidilserin molekülüne floresan bir boya (FITC) ile etiketlenmiş Annexin V molekülünün bağlanmasına dayanır ve bu da hücre zarlarından yeşil floresan emisyonu ile sonuçlanır. Ayrıca, Annexin V-FITC ile birlikte kullanılan propidyum iyodür (PI) molekülü, kırmızı floresans (ex/em 528/617 nm) yayarak, geç apoptoz ve nekrotik hücrelerin aynı anda analiz edilmesine olanak tanır. Kültürün 3. gününde, boyama işlemi Annexin V-FITC/PI tespit kiti protokolüne (Annexin V-FITC, Biovision) göre gerçekleştirilmiştir. İlk olarak, hücreler üzerindeki nanopartikül içeren kültür ortamı uzaklaştırılmış ve hücrelere 500 µL 1X "bağlanma tamponu," 5 µL "Annexin V-FITC" ve 5 µL "Propidyum iyodür" eklenmiştir. Hücreler daha sonra karanlıkta oda sıcaklığında 5 dk inkübe edilmiştir. Boyama işleminin ardından, hücreler floresan mikroskop (Olympus IX71, Japonya) kullanılarak görüntülenmiştir. Erken apoptozda, plazma zarı bütünlüğünü korur ve yeşil görünür, PI boyası (kırmızı) gözlemlenmez. Geç apoptoz veya nekrozda ise, zarı hasar görmüş hücreler kırmızı (PI) ve çekirdekler etrafında yeşil bir halka ile gösterilir. Mikroskop görüntülerine ek olarak, canlı, erken apoptotik, geç apoptotik ve nekrotik hücre yüzdeleri kantitatif olarak akış sitometrisi (Beckman Coulter, FL) kullanılarak belirlenmiştir.

3.19.3.6. ROS Analizi

Kültürün üçüncü gününde hücre içi reaktif oksijen türlerinin (ROS) oluşumu DCF-DA (2',7'-Diklorofloresin diasetat) boyama ile belirlenmiştir. DCF-DA hücre membranından

geçerek sitoplazmada esterazlar ile DCF'ye dönüşmektedir. DCF ROS varlığında okside olarak floresan ışıma vermektedir. DCF-DA DMSO içerisinde çözdürülmüş ve 1 mM stok çözeltisi hazırlanmıştır. Hazırlanan stok çözeltisi %1 (v/v) L-glutamin içeren PBS+ içerisine eklenmiş ve %1'lik (h/h) DCF-DA çözeltisi elde edilmiştir. Analiz gününde hücreler üzerindeki ortam uzaklaştırılarak üzerlerine %1'lik (h/h) DCF-DA çözeltisi eklenenmiş ve 30 dk 37ºC'de inkübe edilmiştir. İnkübasyon sonunda, hücreler birkaç kez PBS+ ile yıkanmıştır. Ardından örneklerin Spectramax cihazında (ex/em 485/535 nm) floresan şiddetleri ölçülmüş ve kontrol grubuna göre örneklerin ROS değişimleri belirlenmiştir. Analiz 3 paralel örnek ile gerçekleştirilmiş ve sonuçlar kantitatif olarak değerlendirilmiştir.

3.19.3.7. Gerçek Zamanlı Polimeraz Zincir Reaksiyonu ile Gen İfadesi Analizi

GA ve ONM varlığında kültüre edilen T98G hücrelerinin gen ekspresyon seviyelerini belirlemek için kültürün üçüncü gününde RT-PCR analizi gerçekleştirilmiştir. RT-PCR çalışmalarında kontrol geni (housekeeping gen) olarak β-aktin kullanılmış ve β-aktin genine göre normalize edilen gen ifadeleri ve $2^{-\Delta\Delta Ct}$ yöntemi ile bağıl olarak belirlenmiştir. Gen seviyeleri, kontrol grubuna göre kat değişimleri şeklinde ifade edilmiştir. Analiz, **Bölüm 3.7.7**'de ayrıntılı olarak anlatılan prosedüre göre gerçekleştirilmiştir. Çalışma kapsamında Oligomer (Türkiye) firmasından temin edilen primerlere ait diziler **Çizelge 3.4'te** verilmiştir.

Çizelge 3.4. RT-PCR analizinde kullanılan primer dizileri.

Gen bölgeleri		Primer dizileri
β-aktin	**Forward**	5'-TGGCACCCAGCACAATGAA-3'
	Reverse	5'-CTAAGTCATAGTCCGCCTAGAAGCA-3'
Kaspaz-3	**Forward**	5'-AGGACTCTAGACTTCATCCA-3'
(CASP3)	**Reverse**	5'-TGACAGCCAGTGAGACTTGG-3'
β-katenin	**Forward**	5'-AATGGTTGCCTTGCTCAAC-3'
(CTNNB1)	**Reverse**	5'-TCCACCACTAGCCAGTATGATG-3'
c-Myc	**Forward**	5'-GTCAAGAGGCGAACACACAAC-3'
(MYC)	**Reverse**	5'-TTGGACGGACAGGATGTATGC-3'

3.20. PBAT Nanopartikül Yüklü *Sarcotragus foetidus* Sponjin Doku İskelelerinin Üretimi, Karakterizasyonu ve *İn Vitro* Hücre Kültür Çalışmaları

Sarcotragus foetidus sponjin doku iskelelerinin üretimi için **Bölüm 3.3**'de ayrıntılı olarak anlatılan yöntem kullanılmıştır. Karakterizasyon çalışmaları sonucuna göre üç boyutlu iskelet yapısını koruyan ve en yüksek hücre canlılığına sahip olan Sf/0.5 grubu iskelelere yükleme işlemi gerçekleştirilmiştir.

3.20.1. Sponjin Doku İskelelerine PBAT Nanopartiküllerin Yüklenmesi

Boş PBAT, GA-PBAT ve GA-ONM-PBAT nanopartiküllerin doku iskelelerine yüklenmesinde emdirme yöntemi kullanılmıştır. Bu amaçla belirlenen miktarda nanopartiküller yüksek hızlı homojenizatör yardımıyla saf su içerisinde iyice dağıtılmış ve önceden hazırlanan sponjin doku iskelelerine iskele başına (2 mm yükseklik, 9 mm çap) 1 mg nanopartikül olacak şekilde emdirilmiştir.

3.20.2. SEM Analizi

Nanopartiküllerin iskele gözenekliliği üzerindeki etkisini ve iskeleler içerisindeki dağılımını incelemek amacıyla SEM analizi gerçekleştirilmiştir. Bu kapsamda boş, GA-PBAT ve GA-ONM-PBAT nanopartikül yüklü sponjin doku iskelelerinden kesitler alınarak altın-paladyum ile kaplanmış ve farklı büyütmelerde taramalı elektron mikroskobu (SEM, Tescan, FIB-SEM, GAIA 3, Çek Cumhuriyeti) ile görüntülenmiştir.

3.20.3. *İn Vitro* GA Salım Çalışmaları ve Salım Kinetiğinin İncelenmesi

GA-PBAT ve GA-ONM-PBAT nanopartikül yüklü sponjin doku doku iskelelerinden *in vitro* GA salım çalışmalarında 1 mg nanopartikül yüklü 2x9 mm boyutlarına sahip iskeleler kullanılmıştır. Çalışmalar 37°C'deki çalkalamalı etüvde 3 paralel örnek üzerinden %0,3 (k/h) sodyum azit içeren 10 mL PBS ortamında (pH 7,4) ve asetat tampounda (pH 5,5) yürütülmüştür. Belirlenen zamanlarda salım ortamından 900 µL alınmış ve yerine taze ortam eklenmiştir. Alınan örneklerin NanoDrop 2000c spektrofotometre ile absorbans değerleri ölçülmüş ve **Şekil 3.11**'deki GA kalibrasyon

grafiği kullanılarak salım profilleri hazırlanmıştır. Salım verileri Eşitlik 8-11'e uyarlanarak kinetik modellere ait regresyan katsayıları hesaplanmıştır. Böylece, salım profillerine uygun kinetik modele karar verilmiştir.

3.20.4. T98G Hücreleri ile Yürütülen Hücre Kültür Çalışmaları

Hücre kültür çalışmalarında 5 farklı doku iskelesi kullanılmıştır. Bu iskeleler aşağıda belirtilmiştir:

1. GA, ONM ve PBAT nanopartikül içermeyen doku iskelesi: Sf
2. Boş PBAT nanopartikül yüklü doku iskelesi: Sf/PBAT
3. GA-PBAT nanopartikül yüklü doku iskelesi: Sf/GA-PBAT
4. GA-ONM-PBAT nanopartikül yüklü doku iskelesi: Sf/GA-ONM-PBAT
5. Serbest GA yüklü doku iskelesi: Sf/GA

Hazırlanan doku iskelelerinin T98G glioblastoma hücreleri üzerindeki etkinliği 3 gün süren *in vitro* hücre kültür çalışmaları ile incelenmiştir. Hücre kültürü çalışmalarında kullanılacak doku iskelelerinin hazırlanması aşamasında öncelikli olarak GA ve nanopartiküller 30 dk UV ışık altında bekletilmiş ve steril edilmiştir. İskeleleri sterilizasyonu için ise iskeleler 70'lik (h/h) etanolde çöktürülerek 1 sa bekletilmiş, 3 kez DPBS ile yıkanmış ve her yüz için 1 sa olacak şekilde UV ışığa maruz bırakılmıştır. Sterilizasyon basamaklarının ardından laminer kabin içerisinde steril koşullarda doku iskelelerine emdirme işlemi gerçekleştirilmiştir. Ekim öncesi tüm iskeleler %10 (h/h) FBS, %1 (h/h) penisilin-streptomisin ve DMEM-F12 içeren proliferasyon ortamında 1 gün boyunca bekletilmiş ve iskelelerin serum proteinleri ile etkileşmesi sağlanmıştır. Bir günün sonunda örnekler üzerindeki ortam uzaklaştırılmış ve iskeleler steril koşullarda kurumaya bırakılmıştır. Hücreler 30 µL proliferasyon ortamı içerisinde $2x10^5$ hücre/mL yoğunluğunda olacak şekilde steril-kuru doku iskelelerine ekilmiştir. Birer saat ara ile iskeleler üzerine 30'ar µL ortam eklenmiş ve 3 sa sonunda örnekler üzerindeki ortam 1 mL'ye tamamlanmıştır. Örnekler 37ºC'de %95 nem ve %5 (h/h) CO_2 ortamında inkübe edilmiş ve kültür süresi boyunca aşağıdaki analizler gerçekleştirilmiştir.

3.20.4.1. MTT Analizi

Hücrelerin doku iskeleleri içerisindeki canlılık değerleri ve doku iskelelerinden salınan GA ve ONM'nin hücrelerin canlılıkları üzerindeki etkisi kültür süresi boyunca her gün mitokondriyal aktivite testi ile incelenmiştir. Analiz kapsamında iskeleler üzerindeki ortam aspire edilmiş ve iskeleler steril bir pens yardımı ile yeni bir 24-gözlü TCPS'e aktarılmıştır. Ardından **Bölüm 3.4**'te anlatılan işlemler gerçekleştirilmiştir. Kontrol grubu olarak TCPS yüzeyinde çoğaltılan hücreler kullanılmış ve aşağıdaki Eşitlik-13 ile hücrelerin % canlılık değerleri hesaplanmıştır.

$$\text{Hücre canlılığı (\%)} = \frac{\text{Doku iskelesi üzerindeki hücrelerin absorbansı}}{\text{TCPS yüzeyinde çoğaltılan hücrelerin absorbansı}} \text{x} 100 \qquad \text{Eşitlik-13}$$

3.20.4.2. Konfokal Lazer Taramalı Mikroskop (CLSM) ile Analiz

Doku iskeleleri içerisindeki hücrelerin organizasyonu ile canlı ve ölü hücrelerin dağılımı kültürün 3. gününde incelenmiştir ve doku iskelelerine **Bölüm 3.19.3.4**'te anlatılan prosedür modifiye edilerek uygulanmıştır. Analiz gününde iskeleler üzerindeki ortam aspire edilerek örnekler PBS+ ile iki kere yıkanmıştır. Ardından, örnekler 1 mM Calcein AM ve 1 mM EthD-1 içeren boya çözeltisinde karanlıkta 30 dk süresince bekletilmiştir. Boyanan örnekler PBS+ ile 2 kez yıkanarak hızlı bir şekilde Hacettepe Üniversitesi İleri Teknolojiler Uygulama ve Araştırma Merkezi'nde bulunan konfokal lazer taramalı mikroskobu (CLSM, Zeiss LSM 510, Almanya) kullanılarak incelenmiştir. Canlı hücreler Calcein AM boyanarak yeşil ışıma verirken ölü hücreler EthD-1 ile boyanarak kırmızı ışıma vermiştir. Elde edilen 3 boyutlu görüntüler ve ImageJ yazılımı kullanılarak kırmızı ve yeşil renkli hücre sayıları belirlenmiş ve "canlılık yüzdesi" hesaplanmıştır.

3.21. İstatistiksel Analiz

Tez kapsamındaki tüm deneyler en az üç tekrar ile gerçekleştirilmiş ve tüm veriler ortalama ± standart sapma olarak ifade edilmiştir. İstatistiksel analizler için GraphPad InStat yazılımı (GraphPad, ABD) kullanılmıştır. Gruplar arasındaki anlamlı farklılıklar, One way ANOVA Student t-testi kullanılarak analiz edilmiş, *p* değerlerinin 0,05'ten

küçük olduğu durumlar istatistiksel olarak anlamlı bulunmuş ve *p* değerlerinin 0,05'ten büyük olması anlamlı olmayan durumları temsil etmiştir.

4. SONUÇLAR VE TARTIŞMA

Doğal kaynaklarımızdan *Sarcotragus foetidus* deniz süngerinin sert ve yumuşak doku mühendisliğinde kullanımını araştıran tez çalışması üç aşamada gerçekleştirilmiştir

İlk aşamada, süngerin üç boyutlu iskeleti izole edilerek mikrodalga desteğiyle HAp ve B-HAp ile kaplanmıştır. Elde edilen biyohibrit doku iskeleleri, fiziksel ve kimyasal olarak karakterize edildikten sonra MC3T3-E1 preosteoblast hücre hattı ile biyouyumlulukları ve kemik dokuya farklılaşma potansiyelleri statik kültürde değerlendirilmiştir. Ayrıca, yapılan bakteri kültürü çalışmaları ile bu iskelelerin antibakteriyel özellikleri de araştırılmıştır.

İkinci aşamada, yumuşak doku mühendisliği uygulamalarına yönelik olarak *Sarcotragus foetidus* süngerinden deniz kaynaklı kolajen (*marine collagen*) izole edilmiştir. Farklı protokoller uygulanarak elde edilen kolajenin hidrojel formunda bir yumuşak doku iskelesi olarak kullanılabilirliği incelenmiştir. İzole edilen kolajenin fiziksel, kimyasal ve termal özellikleri detaylı karakterizasyon çalışmaları ile belirlenmiş; ayrıca aminoasit profili ve proteomik özellikleri kapsamlı testlerle değerlendirilmiştir.

Üçüncü aşamada, yumuşak doku kanserlerinden glioblastoma tedavisine yönelik lokal olarak uygulanabilecek yenilikçi bir ilaç taşıyıcı sistem geliştirilmiştir. Bu kapsamda, *Sarcotragus foetidus* ve PBAT polimeri kullanılarak gallik asit (GA) yüklü 3 boyutlu taşıyıcı sistemler tasarlanmıştır. Kanserli bölgede GA'nın uzun süreli salımını destekleyerek antikanser etkisini artırmak amacıyla *Opuntia ficus indica* müsilajı (ONM) ile partikül kaplaması gerçekleştirilmiştir. Geliştirilen sistemin glioblastoma üzerindeki etkileri, T98G insan glioblastoma hücreleri kullanılarak yapılan *in vitro* hücre kültür çalışmaları ile analiz edilmiştir.

Tez çalışmasında elde edilen bulgular, her bir aşama için detaylı olarak aşağıda sunulmuştur.

KISIM I

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

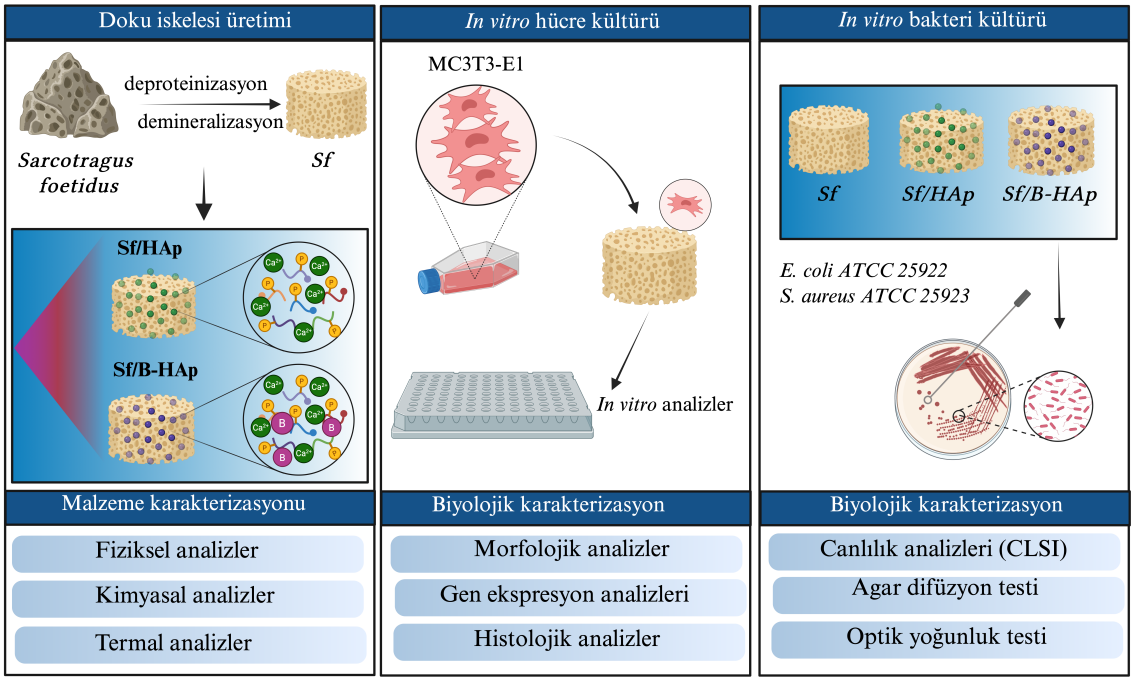
sağlıklı kemiğinden alınan otogreftler, kadavralardan elde edilen allogreftler ve hayvan kaynaklı zenogreftler olmak üzere üç gruba ayrılmaktadır. Bunlar arasında otogreftler klinikte sıklıkla tercih edilmektedirler. Çünkü, otogreftler klinik uygulamalarda implante edildiği kemik ile bütünleşmesi ve hastanın bağışıklık sisteminde herhangi bir tepkiye neden olmaması açılarından daha avantajlıdır. Fakat, hastanın yeni bir operasyon geçirmesine ve yeni bir kemik hasarına neden olmasından dolayı kullanımı kısıtlıdır [4]. Son yıllarda yapılan araştırmalar, kemik hasarlarının tedavisinde alternatif bir yöntem olarak kemik doku mühendisliğine odaklanmıştır. Bu yaklaşımın temel amacı, hücreler, biyosinyal moleküller ve doku iskeleleri kullanılarak kemiğin onarımını ve yenilenmesini destekleyen yeni kemik yamaları geliştirmektir. Bu süreçte biyosinyal moleküller, doku iskelesi içindeki hücreleri yönlendirerek kemik dokuya farklılaşmalarını sağlarken, doku iskeleleri ise kemiğin doğal yapısını taklit ederek yapısal destek sunmaktadır.

Yapay hücre dışı matriks olarak tasarlanan doku iskelelerinin, doğal hücre dışı matriksi taklit ederek yeniden oluşumuna katkı sağlaması gerekmektedir. Bu nedenle, iskele malzemelerinin, yerini alacağı dokuya ve doğal matrikse benzerlik göstermesi büyük önem taşır. Kemik gibi sert dokuların onarımında ve yenilenmesinde genellikle biyoseramik, biyopolimer veya kompozit temelli sentetik doku iskeleleri tercih edilmektedir [4]. Ancak, bu iskelelerin klinik kullanımı sırasında, hasarlı bölgede yeni kemik oluşumunu yeterince desteklememesi, rezorbsiyon hızının istenilen düzeyde olmaması ve bakteriyel enfeksiyonlara bağlı biyomalzeme hasarı gibi çeşitli sorunlarla karşılaşılmaktadır. Bu problemlerin üstesinden gelebilmek için alternatif doku iskeleleri üzerinde çalışmalar sürmektedir. Bu bağlamda, gözenekli ve üç boyutlu iskelet yapısına sahip doğal kaynak olarak süngerler, biyouyumlu ve biyobozunur özellikleri sayesinde sentetik doku iskelelerine güçlü bir alternatif olarak öne çıkmaktadır [11].

Kemik doku mühendisliğinde geliştirilen yapıların yeterli mekanik dayanım ve yapısal bütünlük sağlayamaması, bu alandaki en temel sorunlardan biri olarak öne çıkmaktadır. Buna ek olarak, hücrelerin iskele yüzeyine etkin biçimde immobilize olamaması, yayılım ve proliferasyon süreçlerinde karşılaşılan zorluklar ile osteojenik farklılaşmanın yetersiz kalması da önemli diğer sınırlamalardır. Bu tez çalışmasında, söz konusu problemlere yönelik çözüm geliştirilmesi amaçlanmıştır. Bu doğrultuda, tezin ilgili bölümü aşağıda belirtilen iş paketlerini kapsamaktadır:

1. *Sarcotragus foetidus* süngerinden sponjin bazlı doku iskelelerinin elde edilmesi,
2. Elde edilen iskelelerin hidroksiapatit (HAp) ve bor katkılı hidroksiapatit (B-HAp) ile modifiye edilerek biyohibrit doku iskelelerinin üretilmesi,
3. MC3T3-E1 preosteoblast hücrelerinin bu iskeleler üzerinde kültüre edilmesi,
4. Hücrelerin osteojenik etkinlik açısından hücresel aktivitelerinin karşılaştırmalı olarak değerlendirilmesi,
5. CLSI (Clinical and Laboratory Standards Institute) standartları çerçevesinde mikrobiyolojik testlerin yapılması.

Bu bölümde yürütülen çalışmalara ait sonuçlar ve tartışmalar aşağıda ayrıntılı olarak sunulmuş olup, çalışmaların genel sürecine ilişkin özet akış şeması **Şekil 4.1**'de yer almaktadır.



Şekil 4.1. Tez çalışmasının ilk kısmına ait akış şeması (BioRender.com ile oluşturulmuştur; https://BioRender.com).

4.1. *Sarcotragus foetidus* Süngerlerinin İskelet Yapılarının İzole Edilmesi ile 3B Sponjin Doku İskelelerinin Eldesi

Demonspongiae ailesinden *Sarcotragus foetidus* süngeri, üç boyutlu iskelet yapısının doğal kemik dokusuna olan benzerliği sayesinde doku mühendisliği uygulamalarında dikkat çeken biyomalzemelerden biri olarak değerlendirilmektedir. Özellikle Ege ve

Akdeniz Havzası'nda yaygın olarak bulunan bu sünger, biyobozunur yapısı ve biyouyumluluğu ile ön plana çıkmaktadır. Sponjin fibrillerinin yüksek su tutma kapasitesi, açık ve birbirine bağlı gözenek yapısı, kolajen içeriği ve zengin lif mimarisi, bu malzemeyi sponjin içermeyen diğer doku iskelesi alternatiflerine göre daha avantajlı kılmaktadır. Ayrıca, sponjin içeriği sayesinde, *Sarcotragus foetidus* kökenli iskeleler, alternatif doku iskelelerine nazaran daha güçlü bir mekanik stabiliteye ve yapısal bütünlüğe sahiptir [11]. Tüm bu özellikler göz önünde bulundurularak, bu tez çalışmasında kemik doku mühendisliği uygulamaları için *Sarcotragus foetidus* süngerinin doku iskelesi materyali olarak seçilmesi uygun görülmüştür.

Muğla'nın Ortaca ilçesine bağlı Sarıgerme/Baba Adası kıyılarından Su Ürünleri Mühendisi Özgür Dara tarafından temin edilen *Sarcotragus foetidus* türü deniz süngerleri, literatürde bildirilen protokollere kıyasla daha düşük konsantrasyonlardaki sodyum hidroksit ve asetik asit çözeltileri ile muamele edilmiş ve sponjin bazlı 3B iskelelere dönüştürülmüştür. Bu kapsamda, düşük derişimlerde çalışılarak iskelelerin yapısal bütünlüğünün ve 3B mimarisinin korunması amaçlanmıştır. Elde edilen iskelelere ilişkin karakterizasyon çalışmaları gerçekleştirilmiş ve sonuçlar aşağıda detaylı biçimde sunulmuştur.

4.1.1. Sponjin Doku İskelelerinin Karakterizasyonu ve Hücre Canlılığına Etkisinin Belirlenmesi

Bu bölümde, tez çalışmasında kullanılan sponjin bazlı doku iskelelerine yönelik gerçekleştirilen karakterizasyon çalışmalarına yer verilmiştir. Bu amaçla, sponjin doku iskeleleri morfolojik analizler, ATR-FTIR analizi ve su tutma kapasitesi testlerine tabi tutulmuş ve ardından yapılan *in vitro* hücre kültür çalışmalarıyla iskelelerin biyouyumluluğu ve hücre canlılığı üzerindeki etkileri değerlendirilmiştir. Karakterizasyon çalışmaları 5 farklı grup üzerinden gerçekleştirilmiş olup bu gruplar;

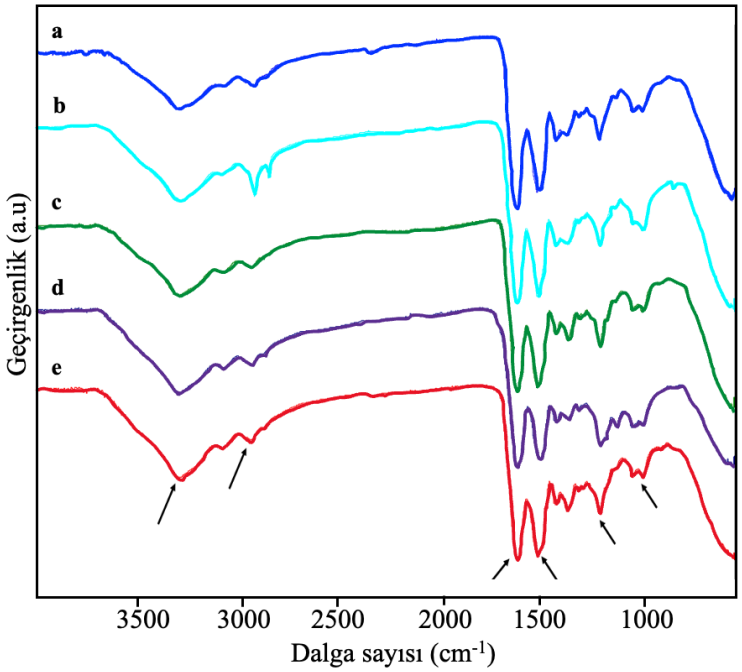
1. İşlem görmemiş *Sarcotragus foetidus* süngeri (Sf-)
2. Yüzde 20 (h/h) asetik asit, 0,25 M NaOH ve hidrojen peroksit ile muamele edilmiş *Sarcotragus foetidus* süngeri (Sf/0.25)
3. Yüzde 20 (h/h) asetik asit, 0,50 M NaOH ve hidrojen peroksit ile muamele edilmiş *Sarcotragus foetidus* süngeri (Sf/0.50)

4. Yüzde 20 (h/h) asetik asit, 0,75 M NaOH ve hidrojen peroksit ile muamele edilmiş *Sarcotragus foetidus* süngeri (Sf/0.75)
5. Yüzde 20 (h/h) asetik asit, 1,0 M NaOH ve hidrojen peroksit ile muamele edilmiş *Sarcotragus foetidus* süngeri (Sf/1.0)

şeklindedir. İskelelerin karakterizasyonu için yapılan analizlerin sonuçları ve bunlara dair tartışmalar aşağıda ayrıntılı olarak ele alınmıştır.

4.1.1.1. Kimyasal Yapı Analizi

Sponjin doku iskelelerinde demineralizasyon ve deproteinizasyon basamakları sonrasında meydana gelen kimyasal değişimlerin belirlenebilmesi için 400-4000 cm^{-1} dalga boyu aralığında iskelelerin ATR-FTIR spektrumları alınmıştır. Elde edilen spektrumlar **Şekil 4.2**'de gösterilmiştir.



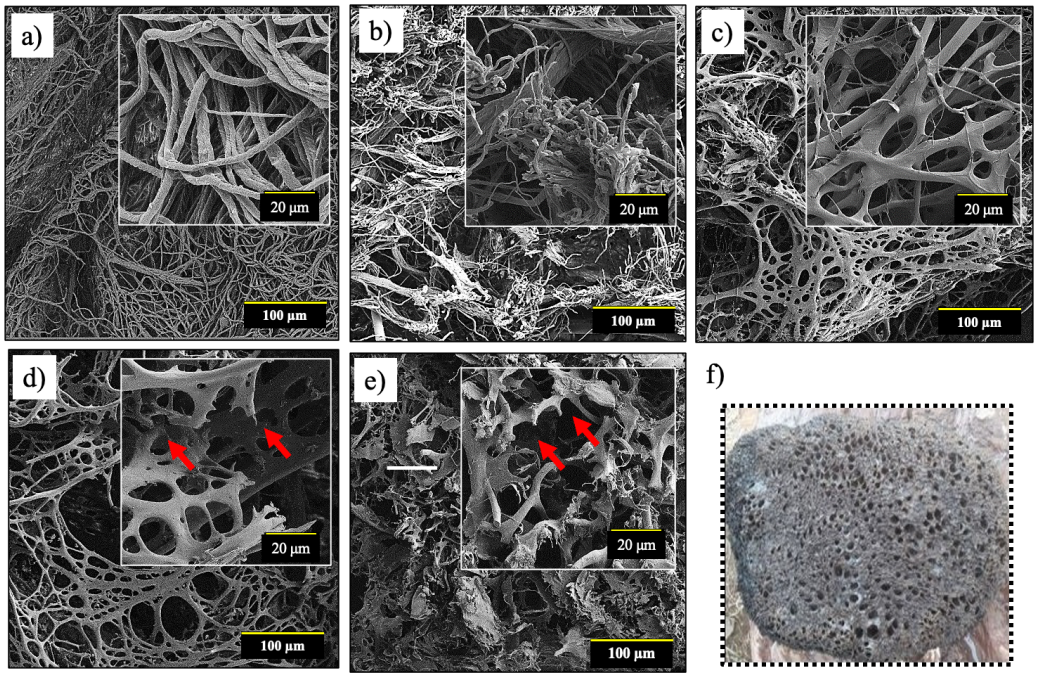
Şekil 4.2. *Sarcotragus foetidus* süngerinden izole edilen doku iskelelerine ait ATR-FTIR spektrumları: (a) Sf-, (b) Sf/0.25, (c) Sf/0.50, (d) Sf/0.75, (e) Sf/1.0.

Sf- grubu doku iskelesine ait spektrum incelendiğinde, karakteristik olarak 1026 cm^{-1} dalga sayısında C-O gerilmesi, 1230 cm^{-1} dalga sayısında C-N gerilmesi, 1540 cm^{-1} dalga sayısında NH_2 bükülmesi, 1636 cm^{-1} dalga sayısında ise C=O gerilmesi bandı görülmektedir. Ayrıca, yaklaşık 2930 cm^{-1}'de görülen pik C-H gerilmesine ve 3300 cm^{-}

[1]'de görülen pik ise N-H gerilmesi ile örtüşen C-O grubuna aittir [234]. Bu pikler sponjini tanımlayan gösterge piklerdir. Sponjin için karakteristik piklerin Sf/0.25, Sf/0.50, Sf/0.75 ve Sf/1.0 isklelerine ait spektrumlarda olduğu, dolayısıyla süngerin iskele formuna gelirken kimyasal yapısında herhangi bir değişimin olmadığı görülmüştür. Sponjin, *Sarcotragus foetidus* süngerinin lifli iskelet yapısının temel organik bileşenidir ve kolajen I'e benzerlik gösterir [83]. Kolajen, kemik iyileşmesinde en yaygın kullanılan doğal malzemelerden biridir [82]. Exposito'nun 2002 yılında gerçekleştirdiği bir çalışmada [18], sünger iskeleti ile omurgalılara ait hücre dışı matriks (ECM) arasındaki biyokimyasal benzerlikleri incelenmiş ve sünger iskeletindeki sponjin liflerinin yapısal olarak insan trabeküler (süngerimsi) kemiğine büyük ölçüde benzediği bildirilmiştir.

4.1.1.2. Morfolojik İncelemeler

İskelelerin yüzey morfolojilerini incelemek amacıyla taramalı elektron mikroskobu (SEM) analizi yapılmıştır. İskeleler altın-paladyum ile kaplanmış ve ardından SEM (EVO50; Zeiss, Almanya) ile incelenmiştir. Doku iskelelerinin farklı büyütmelerdeki SEM görüntüleri **Şekil 4.3**'te sunulmuştur.



Şekil 4.3. *Sarcotragus foetidus süngerinden* izole edilen doku iskelelerine ait farklı büyütmelerdeki SEM görüntüleri: (a) Sf-, (b) Sf/0.25, (c) Sf/0.50, (d) Sf/0.75, (e) Sf/1.0,

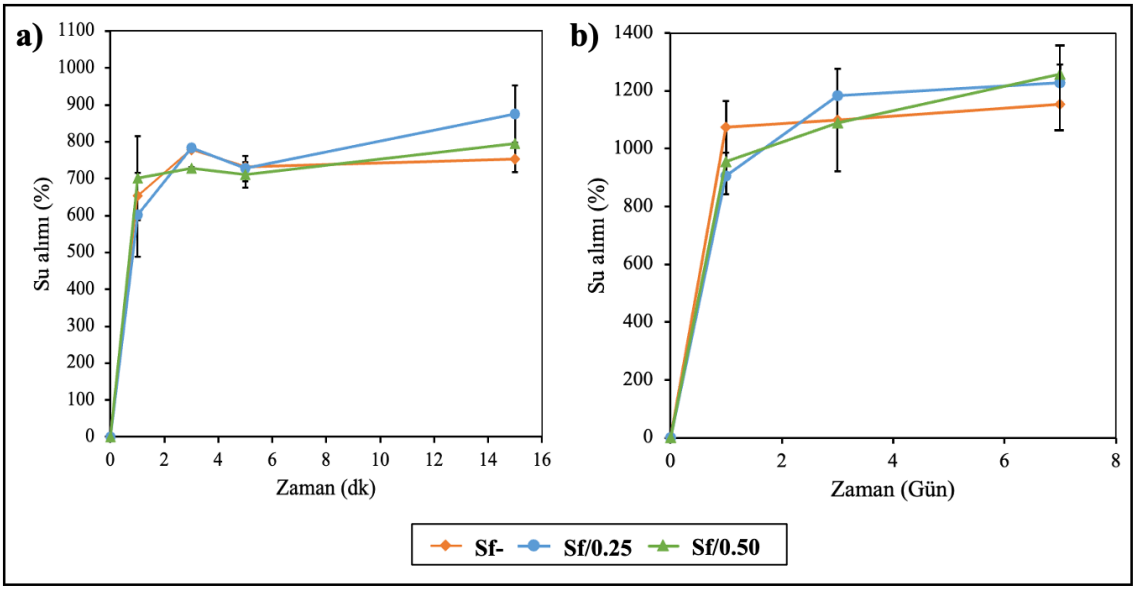
(f) süngerin makroskobik kamera görüntüsü (Kırmızı oklar sponjin liflerin kırılma bölgelerini göstermektedir).

Şekil 4.3'te sunulan SEM görüntüleri incelendiğinde, tüm doku iskelelerinin nanofibröz yapıya sahip olduğu görülmüştür. Sf- ve Sf/0.25 grubu iskelelerinde gözeneklerin belirgin bir şekilde oluşmadığı (**Şekil 4.3.a, b**), ancak Sf/0.50 grubunda homojen, pürüzsüz ve içsel bağlantılara sahip gözeneklerin oluştuğu tespit edilmiştir (**Şekil 4.3.c**). Sodyum hidroksit konsantrasyonunun artırıldığı Sf/0.75 ve Sf/1.0 iskelelerinde ise fibrillerin morfolojisinin bozulması sonucu, iskelelerin 3B yapılarının kaybolduğu gözlemlenmiştir (**Şekil 4.3.d, e**). Yüksek NaOH derişimlerinin sponjin iskelelerin 3B yapılarını bozmasının birkaç nedeni vardır: sponjin, protein bazlı bir yapıya sahiptir ve yüksek NaOH derişimleri, bu proteinleri hidrolize ederek çözünmelerine yol açar. Bu durum, sponjin liflerinin bütünlüğünü bozar ve iskele yapısının zayıflamasına neden olur. Ayrıca, yüksek derişimli alkali çözeltiler, sponjin lifleri arasındaki çapraz bağları zayıflatarak yapının bütünlüğünü daha da zedeleyebilir [235].

ATR-FTIR ve SEM analizi sonucunda elde edilen bulgular ışığında karakterizasyon çalışmalarına 3B yapısal bütünlüğün korunduğu Sf-, Sf/0.25 ve Sf/0.50 iskele grupları ile devam edilmesine karar verilmiştir.

4.1.1.3. Şişme Analizi

İskelelerin su tutma kapasiteleri şişme analizi ile belirlenmiş ve su alım yüzdeleri **Bölüm 3.4'**de yer alan Eşitlik-1 kullanılarak hesaplanmıştır. Analiz kapsamında fizyolojik koşulları taklit eden (37 °C, pH 7,4) PBS ortamında inkübe edilen doku iskeleleri kullanılmıştır. İskelelerin zamana bağlı su tutma kapasitelerini (su alımı, %) gösteren grafikler **Şekil 4.4**'te sunulmuştur.



Şekil 4.4. Doku iskelelerinin su alım kapasitesinin zamanla değişimi a) dk b) gün ile.

Şekil 4.4'te de görüldüğü üzere, her üç doku iskelesinin su alım kapasitelerinde zamanla sürekli bir artış gözlemlenmiştir. Sf/0.50 grubu iskelelerin su alım kapasitesi yedinci gün sonunda dengeye ulaşırken, Sf- ve Sf/0.25 gruplarında dengeye üçüncü günde erişilmiştir. Sünger bazlı iskelelerin yüksek su tutma kapasiteleri, süngerden elde edilen sponjin yapıların yüksek gözeneklilik ve elastikiyet özelliklerinden kaynaklanmaktadır. Bu özellikler, yapıların kısa sürede fazla miktarda suyu absorbe edebilmesini mümkün kılmaktadır. Doku iskelelerinin denge halindeki su alım yüzdeleri, Sf- grubunda ~ 1000, Sf/0.25 grubunda ~ 1100 ve Sf/0.50 grubunda ise ~ 1200 olarak belirlenmiştir (**Çizelge 4.1**). SEM görüntüleri, alkali işlemlerin iskelelerin gözenekliliğini artırdığını ortaya koymaktadır. Bu doğrultuda, NaOH konsantrasyonundaki artışa bağlı olarak iskelelerin su alım kapasitesitelerinde gözlemlenen artış da beklenen bir sonuç olarak değerlendirilebilir.

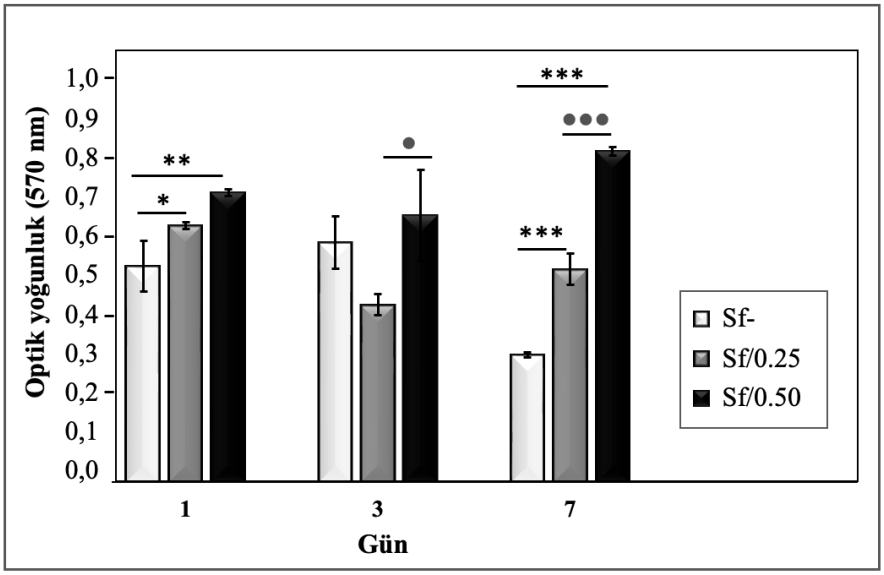
Çizelge 4.1. Doku iskelelerinin denge durumundaki su alım yüzdeleri.

Doku iskelesi	Denge durumundaki su alımı (%)
Sf-	1099,6 ± 201,4
Sf/0.25	1184,6 ± 84,6
Sf/0.50	1256,8 ± 329,1

4.1.1.4. *İn Vitro* hücre kültür çalışmaları

Hücre canlılığı analizi

Sarcotragus foetidus süngerinden izole edilen 3B nanofibröz yapıdaki sponjin iskelelerin hücre mikro-çevresini taklit etme potansiyelini ve hücresel uyumluluğunu değerlendirmek amacıyla hücre kültürü çalışmaları gerçekleştirilmiştir. MC3T3-E1 preosteoblastik hücre hattı kullanılarak yapılan 7 günlük kültür çalışmasında hücre canlılığının takibi MTT analizi ile yapılmış ve sonuçlar istatistiksel olarak değerlendirilip **Şekil 4.5**'te sunulmuştur.



Şekil 4.5. Hücre kültür çalışmasının 1, 3 ve 7. günlerinde doku iskeleleri üzerinde çoğaltılan MC3T3-E1 hücrelerinin mitokondriyal aktiviteleri. (İstatistiksel anlamlı farklılıklar n = 3, **p<0,05*, ***p<0,01*, ****p<0,001* gün bazında Sf- iskele grubundaki hücreler kontrol grubu iken; •*p<0,05*, ••*p<0,01*, •••*p<0,001* gün bazında Sf/0.25 iskele grubundaki hücreler kontrol grubu iken).

Şekil 4.5'te yer alan absorbans değerleri incelendiğinde, tüm iskele gruplarının MC3T3-E1 hücrelerinin tutunması ve çoğalması açısından uygun bir mikro-çevre sağladığı görülmektedir. Tüm gruplarda elde edilen yüksek absorbans değerleri, hücrelerin yüksek düzeyde canlılık gösterdiğine işaret etmektedir. Birinci, 3. ve 7. günlerde elde edilen sonuçlar, Sf/0.50 grubunun hücre canlılığı açısından Sf- ve Sf/0.25 gruplarına kıyasla istatistiksel olarak daha yüksek biyolojik aktiviteye sahip olduğunu ortaya koymaktadır.

Yedinci gün sonunda Sf/0.50 grubunda gözlemlenen hücre canlılığı, Sf- grubuna göre yaklaşık üç kat, Sf/0.25 grubuna göre ise yaklaşık iki kat daha fazladır. Gruplar kendi içinde değerlendirildiğinde, Sf/0.50 grubunda absorbans değerlerinin zamanla artış gösterdiği gözlemlenmiştir. Buna karşın, diğer gruplarda absorbans değerlerinde günlere bağlı olarak dalgalanmalar (artış ve azalışlar) meydana gelmiş olsa da, bu değişimler istatistiksel olarak anlamlı bulunmamıştır. İlgili literaürde *Demospongiae* sınıfına ve *Heteroscleromorpha* takımına ait *Callyspongiidae* familyasından süngerlerle gerçekleştirilen bir *in vitro* çalışmada, bu süngerlerin osteoblast hücre canlılığı üzerinde olumlu etkiler gösterdiği bildirilmiştir [81]. Benzer şekilde, yine aynı sınıf ve takıma ait *Biemna* türü süngerlerle MC3T3 preosteoblast hücreleri kullanılarak yapılan bir diğer çalışmada, *Biemna* süngerlerinin osteokonduktif özellik taşıdığı ve doku mühendisliği uygulamalarında potansiyel bir biyomalzeme olarak değerlendirilebileceği rapor edilmiştir [12]. Mevcut tez çalışmamızda da literatürde bildirilen bu bulgularla örtüşen benzer sonuçlar elde edilmiştir.

Yukarıda ayrıntılı olarak sunulan analiz sonuçları bir bütün olarak değerlendirildiğinde; hücre tutunması ve proliferasyonunu en iyi şekilde destekleyen, aynı zamanda üç boyutlu sponjin iskele yapısını koruma ve stabilitesini sağlama açısından en başarılı sonuçları veren Sf/0.50 grubuyla çalışmanın sürdürülmesine karar verilmiştir. Çalışmanın devamında bu grup "Sf" olarak adlandırılmıştır.

4.2. HAp ve B-HAp Kaplı Sponjin Bazlı Biyohibrit Doku İskelelerinin Hazırlanması

Kemik doku mühendisliği uygulamaları için geliştirilen iskelelerin doğal kemik matriksiyle biyomimetik uyum sağlaması, atık maddelerin difüzyonuna olanak tanıyacak şekilde üç boyutlu ve gözenekli bir yapıya sahip olması, aynı zamanda yüksek mekanik dayanıklılık göstermesi ve yerleştirildiği doku ile bütünleşebilmesi gereklidir. Bunun yanında, osteoblast hücrelerinin farklılaşmasını desteklemek amacıyla osteoindüktif özellik göstermesi ve kemik dokusunun 3B yapısının oluşumuna katkı sağlayacak osteokondüktif özellik taşıması da son derece önemlidir [236].

Yapılan araştırmalar, kemik dokusunun yaklaşık %60'ının hidroksiapatit (HAp), %20'sinin ise kolajen liflerden oluştuğunu ortaya koymuştur [87]. Literatürde, HAp'ın kimyasal ve fiziksel özelliklerini geliştirmek amacıyla çeşitli iyonlarla katkılanmasına

yönelik araştırmalar mevcuttur. Bor (B), insanlar, hayvanlar ve bitkiler için hayati öneme sahip bir iz elementtir. Literatürde borun, hücresel işlevler, enzimatik süreçler ve yara iyileşmesi gibi birçok biyolojik süreçte rol oynadığı gösterilmiştir [105, 106]. Özellikle kemik dokusu üzerine etkilerini inceleyen çalışmalar, borun osteojenik farklılaşmayı desteklediğini ve kemik hastalıklarının tedavisinde terapötik potansiyel taşıdığını ortaya koymaktadır [25, 26, 107, 108]. Bu nedenle, borla modifiye edilmiş hidroksiapatit (HAp), kemik doku mühendisliği için umut vadeden bir biyomalzeme olarak değerlendirilmektedir [27].

Bu bilgilerden yola çıkarak mevcut tez çalışmasında, iskelet yapısında kolajen benzeri sponjin içeren *Sarcotragus foetidus* süngerleri, Gümüşderelioğlu grubunun geliştirdiği mikrodalga destekli biyomimetik yöntem kullanılarak [24] hidroksiapatit (HAp) ile kaplanmıştır. Kullanımı pratik olan mikrodalga yöntemi sayesinde, kısa sürede yüksek verimli bir kaplama elde edilmiştir. HAp oluşumu sırasında, preosteoblast hücrelerin kemik dokusuna farklılaşmasını teşvik etmek amacıyla biyosinyal molekül olarak bor (B) katkısı yapılmıştır [27]. Sonuç olarak, HAp ve bor katkılı HAp (B-HAp) ile kaplanan sünger iskeleler, *in vitro* hücre ve bakteri kültürü çalışmalarıyla hem kemik doku rejenerasyonu hem de antibakteriyel etkileri açısından değerlendirilmiştir.

4.3. Sponjin Bazlı Biyohibrit Doku İskelelerinin Karakterizasyonu

Bu bölümde, geliştirilen HAp ve B-HAp kaplı sponjin doku iskelelerinin karakterizasyonuna yönelik gerçekleştirilen analizler sunulmuştur. Karakterizasyon çalışmaları kapsamında, iskelelerin kimyasal ve morfolojik özellikleri ATR-FTIR, SEM ve Mikro-CT analizleri ile incelenmiştir. Bunun yanı sıra, iskelelerin mekanik ve termal özellikleri analiz edilmiş, biyobozunma davranışları ile birlikte şişme kapasiteleri belirlenmiştir. Karakterizasyon çalışmaları üç farklı grup üzerinde yürütülmüş olup, bu gruplar aşağıdaki şekilde tanımlanmıştır:

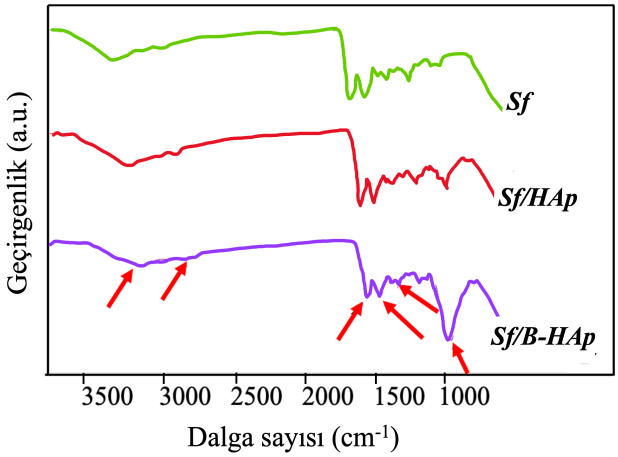
1. Yüzde 20 (h/h) asetik asit, 0,50 M NaOH ve hidrojen peroksit ile muamele edilmiş *Sarcotragus foetidus* süngeri (Sf)
2. Yüzde 20 (h/h) asetik asit, 0,50 M NaOH ve hidrojen peroksit ile muamele edilerek HAp ile kaplanmış *Sarcotragus foetidus* süngeri (Sf/HAp)

3. Yüzde 20 (h/h) asetik asit, 0,50 M NaOH ve hidrojen peroksit ile muamele edilerek B-HAp ile kaplanmış *Sarcotragus foetidus* süngeri (Sf/B-HAp)

Analizlere ait bulgular aşağıda kapsamlı bir şekilde verilmiştir.

4.3.1. ATR-FTIR Analizi

Kaplanan sponjin iskelelerin kimyasal yapı ve bileşimlerini belirlemek amacıyla ATR-FTIR analizi gerçekleştirilmiş, spektrumları alınarak **Şekil 4.6**'da sunulmuştur.



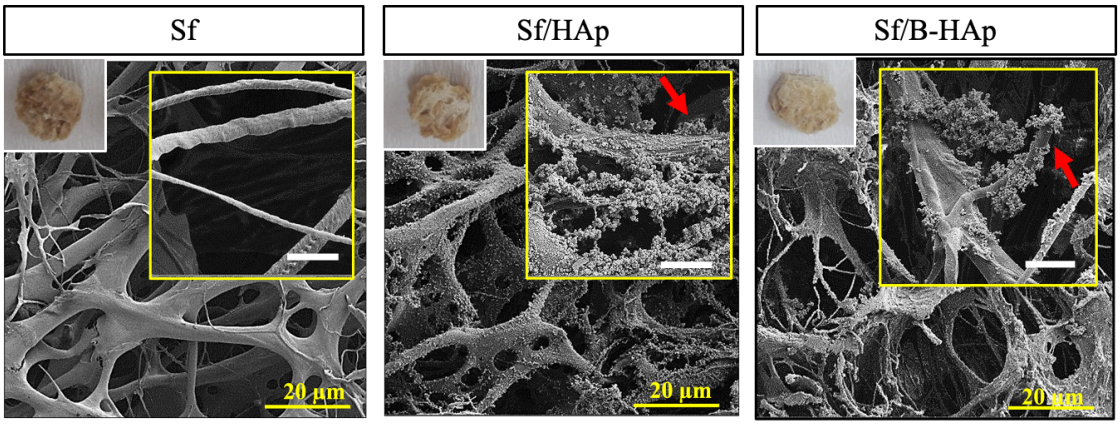
Şekil 4.6. Sf, Sf/HAp ve Sf/B-HAp sponjin doku iskelelerine ait ATR-FTIR spektrumları.

Şekil 4.6'da, yapıya absorbe olan bağlı suya ait karakteristik pik 3000–3500 cm^{-1} dalga sayısı aralığında gözlemlenmiş olup, bu pik tüm grupların spektrumlarında yer almaktadır. Sponjin yapısına özgü karakteristik adsorpsiyon bantları Sf grubu iskelelerde 3300 cm^{-1} (N–H gerilmesi), 2930 cm^{-1} (C–H gerilmesi), 1636 cm^{-1} (C=O gerilmesi), 1540 cm^{-1} (NH_2 bükülmesi), 1230 cm^{-1} (C–N gerilmesi) ve 1026 cm^{-1} dalga sayılarında tespit edilmiş [234], bu bantların kaplama yapılan Sf/HAp ve Sf/B-HAp grubu iskelelerin spektrumlarında da korunmuş olduğu görülmüştür. Bu durum, kaplama işleminin sponjinin kimyasal yapısında herhangi bir bozulmaya veya değişikliğe yol açmadığını göstermektedir. Apatit yapısına ait karakteristik pikler ise, Sf/HAp ve Sf/B-HAp grubu iskelelerde CO_3^{2-} grubunun asimetrik gerilme bandı olarak 1490 cm^{-1} ve PO_4^{3-} iyonlarının asimetrik gerilme bandı olarak 1019 cm^{-1} dalga sayısında belirlenmiştir [24]. Bu pikler Sf grubunda da tespit edilmiştir. Bu durum, süngerin doğal yapısında yer alan fosfat ve karbonat iyonlarının sponjin liflerine entegre olması ve bu iyonların ATR-FTIR analiziyle tespit edilebilmesiyle ilişkilendirilmiştir. Sf//HAp ve Sf/B-HAp gruplarına ait

spektrumlar incelendiğinde, yaklaşık 1000 cm^{-1} dalga sayısında gözlenen piklerin diğer iskele gruplarına göre belirgin şekilde arttığı görülmüştür. Bu artış, sponjin yapısındaki amin grupları ile kaplama sırasında yapıya dahil olan fosfat iyonları arasında oluşan kimyasal etkileşimleri işaret etmekte olup, kaplamanın başarıyla gerçekleştiğinin göstergesidir.

4.3.2. SEM Analizi

Bu çalışma kapsamında üretilen Sf, Sf/HAp ve Sf/B-HAp sponjin iskelelerin yüzey morfolojileri, elde edilen SEM görüntüleriyle analiz edilmiştir. HAp ve B-HAp kaplama uygulanmış biyohibrit iskelelere ait farklı büyütmelerde elde edilen SEM görüntüleri, iskelelerin makroskobik kamera görüntüleriyle birlikte **Şekil 4.7**'da sunulmuştur.



Şekil 4.7. Sf, Sf/HAp ve Sf/B-HAp sponjin doku iskelelerine ait farklı büyütmelerdeki SEM görüntüleri. Beyaz barlar 10 µm'yi temsil etmekte olup, HAp ve B-HAp kristal yapılarının bulunduğu alanlar kırmızı oklarla belirtilmiştir. Görselde sol üst köşede iskelelere ait kamera görüntüleri yer almaktadır.

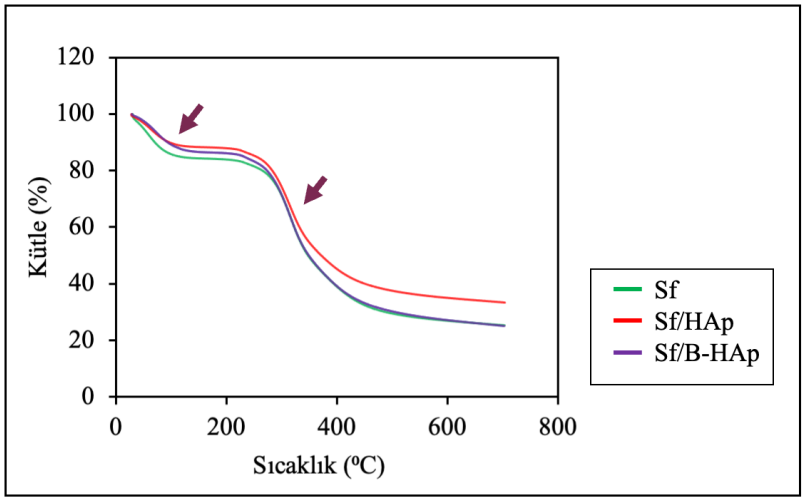
Tez kapsamında HAp kaplama işlemi için SBF (yapay vücut sıvısı), B-HAp kaplama işlemi için B-SBF (bor katkılı SBF) çözeltileri kullanılmış ve literatürdeki benzer çalışmalardan farklı olarak kaplama için mikrodalga desteğinden yararlanılmıştır. Mikrodalga uygulamasıyla oluşan hidroksiapatit yapılarının, mikrodalga enerjisi ve yüksek sıcaklığın etkisiyle sıkı bir şekilde birleşerek "karnabahar benzeri" bir morfoloji oluşturduğu gözlemlenmiştir (**Şekil 4.7**). Kaplama işleminden önce, iskeleler vakum ortamında tutulmuş ve gözeneklerdeki hava tamamen uzaklaştırılmıştır. Bu işlem

sayesinde, iskelelerin iç gözenekleri SBF/B-SBF çözeltisiyle tam olarak temas edebilmiş ve mikrodalga uygulaması sırasında iç yüzeylerde de kaplama gerçekleşmiştir. Ayrıca, kaplama aşamasında mikrodalga enerjisi iskeleler SBF/B-SBF çözeltisi içerisinde tamamen batırılmış durumda iken uygulanmış ve bu durum, her iki yüzeyin de eşit ve homojen bir şekilde kaplanmasını mümkün kılmıştır. Son olarak, SEM görüntüleri ile kaplamanın iskelelerin gözenekli yapısında belirgin bir değişikliğe neden olmadığı ve gözenekleri tıkamadığı belirlenmiştir. Kaplama sonrasında gözeneklerin açık kalması, hücre infiltrasyonu açısından önemli bir avantaj sağlamakta ve iskelelerin doku mühendisliği uygulamaları için uygunluğunu artırmaktadır [4].

Tüm bu veriler ışığında 2 mm kalınlığındaki sponjin iskelelerin HAp/B-HAp ile her bölgesinde eşit ve verimli bir kaplama sağlandığı sonucuna ulaşılmıştır (**Şekil 4.7**).

4.3.3. Termogravimetrik Analiz (TGA)

Doku iskelelerinin ısısal karakteristik özelliklerinin belirlenmesi ve HAp/B-HAp kaplamasının, Sf sponjin doku iskelesinin termal özelliklerindeki etkisinin araştırılması amacıyla termogravimetrik analiz gerçekleştirilmiştir. Analiz kapsamında örnekler, azot atmosferinde 25°C'den 700°C'ye kadar 10°C/dk ısıtma hızıyla ısıtılmıştır. Sf, Sf/HAp ve Sf/B-HAp doku iskelelerinin TGA sonuçları karşılaştırmalı olarak **Şekil 4.8**'de verilmiştir. Elde edilen termogramlardan örneklere ait kütle kayıpları ve ısısal özellikler tespit edilmiştir.



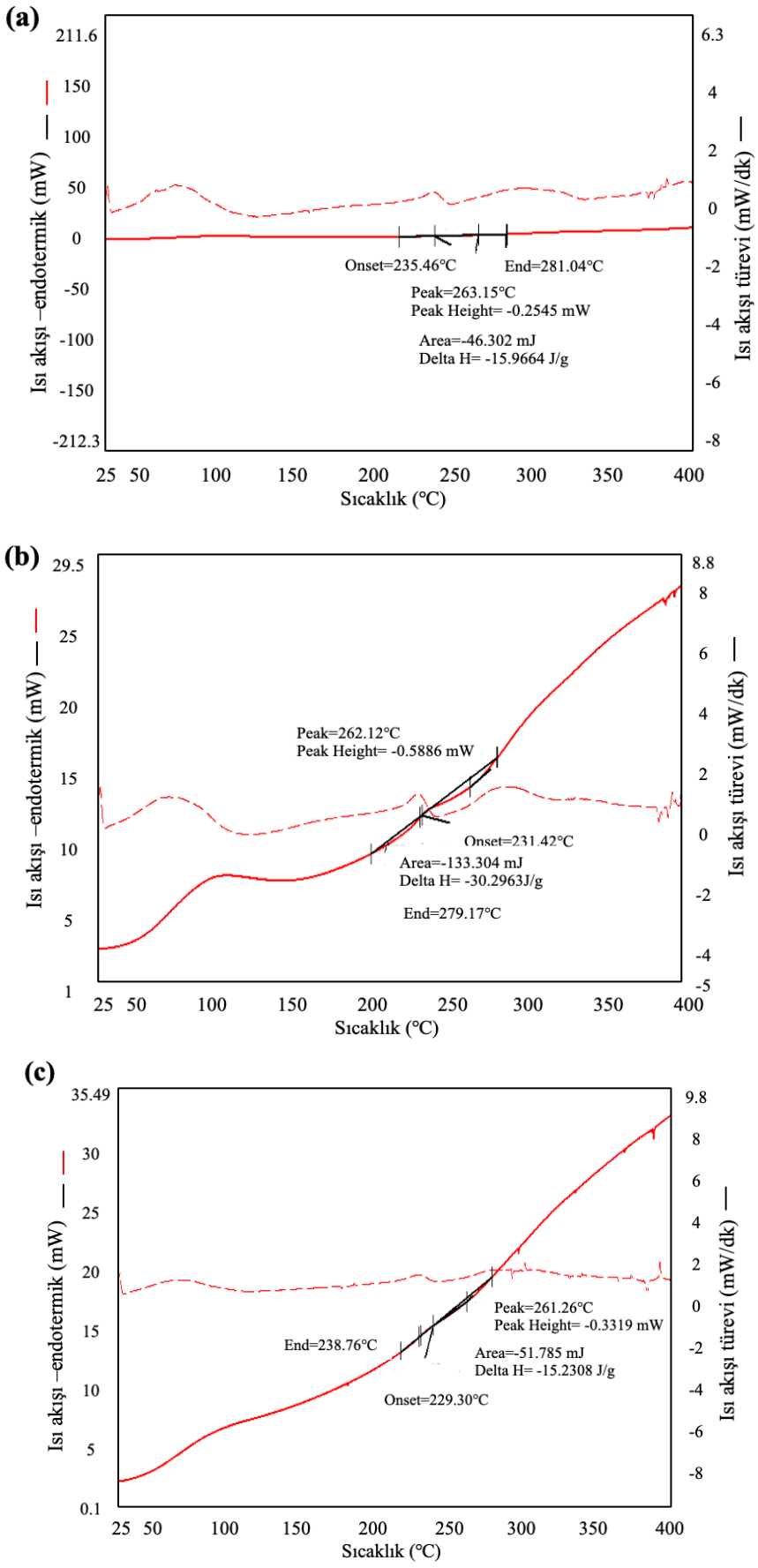
Şekil 4.8. Sf, Sf/HAp ve Sf/B-HAp doku iskelelerine ait TGA termogramları.

TGA sonuçları incelendiğinde, Sf, Sf/HAp ve Sf/B-HAp grubu sponjin doku iskelelerin iki basamaklı bir süreçle bozunduğu gözlemlenmiştir. Her üç doku iskelesi için de ilk kütle kaybı, 80-150°C aralığında gerçekleşmekte olup yaklaşık %10-12 oranındadır. Bu kayıp, sponjin iskelelere fiziksel olarak adsorbe olmuş ya da hidrojen bağlarıyla tutunmuş suyun uzaklaşmasından kaynaklanmaktadır. Bu aşamada çoğunlukla yapıda bulunan zayıf hidrojen bağları kopmaktadır. İkinci aşamada ise üç iskele grubu için de 200-420°C sıcaklık aralığında yaklaşık %60-65 oranında bir kütle kaybı meydana gelmekte olup bu süreç, sponjin proteinlerinin termal bozunmasına karşılık gelmektedir. Bu aşamada, başta karboksil grubu ve amin grubu arasında oluşan peptit bağları (-CO-NH-) olmak üzere, disülfit bağları (-S-S-) ve kalan hidrojen bağlarının termal olarak parçalanmaktadır. Bu bağların kırılması, protein iskeletinin yapısal bütünlüğünün bozulmasına ve hızlı kütle kaybına neden olur. Termal bozunma sonunda, 700 °C'de sistemde kalan artık miktarı Sf iskelelerinde ~%25, Sf/HAp iskelelerinde ~%33 ve Sf/B-HAp iskelelerinde ~%25 olarak tespit edilmiştir. TGA analizleri, HAp ve B-HAp ilavesinin Sf sponjin iskelelerin termal bozunma davranışında anlamlı bir değişikliğe yol açmadığını göstermiştir. Bu durum, ilave edilen inorganik fazların miktarının düşük olması nedeniyle ısıl stabiliteye katkısının sınırlı kalmasıyla açıklanabilir [237].

4.3.4. Diferansiyel Taramalı Kalorimetre (DSC) Analizi

Sf, Sf/HAp ve Sf/B-HAp doku iskelelerinin termal özellikleri, TGA analizine ek olarak DSC analiziyle de değerlendirilmiştir. Azot atmosferinde ve 10 °C/dk ısıtma hızıyla, iskeleler 0-400 °C sıcaklık aralığında ısıtılarak analiz gerçekleştirilmiştir. DSC analizine ait termogramlar **Şekil 4.9**'da sunulmuştur.

Sf, Sf/HAp ve Sf/B-HAp iskele gruplarına ait DSC termogramlarında (**Şekil 4.9**), yaklaşık 55-60 °C aralığında karakteristik bir endotermik geçiş belirlenmiştir. Bu pik, sponjin yapısında bulunan tip I kolajen gibi fibröz protein yapılarına karşılık gelmekte olup, literatürde bildirilen kolajenin üçlü heliks yapısının bozulmaya başladığı ve hidrojen bağlarının çözülmeye başladığı sıcaklık aralığı ile uyumludur [238].



Şekil 4.9. DSC termogramları; a) Sf, b) Sf/HAp ve c) Sf/B-HAp doku iskeleleri.

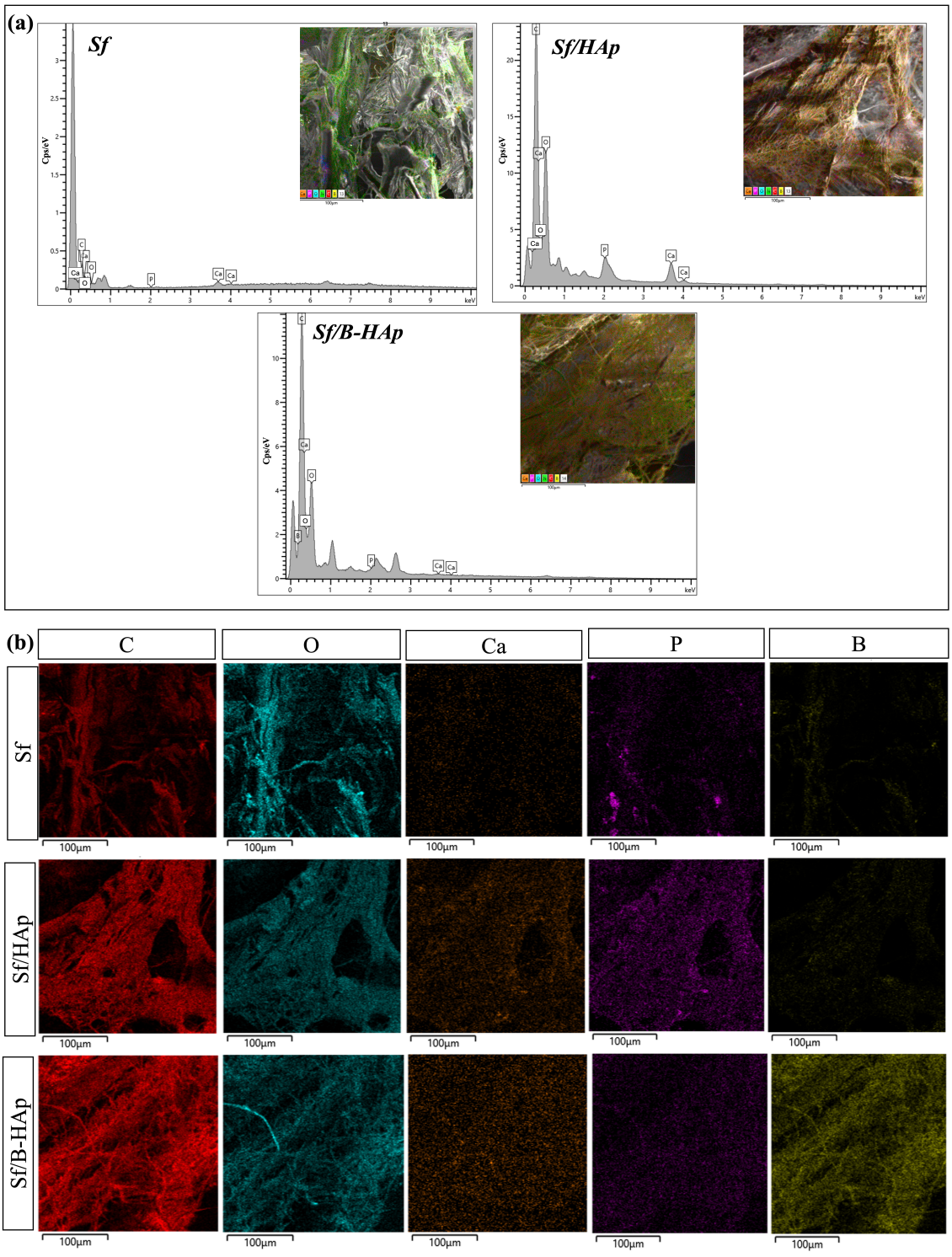
Şekil 4.9'da her üç iskele grubunda da ~230°C'de, amorf yapıların ve protein bölgelerinin erimesine karşılık gelen belirgin bir endotermik erime piki tespit edilmiştir. Buna ek olarak, 250-300 °C aralığında geniş bir termal bozunma piki gözlemlenmiştir. Termal bozunmanın gerçekleştiği maksimum sıcaklıklar sırasıyla Sf grubunda ~263 °C, Sf/HAp grubunda ~262 °C, Sf/B-HAp grubunda ise ~261 °C olarak belirlenmiştir. Bu sıcaklık aralığında özellikle peptit bağları (-CO-NH-) ile disülfit bağları (-S-S-) parçalanmaktadır.

Elde edilen termal analiz verilerine göre HAp ve B-HAp kaplamalarının, sponjin bazlı iskelelerin ısıl karakteristikleri (erime sıcaklığı-T_m ve bozunma sıcaklığı-T_d) üzerinde anlamlı bir etkisinin olmadığı görülmektedir.

4.3.5. Elementel Analiz

Sf, Sf/HAp ve Sf/B-HAp sponjin doku iskelelerinin elementel bileşimi, EDX analizi ile tayin edilmiştir. Örnek yüzeyinin farklı bölgelerinden yapılan rastgele taramalar sonucu elde edilen EDX spektrumları ve elementel dağılımlar, **Şekil 4.10**'da kalitatif olarak, **Çizelge 4.2**'de ise ağırlıkça yüzde (% k/k) cinsinden sunulmuştur.

EDX analizi sonuçlarına göre, tüm gruplarda iskelelerin organik yapısına bağlı olarak karbon ve oksijen elementleri tespit edilmiştir. Bu durum, sponjin iskeletlerinin doğal protein bazlı yapısını koruduğunu doğrulamaktadır (**Şekil 4.10**). Karbon elementi ağırlıkça, Sf grubunda ~%62, Sf/HAp grubunda ~%47 ve Sf/B-HAp grubunda ~%43 olarak belirlenmiştir. Oksijen oranı ise Sf grubunda ~%30, Sf/HAp grubunda ~%32 ve Sf/B-HAp grubunda ~%30 olarak tespit edilmiştir (**Çizelge 4.2**).



Şekil 4.10. Doku iskelelerinin EDX haritalama yöntemiyle belirlenen (a) EDX spektrumları (b) elementel içerikleri.

Çizelge.4.2. Doku iskelelerinin elementel bileşimi (ağırlıkça).

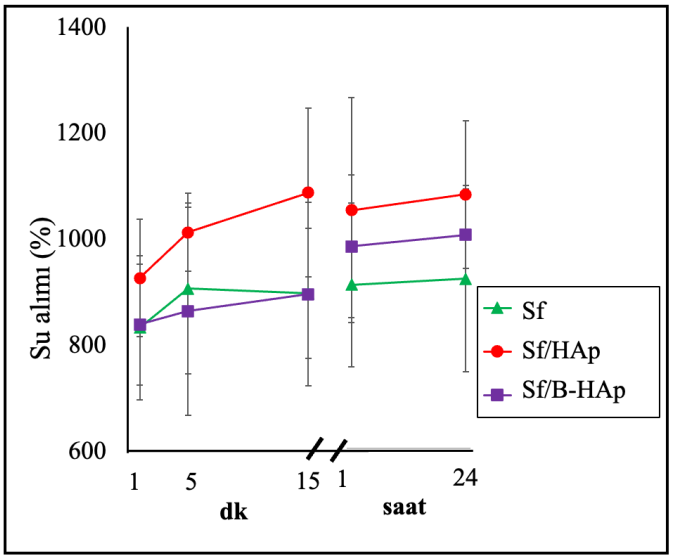
Doku iskelesi	Ağırlıkça yüzde (%)				
	C	O	Ca	P	B
Sf	61,7 ± 4,1	29,6 ± 2,4	1,1 ± 0,2	0,4 ± 0,1	0,0 ± 0,0
Sf/HAp	47,0 ± 6,0	31,9 ± 1,1	6,8 ± 2,6	2,3 ± 1,7	0,0 ± 0,0
Sf/B-HAp	44,3 ± 3,4	29,7 ± 3,1	5,5 ± 2,3	1,9 ± 0,5	6,4 ± 1,3

Apatit kaplaması yapılan Sf/HAp ve Sf/B-HAp örneklerinde yüksek düzeyde kalsiyum ve fosfor elementleri tespit edilmiştir. Sf/HAp grubunda kalsiyum oranı %6,8 ve fosfor oranı %2,3 olarak ölçülürken, Sf/B-HAp grubunda kalsiyum oranı %5,5 ve fosfor oranı %1,9 olarak belirlenmiştir. Ayrıca, yalnızca Sf/B-HAp grubunda B-HAp kaplamasına özgü olarak bor elementinin varlığı saptanmış ve oranı yaklaşık %6,5 olarak ölçülmüştür. Sf/HAp grubunda %6,8 ± 2,6 olarak ölçülen kalsiyum oranının Sf/B-HAp grubunda %5,5 ± 2,3'e düşmesi, B^{3+} iyonlarının Ca^{2+} iyonlarının yerini almasıyla açıklanabilir. Benzer şekilde, Sf/HAp grubunda %2,3 ± 1,7 olarak ölçülen fosfor oranının Sf/B-HAp grubunda %1,9 ± 0,5'e gerilemesi, BO_3^{3-} iyonlarının PO_4^{3-} iyonlarının yerini aldığını göstermektedir [27]. Bu bulgular, mineral fazın iskelelerde başarıyla oluşturulduğunu ve kaplı iskelelerin osteojenik potansiyel ile biyolojik performans açısından kemik doku mühendisliği uygulamaları için uygun özellikler taşıdığını desteklemektedir.

4.3.6. Şişme Analizi

Su alım ölçümleri, üç boyutlu sponjin bazlı iskelelerin PBS ortamında 7 gün süreyle inkübe edilmesiyle gerçekleştirilmiştir. İskelelerin farklı zamanlardaki su alım oranları ile denge su içeriği (%) değerleri **Şekil 4.11** ve **Çizelge 4.3**'te sunulmuştur.

Doku iskelelerine ait su alım yüzdeleri incelendiğinde, sponjin bazlı iskelelerin yüksek su tutma kapasitesine sahip olduğu görülmüştür. İskelelerin yüksek gözenekliliği ve yapısal esnekliği, kısa sürede büyük miktarda suyu yapılarına almalarına olanak tanımıştır. **Şekil 4.11**'de görüldüğü üzere, sponjin bazlı iskelelerin su alım oranlarında HAp ve B-HAp kaplaması sonrasında artış meydana gelmiştir.



Şekil 4.11. Doku iskelelerinin su alım kapasitesinin zamanla değişimi.

Doku iskelesi üretiminde yalnızca sponjin iskeletinin kullanılması, yeterli mekanik dayanımın sağlanamamasına ve gözeneklerin çökmesine neden olabilmektedir. Ancak HAp ve B-HAp kaplama ile oluşturulan kompozit yapılar, iskelelerin mekanik dayanımını artırmakta ve gözenek yapısının korunmasına katkı sağlamaktadır. Gözeneklerin birbirine bağlı şekilde korunması, kapiler etki ile daha hızlı su emilimini mümkün kılmakta; ayrıca açık gözenekli yapı, besin ve atıkların difüzyonunu destekleyerek doku mühendisliği uygulamaları için önemli avantajlar sunmaktadır.

Çizelge 4.3 Doku iskelelerinin su alım yüzdeleri.

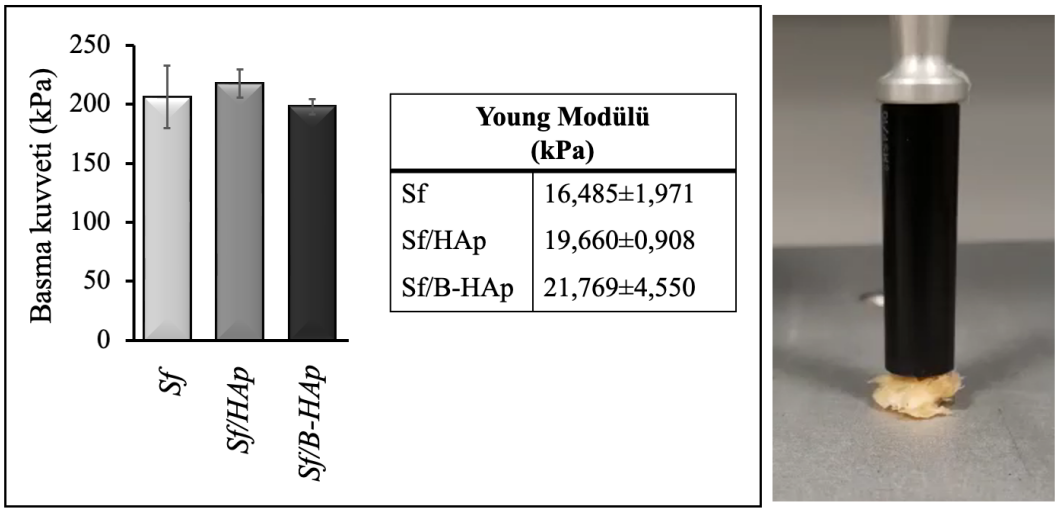
Doku iskelesi	**Su alımı (%)**			
	1.dk	**15.dk**	**1.gün**	**7.gün**
Sf	815,4 ± 114,1	906,4 ± 77,4	909,6 ± 91,9	920,9 ± 158,5
Sf/HAp	821,9 ± 82,4	1003,7 ± 72,7	1025,3 ± 47,7	1153,8 ± 186,3
Sf/B-HAp	929,3 ± 88,1	888,3 ± 61,8	986,5 ± 158,9	1056,7 ± 179,1

Çizelge 4.3'te iskelelerin zamana bağlı su alım yüzdeleri sunulmuş olup, denge su alım yüzdeleri Sf, Sf/HAp ve Sf/B-HAp iskeleleri için sırasıyla ~ 920, 1150 ve 1050 olarak belirlenmiştir. Elde edilen bu verilerden, HAp kaplamanın sponjin iskelelerin su tutma kapasitesini artırdığı görülmektedir. Bu artış, HAp'ın hidrofilitesi nedeniyle suyun iskele yapısına daha kolay nüfuz etmesiyle ilişkilidir. Öte yandan, B-HAp kaplaması ile elde

edilen su alım yüzdesi, HAp kaplı duruma göre bir miktar azalmış olsa da, kaplama yapılmamış iskelelere kıyasla daha yüksek kalmıştır. Bu durum, B-HAp kaplamasının daha yoğun ve homojen bir yapı oluşturması ve buna bağlı olarak gözenekleri kısmen kapatarak su emilimini sınırlaması ile açıklanabilir [27].

4.3.7. Mekanik Analizler

Doku iskelelerinin mekanik dayanımları sıkıştırma testi ile değerlendirilmiştir. Çapı 9 mm ve yüksekliği 2 mm olan silindirik örnekler, test öncesinde 1 sa süresince PBS (pH 7,4, 37°C) içinde bekletilmiştir. Sıkıştırma testleri 50 N'luk yük altında gerçekleştirilmiş; analiz sonucunda örneklerin sıkıştırma dayanımları (kPa) ve young modülü değerleri (kPa) hesaplanmıştır (**Şekil 4.12**).



Young Modülü (kPa)	
Sf	16,485±1,971
Sf/HAp	19,660±0,908
Sf/B-HAp	21,769±4,550

Şekil 4.12. Doku iskelelerine ait mekanik analiz sonuçları.

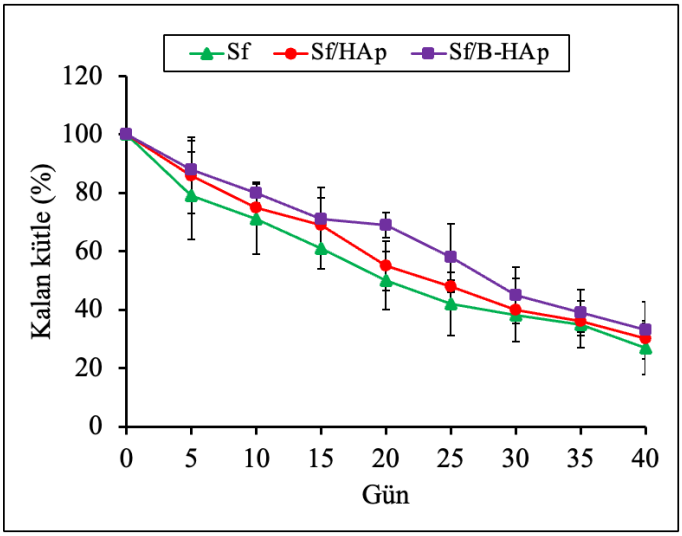
Kemik doku mühendisliğinde iskele seçiminde, iskelelerin mekanik dayanımı en önemli kriterlerdendir. Polimer bazlı iskeleler genellikle yeterli mekanik dayanımı sağlayamadıklarından, kemik doku mühendisliği çalışmalarında genellikle polimer/seramik kompozit iskeleler tercih edilmektedir. Deniz süngerleri sıkıştırma ve çekme durumlarında hem rijitlik hem de esneklik gösterebilmekte olup, bu özellikleriyle polimer/seramik kompozitlere benzer bir performans sergilemektedir [91]. Aluma'nın (2011) [92] gerçekleştirdiği çalışmada, deniz süngerlerinin mekanik özellikleri ve fonksiyonel yapıları incelenmiş; iskeletin yapısal bileşenlerinin bu özelliklerin korunmasında belirleyici olduğu ortaya konulmuştur. Bununla birlikte, farklı deniz

süngeri türlerinin fonksiyonel ve yapısal özelliklerinde değişkenlik gösterdiği ve kemik dokuya en yakın özellikte sünger temelli doku iskelelerinin geliştirilmesi için daha kapsamlı araştırmalara gerek olduğu ifade edilmektedir.

Literatürde, süngerimsi (kansellöz) kemik için basma dayanımı 2-12 MPa, omurga kemiği için 24-43 MPa ve femur kemiği için 48-80 MPa arasında bildirilmiştir [239]. Cunniffe ve ark. (2010) [240], nano hidroksiapatit partikülleri ekleyerek kolajen iskelelerinin mekanik dayanımını 18 kat artırmışlardır (başlangıç değeri: 0,30 ± 0,09 kPa; son değer: 5,50 ± 1,70 kPa). Thein-Han ve Misra (2009) [241], kompresif modülleri sırasıyla 6,0 ± 0,3 kPa ve 9,2 ± 0,2 kPa olan kitosan ve kitosan/nano HAp kompozit iskeleleri üretmişlerdir. Tez çalışmasında, hazırlanan Sf, Sf/HAp ve Sf/B-HAp sponjin doku iskelelerinin basma dayanımı ve Young modülü değerleri ile standart sapmaları **Şekil 4.12**'de sunulmuştur. Sf grubu iskelenin Young modülü 16,49 ± 1,97 kPa; basma dayanımı ise 206,33 ± 26,27 kPa olarak ölçülmüştür. Sf/HAp ve Sf/B-HAp grubu iskelelerin Young modülü sırasıyla 19,66 ± 0,91 kPa ve 21,77 ± 4,55 kPa; basma dayanımı ise sırasıyla 217,67 ± 12,10 kPa ve 198,00 ± 6,56 kPa olarak belirlenmiştir. Yapılan basma testleri, literatürde bildirilen sonuçlarla uyumlu bulunmuş; iskele yapısına HAp ve B-HAp eklenmesinin mekanik dayanımını artırdığı görülmüştür. Elde edilen biyohibrit yapılar her ne kadar doğal kemiğin mekanik dayanımına ulaşmamış olsa da, sponjin bazlı iskelenin kullanımına kıyasla kaplanan iskeleler mekanik açıdan daha avantajlı bulunmuştur. Çalışma kapsamında üretilen iskeleler, mekanik yük taşıma kapasitesi sağlamak yerine hücre proliferasyonunu, doku infiltrasyonunu ve biyolojik entegrasyonu desteklemek amacıyla geçici yapılar olarak tasarlanmıştır. Bu tür iskelelerin tasarımında, yapısal dayanımdan ziyade yüksek gözeneklilik, biyobozunurluk ve osteokonduktivite gibi özellikler öncelik taşımaktadır. Rejenerasyon süreci ilerledikçe, hücreler tarafından salgılanan hücre dışı matriksin (ECM) zamanla iskelenin yerini alması ve böylece mekanik bütünlüğün zamanla doğal olarak artması beklenmektedir. Bu bağlamda, başlangıçta yüksek mekanik dayanım gerektirmeyen uygulamalarda - örneğin kraniyal defekt onarımı gibi düşük yük taşıyan klinik alanlarda - bu tip biyobozunur ve osteokonduktif iskelelerin oldukça uygun bir seçenek olduğu öngörülmektedir.

4.3.8. *İn Vitro* Biyobozunurluk

Sf, Sf/HAp ve Sf/B-HAp iskelelerinin lizozim içeren PBS ortamında 40 gün boyunca gösterdiği bozunma profilleri **Şekil 4.13**'te sunulmaktadır. Ölçümler, belirli zaman aralıklarında iskelelerin kalan kütle (%) değerlerinin belirlenmesi ile gerçekleştirilmiştir.



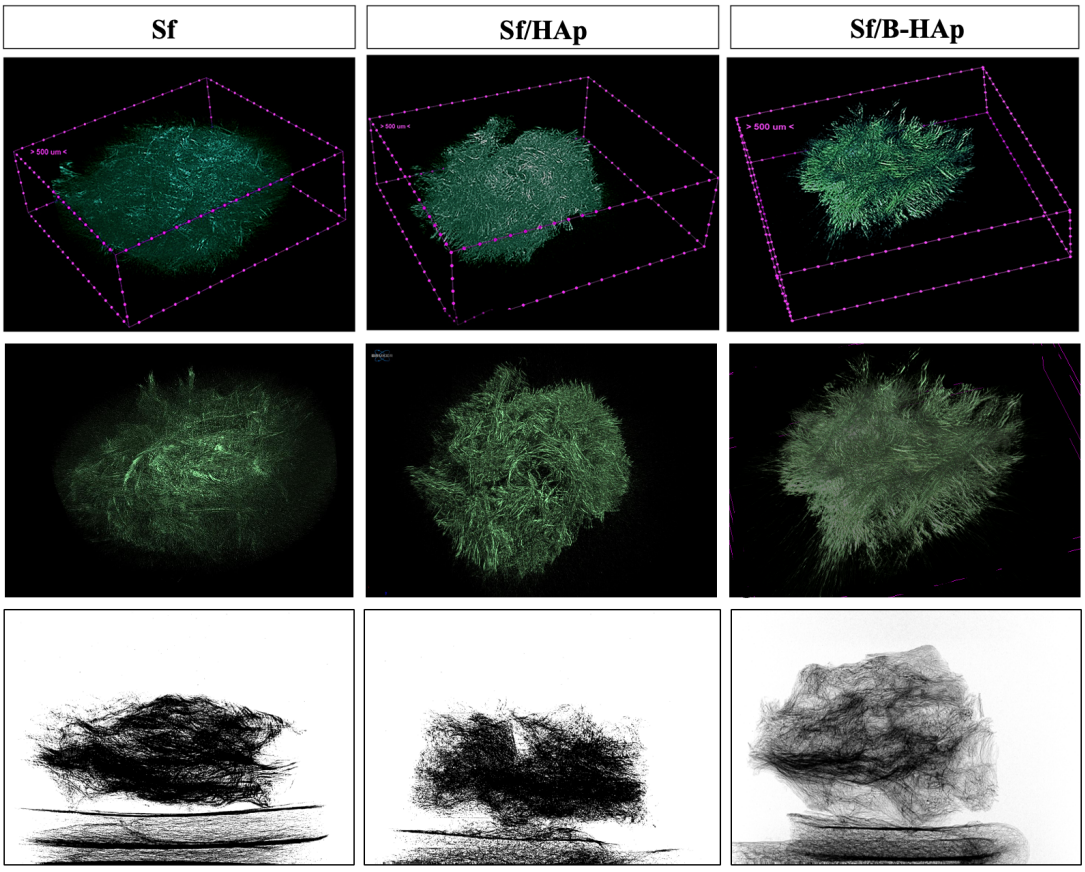
Şekil 4.13. Doku iskelelerinin lizozim içeren PBS ortamındaki bozunma profilleri.

Şekil 4.13 incelendiğinde, genel eğilim olarak, tüm gruplarda zamanla kalan kütlede istatistiksel olarak anlamlı bir azalma gözlemlenmiştir. Bu durum, lizozim varlığında iskelelerin enzimatik bozunmaya uğradığını göstermektedir. Sf grubu iskeleler en hızlı bozunma gösteren yapı olmuştur. Kırkıncı gün sonunda Sf iskelelerinin ortalama %30'unun kaldığı, yani %70 civarında bir kütle kaybı yaşadığı görülmektedir. Bu sonuç, sponjin yapısının lizozim tarafından sindirilebildiğini ve doğal bir protein temelli malzeme olarak biyobozunur özellik taşıdığını doğrulamaktadır. Sf/HAp iskeleleri, Sf sponjin iskelelerine göre daha yavaş bir bozunma profili göstermiştir. Bu durum, HAp kaplamasının iskele yüzeyinde koruyucu bir bariyer görevi görerek lizozim etkisini sınırlaması ile ilişkilendirilmiştir. Sf/B-HAp grubu iskeleler, özellikle ilk 20 gün boyunca diğer gruplara göre daha yüksek kalan kütle yüzdesi ile daha yavaş bozunma sergilemiştir. Bu durum, B-HAp kaplamasının hem fiziksel hem de kimyasal olarak yapıya daha yoğun ve stabil bir kaplama sağlamasıyla açıklanabilir [242]. B-HAp, daha küçük ve yoğun kristallerden oluştuğu için gözenekleri daha iyi kapatabilir ve enzim difüzyonunu azaltabilir. Kırkıncı gün sonunda tüm grupların kalan kütleleri birbirine yakınlaşmış olsa

da, başlangıçtaki farklar kaplama tiplerinin bozunma sürecine etkisini açıkça ortaya koymaktadır.

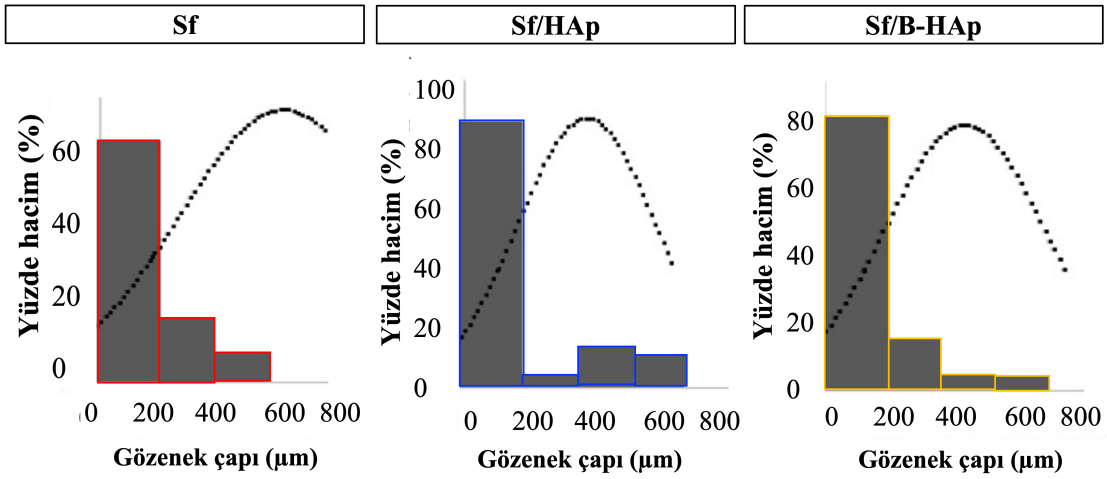
4.3.9. Mikro-Bilgisayarlı Tomografi (Mikro-CT) Analizi

Mikro-CT görüntüleme yöntemi kullanılarak iskelelerin üç boyutlu morfolojik yapısı detaylı olarak incelenmiştir. Gözenekli yapıların gözeneklilik düzeyi ve bağlantılılık durumu **Şekil 4.14**'de, gözenek çaplarının dağılımı ve diğer temel yapısal özellikler ise sırasıyla **Şekil 4.15** ve **Çizelge 4.4**'te sunulmuştur.



Şekil 4.14. Mikro-CT tarama ile görüntülenen doku iskelelerinin üç boyutlu morfolojik yapıları.

Şekil 4.14'te görüldüğü üzere, deniz süngerleri, hücre infiltrasyonuna imkan tanıyan birbirine bağlı gözenekli yapılara sahiptir. Bu özgün mimari, ideal bir kemik doku iskelesinin yapısal özelliklerini taklit etmektedir. Sünger iskeletinin sahip olduğu gözeneklilik profili, hücrelerin yapıya tutunması için geniş bir yüzey alanı sağlarken, aynı zamanda hücresel göçü desteklemektedir.



Şekil 4.15. Sf, Sf/HAp ve Sf/B-HAp doku iskelelerinin gözenek çaplarının dağılımı.

Çizelge 4.4. Sf, Sf/HAp ve Sf/B-HAp doku iskelelerinin gözenek profili ve ortalama gözenek çapı.

Doku iskelesi	Kapalı gözenek (%)	Açık gözenek (%)	Toplam gözenek (%)	Ortalama gözenek çapı (µm)
Sf	0,025	86,02	86,04	347,89 ± 157,8
Sf/HAp	0,010	71,36	71,37	248,00 ± 102,2
Sf/B-HAp	0,013	76,80	76,81	262,02 ± 124,2

Yapılan analizler sonucunda, kaplanmamış sponjin bazlı iskelelerin (Sf) ortalama gözenek çapı 350 µm olarak ölçülmüştür. HAp kaplaması uygulanan Sf/HAp iskelelerde gözenek çapı 240 µm'ye, B-HAp kaplı iskelelerde ise 260 µm'ye düşmüştür (**Çizelge 4.4**). Bu azalma, hidroksiapatit partiküllerinin iskele yüzeyine ve gözenek duvarlarına tutunarak gözenek açıklıklarını kısmen daraltmasından kaynaklanmaktadır. HAp ve B-HAp kaplamalarının oluşturduğu mineral faz, iskelelerin yüzey pürüzlülüğünü artırırken, gözeneklerin bir kısmının kapanmasına neden olmuştur. Ancak bu düşüş, hücresel infiltrasyon, besin taşınımı ve damar oluşumu gibi biyolojik süreçleri olumsuz etkilemeyecek düzeydedir. Literatürde kemik doku mühendisliği için 100-400 µm aralığındaki gözenek boyutlarının ideal olduğu bildirilmekte olup [243] elde edilen sonuçlar kaplama işlemlerinin iskelelerin hem mekanik dayanımını artırdığını hem de biyolojik uygunluklarını koruduğunu göstermektedir.

Gözenek boyutu ve gözeneklilik değerleri incelendiğinde (**Çizelge 4.4**), en yüksek gözeneklilik oranının (%86,04) Sf grubundaki sponjin bazlı doku iskelelerinde olduğu

belirlenmiştir. Sf/HAp ve Sf/B-HAp iskelelerinin gözeneklilik oranları ise sırasıyla yaklaşık %71,37 ve %76,81 olarak hesaplanmıştır. Yapılan kaplamalar, Sf iskelelerin genel gözeneklilik değerinde anlamlı bir değişime neden olmamıştır. Bununla birlikte, kaplamalı gruplar karşılaştırıldığında, Sf/B-HAp iskelelerinin gözenekliliğinin Sf/HAp iskelelerine göre daha yüksek olduğu gözlemlenmiştir. Bu fark, B-HAp kaplamasının daha küçük boyutlu apatitleşmiş kristaller oluşturması sonucu, gözeneklerin daha az kapanmasıyla ilişkilendirilmiştir. Genel olarak değerlendirildiğinde, %70 ve üzeri gözenekliliğe sahip iskelelerin hücre penetrasyonunu desteklediği, besin ve metabolit taşınımını kolaylaştırdığı ve bu özellikleriyle doku mühendisliği uygulamaları için uygun birer aday olduğu ortaya konulmuştur [4, 244].

Barros (2014) tarafından gerçekleştirilen çalışmada [88], *Petrosia ficiformis* süngerleri mikro-CT yöntemiyle analiz edilerek gözeneklilik özellikleri araştırılmıştır. Yapılan analiz sonucunda, süngerlerin %73 gözeneklilik oranına ve 364 µm ortalama gözenek çapına sahip olduğu tespit edilmiştir. Ayrıca, organik bileşenlerin uzaklaştırılmasının ardından, gözeneklilik ve gözenek boyutlarında artış gözlemlenmiştir. Benzer şekilde Cunningham (2010) [89], *Spongia agaricina* kaynaklı seramik iskeleleri inceleyerek gözeneklilik oranını %59, ortalama gözenek boyutunu ise 349 µm olarak hesaplamıştır. Ayrıca, bu iskelelerde %99,92 oranında bir içsel bağlantılılık tespit edilmiştir. Sunulan tez çalışmasında elde ettiğimiz gözeneklilik ve gözenek boyutu verilerinin, literatürde bildirilen bu sonuçlarla uyumlu olduğu görülmüştür. Bu durum, kullanılan sünger bazlı iskelelerin doğal yapılarının kemik doku mühendisliği için uygun olabileceğini desteklemektedir.

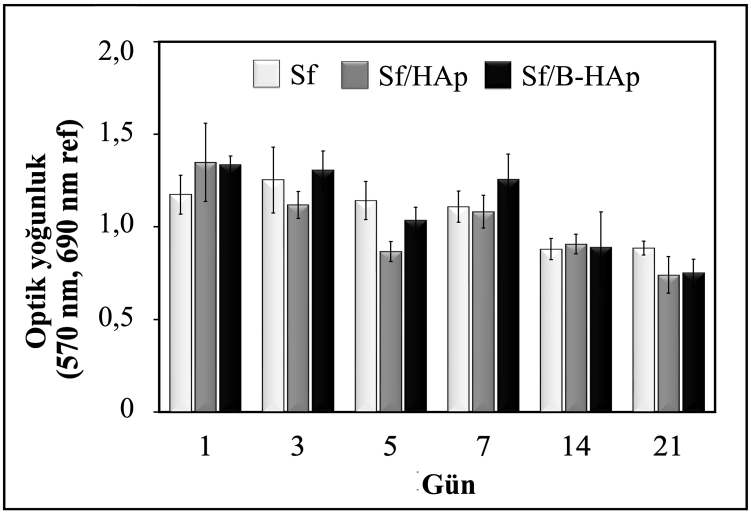
4.4. *İn Vitro* Hücre Kültür Çalışmaları

4.4.1. MC3T3-E1 Hücreleri ile Yürütülen Osteojenik Farklılaşma Çalışmaları

Hidroksiapatit ve bor katkılı HAp kaplı sponjin bazlı biyohibrit iskelelerin hücre canlılığı ve osteojenik farklılaşma üzerindeki etkilerini incelemek için, 21 günlük hücre kültürü deneyleri ve farklılaşma analizleri gerçekleştirilmiştir.

4.4.1.1. MTT Analizi

Sf, Sf/HAp ve Sf/B-HAp sponjin bazlı iskeleler üzerinde kültüre edilen MC3T3-E1 hücrelerinin proliferasyonu, MTT analizi kullanılarak değerlendirilmiş ve elde edilen sonuçlar **Şekil 4.16**'da sunulmuştur.

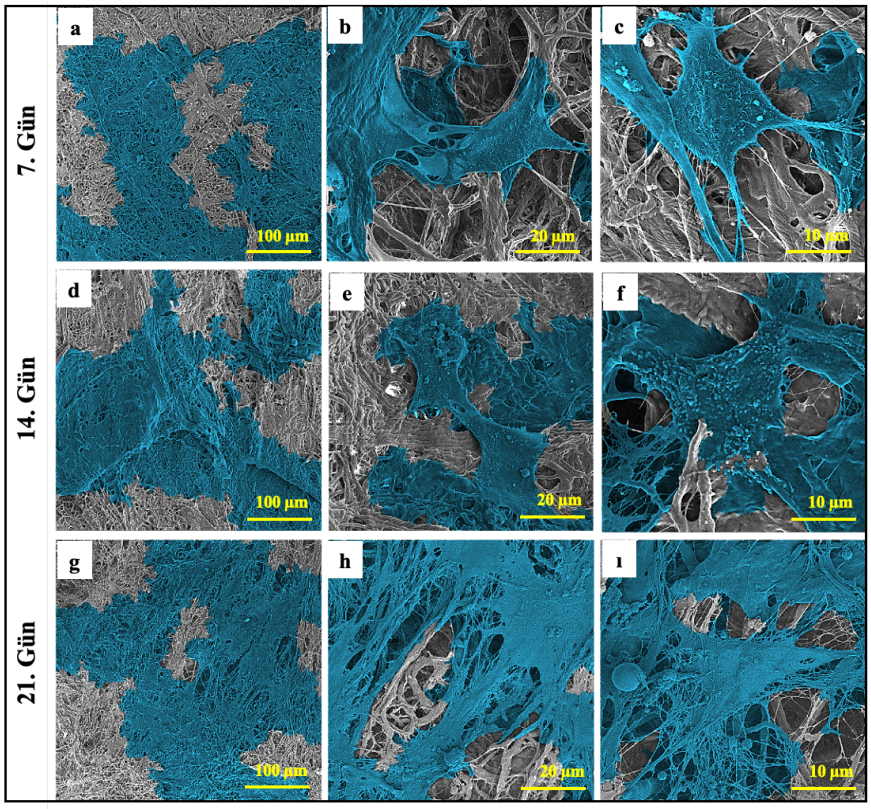


Şekil 4.16. Doku iskeleleri üzerinde çoğalan MC3T3-E1 hücrelerinin mitokondriyal aktiviteleri.

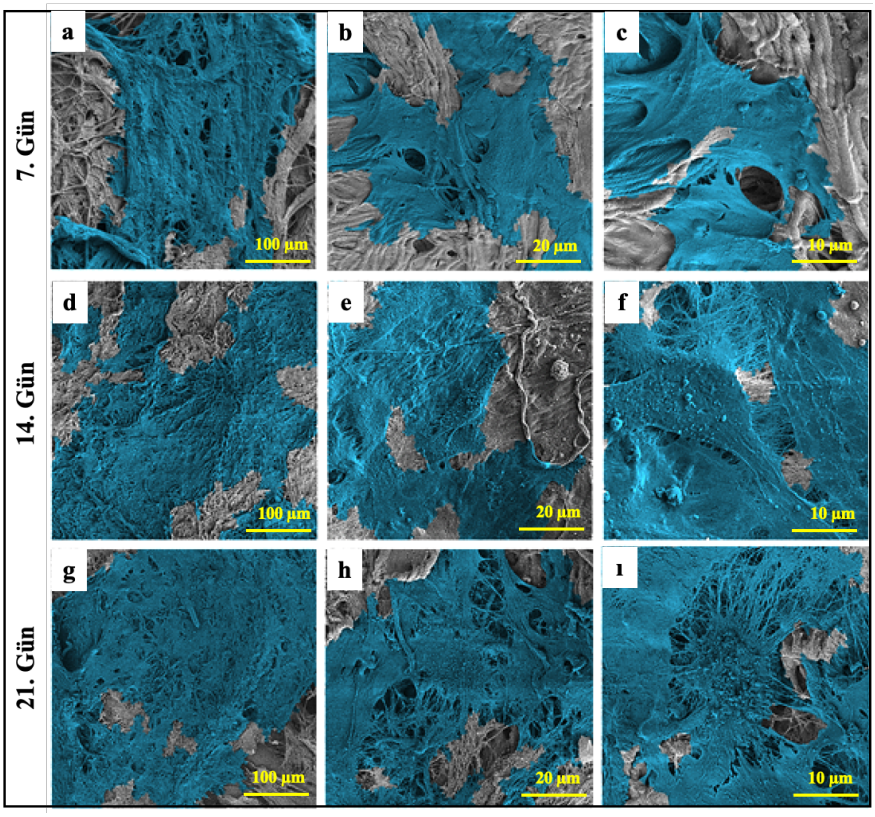
Şekil 4.16'da sunulan optik yoğunluk değerleri incelendiğinde, 21 günlük kültür süresi boyunca hücrelerin mitokondriyal aktivitelerinin genel olarak yüksek seviyede devam ettiği, ancak bu süreçte anlamlı bir değişim göstermediği belirlenmiştir. Kültür süresinin tüm günlerinde gruplar arasında MTT değerlerinde istatistiksel olarak anlamlı bir fark bulunmamıştır ($p>0,05$). Bununla birlikte, 21. gün sonunda tüm gruplarda absorbans değerlerinin minimum seviyeye indiği gözlemlenmiştir. Aynı gün içinde farklı iskelelerde kültüre edilen hücreler arasında da anlamlı bir fark tespit edilmemiştir. Bu durum, iskele başına yüksek sayıda MC3T3-E1 hücresi ($1x10^6$ hücre/iskele) kullanılması nedeniyle hücrelerin yoğunluğa bağlı proliferasyon sınırına ulaşmış olmasından kaynaklanabileceği gibi, hücrelerin proliferatif fazdan farklılaşma sürecine geçiş yapmalarıyla da ilişkilendirilebilir. Literatürde, osteojenik farklılaşma sürecinde hücrelerin proliferasyon hızında azalma olduğu ve metabolik aktivitelerinin stabilize olduğu bilinmektedir [245]. Bu nedenle, tez çalışması kapsamında elde edilen bu sonuçlar hücrelerin farklılaşma eğilimine girdiğini işaret etmektedir.

4.4.1.2. SEM Analizi

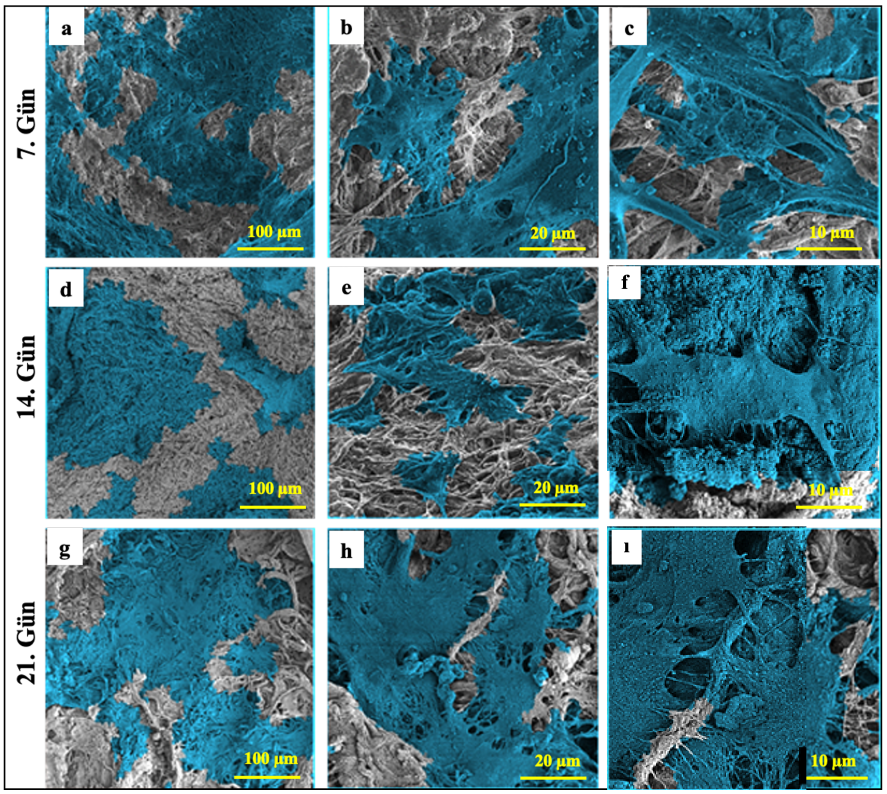
MC3T3-E1 hücrelerinin morfolojisi ile hücreler ve iskeleler arasındaki etkileşimler, belirlenen kültür günlerinde gerçekleştirilen SEM analizleri ile değerlendirilmiştir. Sf grubu iskelelerde çoğalan hücrelerin kültürün 7., 14. ve 21. günlerinde farklı büyütmelerdeki yatay kesit SEM görüntüleri **Şekil 4.17**'de, Sf/HAp ve Sf/B-HAp iskelelerine ait görüntüler ise sırasıyla **Şekil 4.18** ve **Şekil 4.19**'da sunulmuştur. Ayrıca, **Şekil 4.20**'de doku iskelelerinde üreyen hücrelerin kültürün 21. gününe ait dikey kesit SEM görüntüleri yer almaktadır. SEM görüntülerinde iskele üzerinde çoğalan hücreler mavi ile boyanmış olup, elde edilen görüntüler hücrelerin iskele yüzeyine başarılı bir şekilde tutunduğunu ve iskele gözenekleri boyunca yayıldığını göstermiştir.



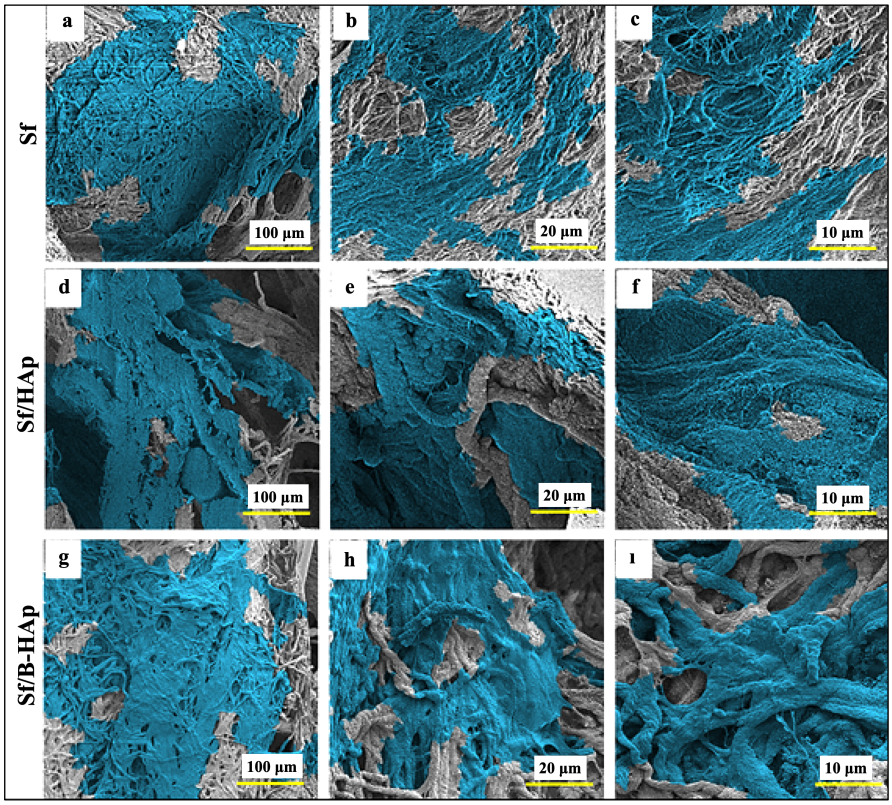
Şekil 4.17. Sf grubu iskelelerde kültüre edilen hücrelerin SEM görüntüleri: a, d, g) 500X; b, e, h) 2 500X; c, f, ı) 5 000X.



Şekil 4.18. Sf/HAp grubu iskelelerde kültüre edilen hücrelerin SEM görüntüleri: a, d, g) 500X; b, e, h) 2 500X; c, f, ı) 5 000X.



Şekil 4.19. Sf/B-HAp grubu iskelelerde kültüre edilen hücrelerin SEM görüntüleri: a, d, g) 500X; b, e, h) 2 500X; c, f, ı) 5 000X.

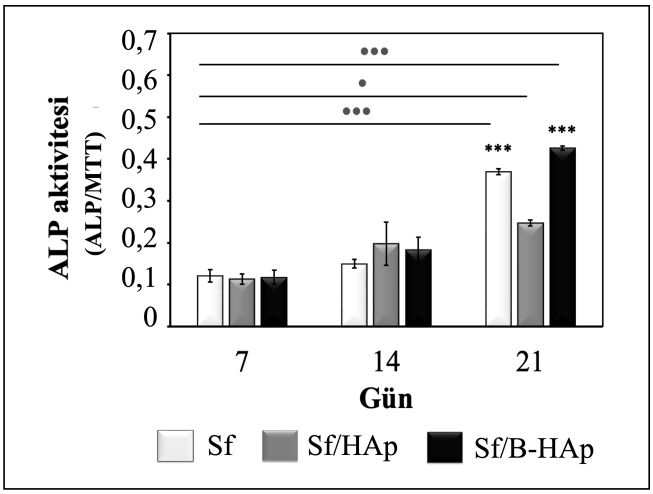


Şekil 4.20. Yirmi bir günlük hücre kültürü sonunda doku iskeleleri üzerinde çoğalan hücrelerin dikey kesit SEM görüntüleri: a, d, g) 500X; b, e, h) 2 500X; c, f, ı) 5 000X.

SEM görüntülerinde de görüldüğü üzere, kültür süresi boyunca hücreler tüm iskele gruplarına başarıyla tutunmuş ve çoğalmıştır. Hücre yoğunluğu zamanla tüm iskelelerde artmış, en yüksek seviyeye ise 21. günde Sf/B-HAp grubunda ulaşılmıştır. Sf iskelelerde ECM oluşumu ilk haftada başlamış olsa da, gözeneklerin hâlâ görünür olması matriks birikiminin sınırlı olduğunu göstermektedir. Buna karşılık, Sf/HAp ve Sf/B-HAp iskelelerinde kültürün erken haftalarında ECM sentezi ve mineralize nodül oluşumu gözlemlenmiş; ancak ikinci haftanın sonunda gözenek-yüzey kaplanması henüz tamamlanmamıştır. Özellikle Sf/B-HAp iskelelerde 21. gün itibarıyla yüzeyin tamamen ECM ile kaplandığı ve gözenek açıklıklarının artık görünmediği tespit edilmiş, bu durum iskelelerin osteojenik aktiviteyi ve hücresel etkileşimi artırdığını göstermiştir. Ayrıca, kültür süresi ilerledikçe hücrelerin yalnızca dış yüzeyde değil, iç gözeneklere doğru da göç ettikleri belirlenmiştir (**Şekil 4.20**). Üç boyutlu iskelelerde hücre infiltrasyonu (göçü), yeni doku oluşumu için temel bir faktör olup, iskelelerin biyolojik işlevselliği açısından büyük önem taşımaktadır [4].

4.4.1.3. ALP Aktivitesinin Tayini

MC3T3-E1 hücreleri kemik öncül hücreler olup, osteojenik farklılaşmaları alkalin fosfataz (ALP) aktivitesi ile değerlendirilmiştir. ALP, kemik matriks mineralizasyonunda görev alan ve fosfat esterlerini hidrolizleyen bir enzimdir [246]. Hücrelerin ALP aktiviteleri, kültürün 7., 14. ve 21. günlerinde pNPP substratının p-nitrofenole dönüşümü ile analiz edilmiş ve sonuçlar **Şekil 4.21**'de sunulmuştur.



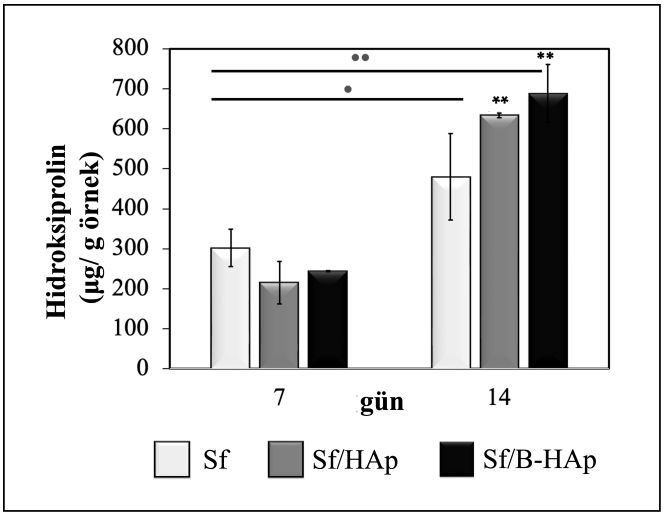
Şekil 4.21. Doku iskelelerinde çoğaltılan hücrelerin ALP aktiviteleri. Enzim aktivitesi, hücre canlılığına göre normalize edilerek ALP/MTT oranı şeklinde ifade edilmiştir. Bu normalizasyon, hücre proliferasyonundaki değişimlerden bağımsız olarak osteojenik farklılaşmanın değerlendirilmesini sağlamaktadır. (İstatistiksel anlamlı farklılıklar n = 3, *$*p<0,05$*, *$**p<0,01$*, *$***p<0,001$* grup bazında 7. gün kontrol grubu iken; •$p<0,05$, ••$p<0,01$, •••$p<0,001$ grup bazında 7. gündeki Sf grubu kontrol grubu iken).

Şekil 4.21'de sunulan verilere göre, 7., 14. ve 21. günlerde hücrelerin ALP seviyeleri açısından gruplar arasında istatistiksel olarak anlamlı bir fark saptanmamıştır ($p > 0,05$). Bununla birlikte, tüm gruplarda ALP aktivitesi zamanla önemli ölçüde artmış ve özellikle Sf/B-HAp grubunda 7. gün seviyesine kıyasla dört kat artış göstermiştir *(*$***p < 0,001$*). Bu artış, hücrelerin osteojenik farklılaşmaya yönelimi açısından önemli bir gösterge olup, B-HAp kaplı iskelelerin osteojenik süreci destekleme potansiyelini önceki çalışmalarla da uyumlu olacak şekilde ortaya koymaktadır [27]. Ayrıca, 21. gün sonunda tüm gruplarda ölçülen ALP aktiviteleri, Sf grubunun 7. gündeki aktivitesine kıyasla istatistiksel olarak anlamlı düzeyde daha yüksek bulunmuştur ($p<0,05$). Bu bulgu, kültür

süresinin ilerlemesiyle birlikte hücrelerin farklılaşma potansiyellerinin arttığını ve zamanla osteoblastik fenotipe geçiş gösterdiklerini desteklemektedir. Genel olarak, elde edilen bulgular Sf iskelelerinin - özellikle de Sf/B-HAp grubunun - osteojenik farklılaşmayı teşvik eden destekleyici bir mikroçevre sunduğunu göstermektedir.

4.4.1.4. Hidroksiprolin Analizi

Tez çalışması kapsamında, doku iskeleleri üzerinde üreyen MC3T3-E1 hücreleri tarafından sentezlenen kolajen miktarı, hidroksiprolin testi kullanılarak belirlenmiştir. Kolajen üretimi hidroksiprolin (Hyp) miktarı üzerinden değerlendirilmiş ve sonuçlar **Şekil 4.22** 'de sunulmuştur.



Şekil 4.22. Doku iskeleleri üzerinde üreyen MC3T3-E1 hücreleri tarafından sentezlenen Hyp miktarı. (İstatistiksel anlamlı farklılıklar n = 3, **p<0,05*, ***p<0,01*, ****p<0,001* grup bazında 7. gün kontrol grubu iken; *•p<0,05*, *••p<0,01*, *•••p<0,001* grup bazında 7. gündeki Sf grubu kontrol grubu iken).

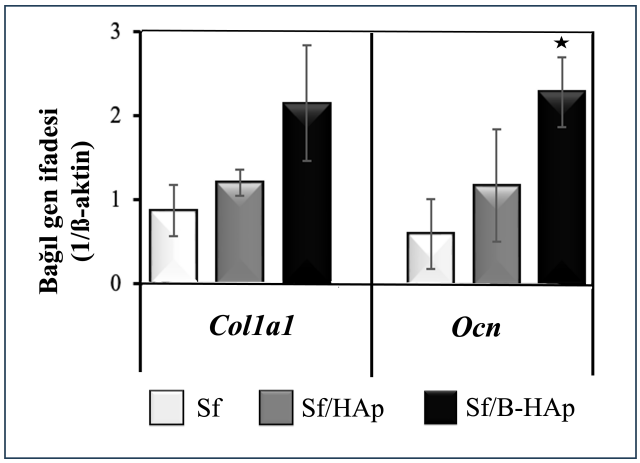
Kolajen, kemik iyileşmesinde en yaygın kullanılan doğal malzemelerden biridir [82]. Sunulan çalışmada, hücresel kolajen üretiminin bir göstergesi olarak iskele kütlesi başına hidroksiprolin (Hyp) miktarı ölçülmüştür. **Şekil 4.22**'de görüldüğü üzere, 7. günde gruplar arasında kolajen içeriği açısından istatistiksel olarak anlamlı bir fark gözlenmemiştir (*p>0,05*). Ancak 14. günde Hyp sentezinde belirgin farklılıklar kaydedilmiş (*p<0,01*); Sf grubunda Hyp miktarı yaklaşık 500 µg/g iken, Sf/HAp ve Sf/B-HAp gruplarında sırasıyla yaklaşık 650 µg/g ve 700 µg/g olarak belirlenmiştir. Bu

bulgular, hem HAp hem de B-HAp kaplamalarının hücrelerin kolajen sentezini etkili bir şekilde desteklediğini göstermektedir. İstatistiksel olarak anlamlı bir fark bulunmamakla birlikte, Sf/B-HAp grubunda Sf/HAp grubuna göre daha yüksek Hyp içeriğinin saptanması, borun kolajen üretimini artırma potansiyelini işaret etmekte ve önceki çalışmalarla da uyumlu bir bulgu sunmaktadır [27, 247].

Deniz süngerleri, özellikle *Demospongiae* sınıfına ait türler, sponjin olarak adlandırılan kolajen benzeri bir protein üretirler. Sponjin, süngerlerin iskelet yapısını oluşturan ve esneklik sağlayan önemli bir bileşendir. Moleküler yapısı tam olarak ortaya konulamamış olsa da, kolajen ve keratin proteinleriyle benzer özellikler gösterdiği bilinmektedir. Deniz süngerlerinden elde edilen kolajenlerin biyomedikal alanda umut vaat ettiği de literatürde belirtilmiştir. Örneğin, *Axinella cannabina* türünden izole edilen kolajenlerin, insan dermal fibroblastlarında kolajen sentezini desteklediği rapor edilmiştir [248]. Ayrıca, literatürde bor katkılı hidroksiapatitin (B-HAp) osteoblast benzeri hücrelerin proliferasyonunu ve farklılaşmasını teşvik ettiği, Wnt/β-katenin sinyal yolunu aktive ederek osteojenik süreçleri ve kolajen sentezini güçlendirdiği vurgulanmıştır [112]. Bu bilgiler ışığında, deniz süngeri ve B-HAp'nin birlikte kullanımı, kemik doku mühendisliği açısından oldukça umut verici bir yaklaşım olarak değerlendirilmektedir. Sponjinin kolajen benzeri doğal yapısı ve B-HAp'nin osteojenik özellikleri, bir araya geldiğinde hücre proliferasyonu, kolajen üretimi ve mineralizasyon süreçlerini sinerjik bir şekilde desteklemekte ve kemik rejenerasyonunu hızlandırmaktadır.

4.4.1.5. Gerçek Zamanlı Polimeraz Zincir Reaksiyonu ile Gen İfadesi Analizi

Osteojenik farklılaşmanın moleküler düzeyde değerlendirilmesi amacıyla, kültürün 21. gününde RT-PCR analizi yapılmıştır. Geç dönem osteojenik farklılaşma, tip I kolajen (*Col1a1*) ve osteokalsin (*Ocn*) gen ekspresyon düzeyleri üzerinden takip edilmiştir ve her bir gen için elde edilen grafikler **Şekil 4.23**'te sunulmuştur.



Şekil 4.23. Doku iskelelerinde çoğalan MC3T3-E1 hücrelerine ait bağıl *Col1a1* ve *Ocn* gen ifadeleri. (İstatistiksel anlamlı farklılıklar n = 3, yıldız vs. Sf: $p<0,05$).

Kolajen Tip I, kemik dokusunun ana yapısal bileşenlerinden biri olup, osteojenik farklılaşmanın orta dönem belirteçleri arasında yer almaktadır. Yeni kemik dokusu oluşumu sırasında osteoblastların proliferasyonu ile birlikte *Col1a1* sentezi yoğun şekilde artmakta, ancak hücrelerin farklılaşma ve olgunlaşma dönemine geçişiyle birlikte bu sentez düzeyi azalmaktadır. **Şekil 4.23**'te sunulan sonuçlara göre, *Col1a1* gen ekspresyonu Sf/HAp ve Sf/B-HAp doku iskelelerinde, kontrol grubuna kıyasla sırasıyla yaklaşık 1,5 ve 2,0 kat daha yüksek bulunmuştur. Bu sonuçlar, kaplama yapılan doku iskelelerinin osteojenik farklılaşmayı destekleyici bir mikroçevre sunduğunu göstermektedir. Osteokalsin ise kolajen tip I'den sonra kemik dokusunda en fazla bulunan osteoblastik proteinlerden biri olup, kemik matriksinin sentezi ve mineralizasyonunda önemli bir rol üstlenmektedir. *Ocn*, kemik oluşum sürecinin ileri evrelerinde ifade edilen başlıca genlerden biridir. **Şekil 4.23**'te gösterildiği üzere, kültür süresince tüm gruplarda *Ocn* gen ekspresyon seviyelerinde bir artış gözlenmiştir. Özellikle, B-HAp kaplı doku iskelelerinde *Ocn* ekspresyonunun 21. gün sonunda kontrol grubuna kıyasla yaklaşık 2,5 kat artış gösterdiği belirlenmiştir ($p < 0,05$).

Elde edilen bu veriler, literatürdeki bulgularla uyumlu olarak, sponjinin osteoblast benzeri hücrelerde kolajen sentezini ve osteojenik farklılaşmayı desteklediğini göstermektedir. Nitekim, Kim ve ark. (2009) [249] tarafından MG-63 hücrelerinde yapılan bir çalışmada, deniz süngerinden izole edilen sponjinin osteoblast benzeri hücrelerde kolajen üretimini anlamlı ölçüde artırdığı bildirilmiştir. Benzer şekilde, Lin ve ark. (2011) [81], doğal deniz

süngeri iskeletinin osteoblast hücrelerinin adezyonunu, proliferasyonunu ve osteojenik farklılaşmasını desteklediğini; bununla birlikte osteokalsin ve osteopontin gibi geç dönem osteoblast belirteçlerinin ekspresyonunu artırdığını ve mineralizasyon nodüllerinin oluşumunu sağladığını göstermiştir. Buna paralel olarak, Silva ve ark'nın (2023) [250] yaptığı bir derleme, deniz süngerlerinden elde edilen iskelelerin osteojenik hücre davranışını olumlu yönde etkilediğini ve osteokalsin ile osteopontin ekspresyonunu artırdığını belirtmiştir.

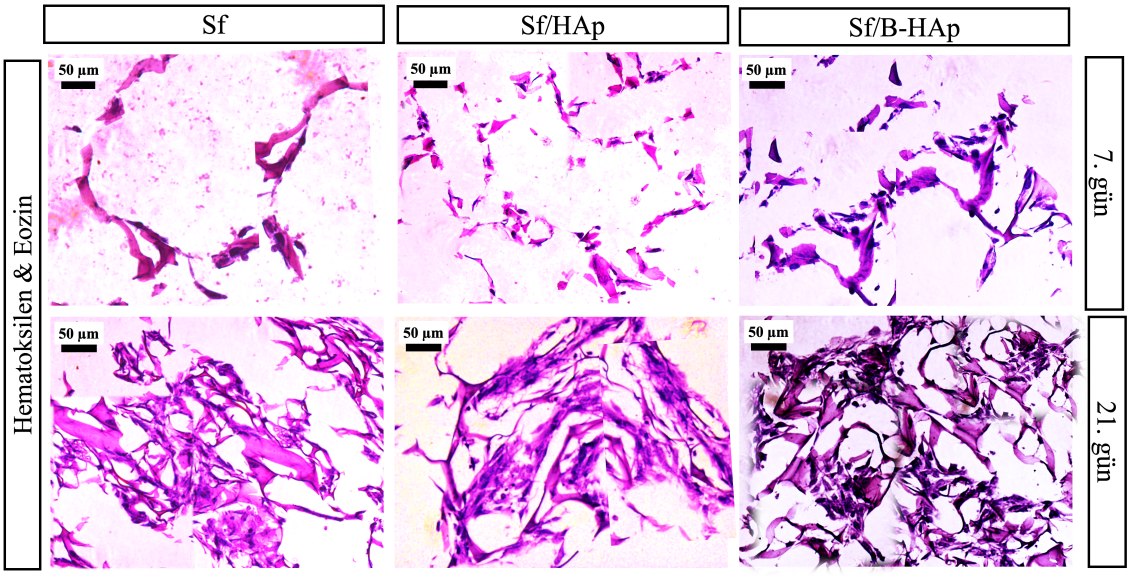
Bu literatür bulgularına ek olarak, bor katkılı HAp'ın da osteojenik farklılaşmayı ve kolajen üretimini desteklediği gösterilmiştir. Gümüşderelioğlu ve ark' nın (2018) yaptığı bir çalışmada [111], bor katkılı HAp içeren 3B nanofibroz PBAT iskelelerinin, insan kemik iliği kaynaklı mezenkimal kök hücrelerde (hBMSC) hem erken hem de geç dönem osteojenik genlerin (ALP, COL1, OCN, OPN) ekspresyonunu anlamlı şekilde artırdığı ve bu iskeleler üzerinde hücrelerin daha fazla mineralize ekstraselüler matriks ürettiği belirlenmiştir. Kang ve ark'nın (2025) çalışmasında [112] ise bor katkılı nano-hidroksiapatitin (B-nHAp), insan kemik iliği mezenkimal kök hücrelerinin proliferasyonunu ve osteojenik farklılaşmasını teşvik ettiği, ALPL, RUNX2, COL1 ve OCN gibi osteojenik belirteçlerin mRNA ve protein düzeylerini artırdığı ve Wnt/β-katenin sinyal yolunu aktive ettiği rapor edilmiştir.

Sonuç olarak, tez çalışmasında elde edilen bulgular, hem sponjinin hem de bor katkılı HAp'ın osteoblast benzeri hücrelerde kolajen sentezini ve osteojenik farklılaşmayı desteklediğini, bu özelliklerin ise kemik doku mühendisliği uygulamaları için umut verici bir temel oluşturduğunu ortaya koymuştur. Ayrıca, bu materyallerin birlikte kullanımının biyouyumlu ve yenilikçi çözümler geliştirilmesine katkı sağlayabileceği öngörülmektedir.

4.4.1.6. Histolojik Boyamalar

Doku iskeleleri üzerinde kültüre edilen MC3T3-E1 hücrelerinin canlılık ve osteojenik farklılaşma potansiyeli, yukarıda belirtilen analizlerle nicel olarak değerlendirilmiştir. Bu bölümde ise, bu süreçlerin nitel olarak değerlendirilmesi ve nicel bulguların desteklenmesi amacıyla histolojik boyamalar yapılmıştır. Kültürün belirli gününde, doku iskeleleri üzerindeki hücrelerin hücresel organizasyonu Hematoksilen&Eozin boyama

ile, osteojenik farklılaşma ve mineralizasyon kapasiteleri ise ALP, Alizarin Red ve Von Kossa boyamaları ile incelenmiştir. Elde edilen sonuçlar sırasıyla **Şekil 4.24**, **4.25**, **4.26** ve **4.27**'de sunulmuştur.

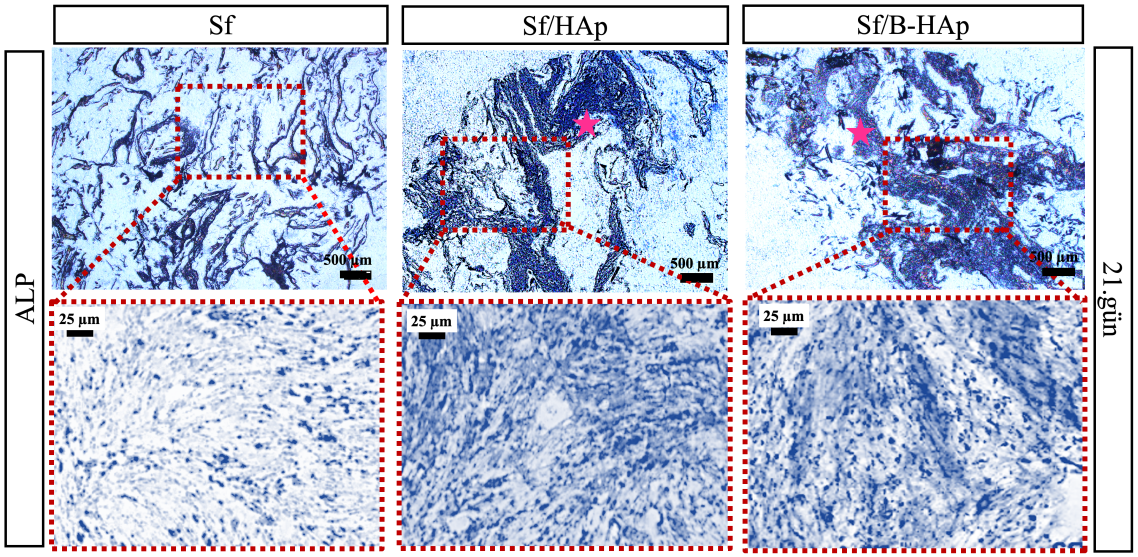


Şekil 4.24. Doku iskeleleri üzerinde kültüre edilen MC3T3-E1 hücrelerin kültürün 7. ve 21. günlerindeki Hematoksilen&Eozin boyama görüntüleri.

Hematoksilen, hücre çekirdeklerini koyu mor-mavi renkte boyarken; eozin, sitoplazma ve ekstraselüler matriksi pembe-kırmızı tonlarında renklendirerek hücrelerin ve doku yapılarının genel morfolojisinin net bir şekilde gözlemlenmesini sağlamaktadır. Hematoksilen&Eozin boyama sonuçları, tüm iskele gruplarında hücrelerin iskele yüzeyine başarılı bir şekilde tutunduğunu, çoğaldığını ve gözenekli yapı boyunca organize olduğunu göstermiştir. Özellikle B-HAp kaplı iskelelerde, hücrelerin daha yoğun dağıldığı ve ekstraselüler matriks üretiminin arttığı belirlenmiştir. Yedinci günde hücrelerin iskele yüzeyine tutunarak yayılmaya başladığı, 21. günde ise hücre yoğunluğunun maksimum seviyeye ulaştığı gözlenmiştir. Bu gözlemler, **Şekil 4.19**'da sunulan SEM sonuçlarıyla da tutarlılık göstermektedir.

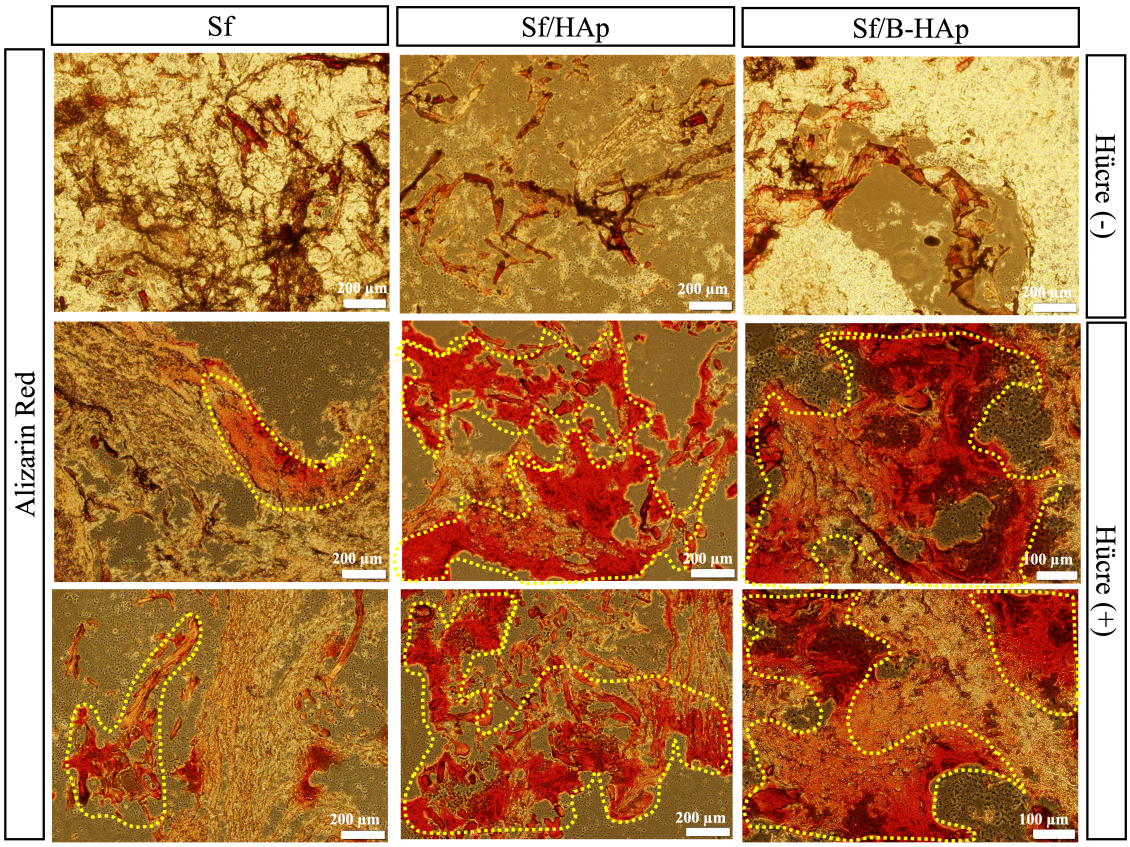
ALP boyaması, osteoblastların erken farklılaşma dönemini değerlendirmede kullanılan bir biyokimyasal belirteçtir ve ALP enzimi, fosfat gruplarını hidrolize ederek mineralizasyonun ilk aşamalarını desteklemektedir. **Şekil 4.25**'de sunulan ALP boyama sonuçları, kültürün 21. gününde osteojenik farklılaşmanın erken evresinin hâlâ devam

ettiğini göstermektedir. ALP aktivitesinin iskeleler üzerinde belirgin şekilde gözlenmesi, hücrelerin osteoblastik hat üzerinde farklılaşmaya başladığını ve mineralizasyon sürecinin başlatıldığını ortaya koymaktadır. Tüm gruplarda ALP boyaması görülmüş olmakla birlikte, özellikle B-HAp kaplı iskelelerde ALP aktivitesinin daha yoğun olduğu belirlenmiştir. Bu bulgular, kaplama işlemlerinin - özellikle B-HAp kaplamanın - osteojenik farklılaşmayı destekleyici etkisini doğrulamaktadır.



Şekil 4.25. Doku iskeleleri üzerinde kültüre edilen hücrelerin kültürün 21. günündeki ALP boyama görüntüleri. Yıldızlar mineralize bölgeleri göstermektedir.

Alizarin Red boyaması, osteoblast farklılaşmasının ileri evresinde meydana gelen kalsiyum birikimini değerlendirmek için yaygın olarak kullanılan bir histolojik yöntemdir. Bu boyama, kalsiyum iyonlarının varlığında kırmızı renkli kompleksler oluşturarak mineralize bölgelerin görsel olarak tespit edilmesini sağlar. Böylece, hücrelerin osteojenik aktivitesi ve mineralizasyon kapasitesi hakkında niteliksel bilgi elde edilir. Tez çalışmamızda yapılan Alizarin Red boyamaları (**Şekil 4.26**) tüm gruplarda kırmızı renkli boyanma alanlarının bulunduğunu; özellikle Sf/B-HAp iskelelerinde belirgin kalsiyum birikiminin gözlendiğini göstermektedir. Bu durum, Sf iskelelerinin ve B-HAp kaplamasının sinerjik etki oluşturarak osteojenik farklılaşmayı ve mineralizasyon sürecini desteklediğini ortaya koymaktadır. Nitekim, Kang ve ark'nın (2025) yaptığı bir çalışmada da [112], bor katkılı nano-hidroksiapatitin (B-nHAp), insan kemik iliği mezenkimal kök hücrelerinde osteoblastik farklılaşmayı teşvik ettiği ve Alizarin Red S boyamasıyla belirgin mineralize nodül oluşumuna yol açtığı rapor edilmiştir.

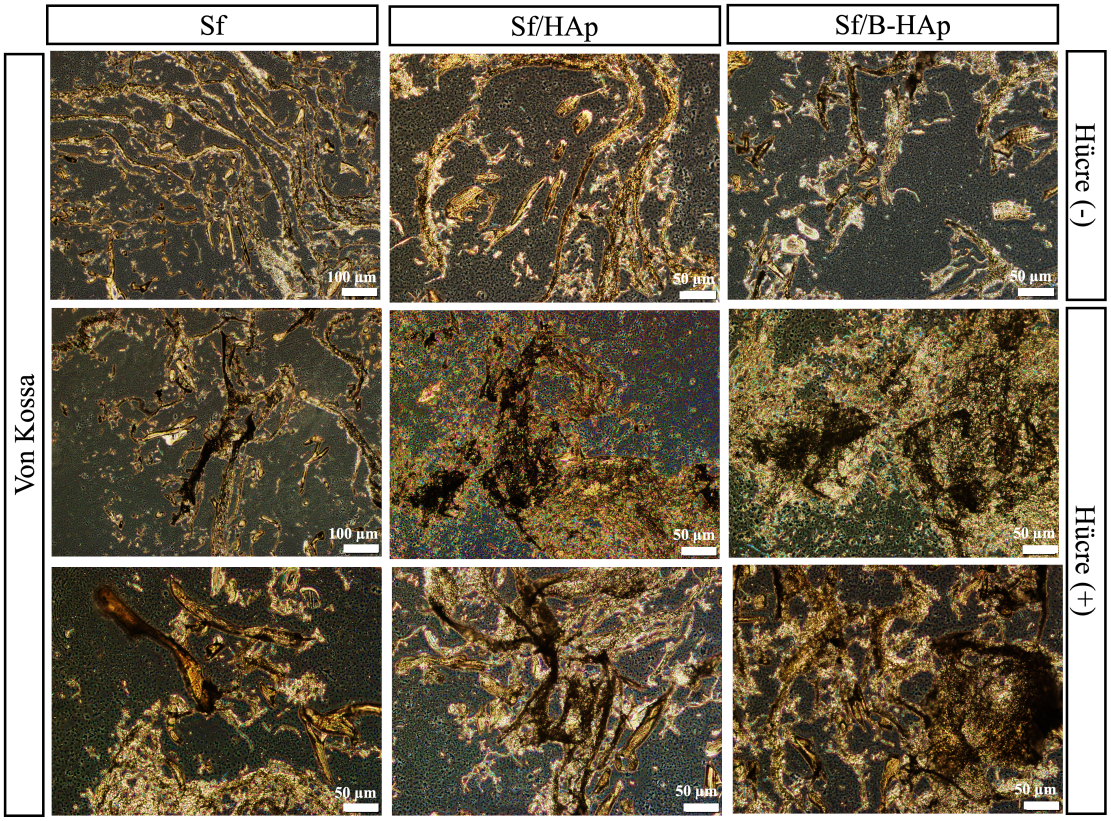


Şekil 4.26. Doku iskeleleri üzerinde kültüre edilen hücrelerin kültürün 21. günündeki Alizarin Red boyama görüntüleri.

Von Kossa boyaması, doku ve hücre kültürlerinde mineralizasyonu değerlendirmek için kullanılır. Bu boyama, kalsiyum tuzlarının varlığını dolaylı olarak tespit eder; gümüş nitrat çözeltisi ile muamele edilen dokularda, fosfat iyonlarıyla reaksiyona girerek ışık altında siyah veya koyu kahverengi gümüş fosfat çökeltileri oluşturur. Böylece, mineralize bölgeler görsel olarak belirlenebilir. **Şekil 4.27**'de sunulan Von Kossa boyama sonuçları, özellikle HAp ve B-HAp kaplı sponjin bazlı iskelelerde, diğer gruplara kıyasla daha koyu ve yoğun bir boyanma olduğunu göstermiştir. Ayrıca, mineralize alanların iskele yüzeyini neredeyse tamamen kapladığı belirlenmiştir. Bu bulgular, kaplama işlemlerinin osteojenik farklılaşmayı ve matriks mineralizasyonunu güçlendirdiğini desteklemektedir.

Histolojik boyama sonuçları, kaplama türlerinin hem hücrelerin iskelelere tutunma ve yayılma yeteneklerini (hücresel yerleşim) hem de osteojenik farklılaşma ve mineralizasyon aktivitelerini (osteojenik aktivite) olumlu yönde etkilediğini ortaya

koymaktadır. Ayrıca, bu veriler, RT-PCR analizlerinden elde edilen gen ekspresyon sonuçlarıyla da tutarlılık göstermekte ve kaplamaların - özellikle B-HAp - sünger yapısındaki sponjin ile sinerjik etki oluşturarak osteojenik süreci desteklediğini doğrulamaktadır.



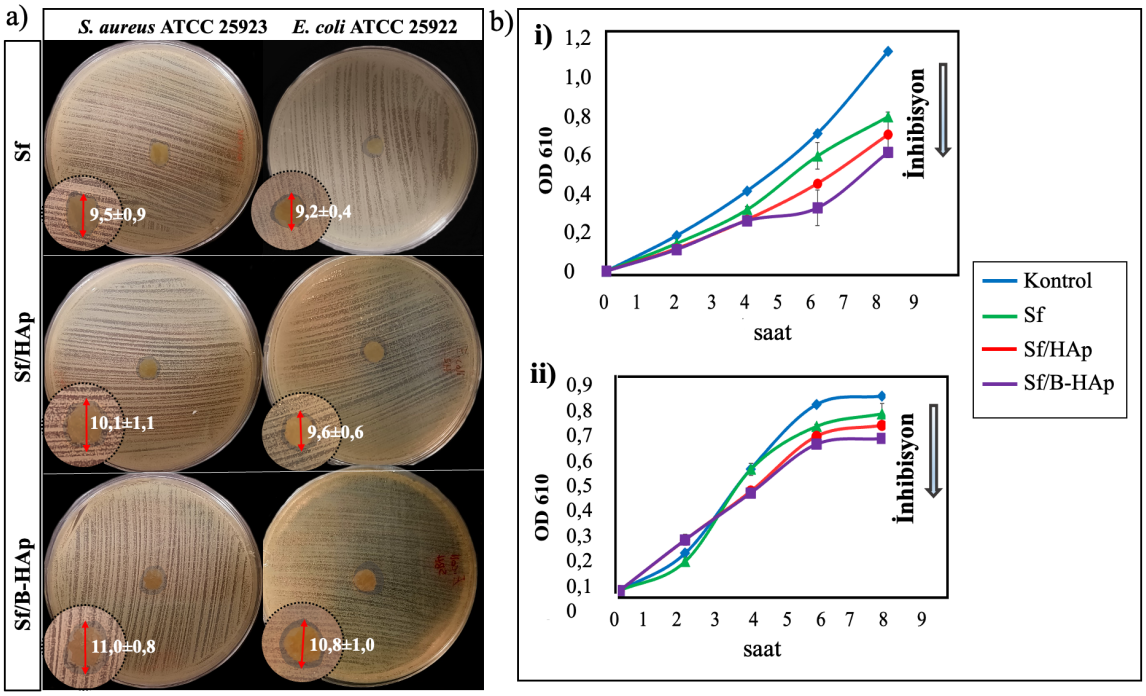
Şekil 4.27. Doku iskeleleri üzerinde kültüre edilen hücrelerin kültürün 21. günündeki Von Kossa boyama görüntüleri.

Çalışma kapsamında elde edilen nicel ve nitel bulgular bir arada değerlendirildiğinde, Sf iskelelerinin osteoblast farklılaşmasını ve mineral birikimini desteklediği, bu nedenle kemik doku mühendisliği uygulamaları için umut verici adaylar oldukları ortaya konmuştur. Sf iskelelerinin biyouyumlu yapısı, uygun gözenek mimarisi ve doğal bileşimi, osteoblastların yapışma, proliferasyon ve farklılaşma süreçleri için elverişli bir mikroçevre sağlamaktadır [81, 250]. Ayrıca, HAp ve bor katkılı HAp kaplamanın bu süreçleri önemli ölçüde hızlandırdığı ve güçlendirdiği, osteojenik farklılaşmanın desteklenmesinde kritik bir rol üstlendiği belirlenmiştir. Nitekim literatürde, bor katkılı HAp'ın hücre canlılığını artırdığı ve progenitör hücrelerin kemik yönelimli farklılaşmasını desteklediği rapor edilmektedir [27, 109, 110]. Ancak bor elementinin

kemik dokusu üzerindeki kesin etki mekanizması henüz tam olarak aydınlatılamamıştır. Borun, Wnt/β-katenin, BMP (Kemik Morfogenetik Proteini) ve MAPK (Mitogen Aktive Edici Protein Kinaz) gibi önemli sinyal yollarını modüle ederek osteoblast gen ekspresyonunu ve matriks mineralizasyonunu düzenlediği düşünülmektedir [112, 113].

4.5. *İn Vitro* Bakteri Kültürü Çalışmaları

Doku iskelelerinin antibakteriyel aktiviteleri, CLSI standartları çerçevesinde Agar Difüzyon ve Optik Yoğunluk (OD) yöntemleri kullanılarak belirlenmiş olup, elde edilen sonuçlar **Şekil 4.28**'de sunulmuştur.



Şekil 4.28. Sf, Sf/HAp ve Sf/B-HAp doku iskelelerine ait antibakteriyel aktivite sonuçları: a) Disk difüzyon yöntemi ile belirlenen inhibisyon zonlarının kamera görüntüleri, b) OD-zaman grafikleri i) *E. coli ATCC 25922* ve ii) *S. aureus ATCC 25923*.

Enfeksiyon kontrolü, kemik rejenerasyonu sırasında kritik öneme sahiptir; çünkü enfeksiyonlar iyileşme sürecini ciddi şekilde engelleyebilir ve implant başarısızlığı riskini artırabilir. Antibakteriyel iskeleler, yalnızca mikrobiyal kontaminasyonu önlemekle kalmayıp, aynı zamanda hücre tutunması ve doku entegrasyonunu da destekleyerek iki yönlü bir işlev görür. Bu tür iskelelerin geliştirilmesi, özellikle enfekte kemik defektlerini içeren vakalarda tedavi sonuçlarını iyileştirmek açısından stratejik bir önem taşımaktadır.

Bu çalışmada antibakteriyel etkinliği değerlendirmek amacıyla, Sf, Sf/HAp ve Sf/B-HAp doku iskeleleri üzerinde *E. coli* (Gram negatif) ve *S. aureus* (Gram pozitif) suşları kullanılarak agar difüzyon testi gerçekleştirilmiştir. Agar difüzyon yönteminde, yüzeylerin etrafında oluşan inhibitör zonlar antibakteriyel aktivitenin bir göstergesi olarak değerlendirilmiştir. Elde edilen bulgulara göre, *E. coli* için inhibisyon zon çapları Sf/B-HAp grubunda yaklaşık 11 mm, Sf/HAp grubunda 9,5 mm ve Sf grubunda 9 mm olarak ölçülmüştür. *S. aureus* için ise zon çapları sırasıyla Sf/B-HAp grubunda 11 mm, Sf/HAp grubunda 10 mm ve Sf grubunda 9,5 mm olarak belirlenmiştir. Zon çaplarının büyüklüğü, antibakteriyel etkinin gücünü göstermekte olup, hem *E. coli* hem de *S. aureus* üzerinde en yüksek antibakteriyel etkinin B-HAp kaplı iskelelerde sağlandığı ortaya konmuştur. Antibakteriyel aktivitenin kantitatif değerlendirmesi, iskelelerle muamele edilen bakterilerin OD_{610} değerlerinin ölçülmesiyle gerçekleştirilmiştir. OD_{610} ölçümleri sonucunda, hem *E. coli* hem de *S. aureus* bakterilerinin büyümesinin sponjin bazlı iskeleler tarafından inhibe edildiği ve B-HAp kaplaması ile bu inhibisyon düzeyinin daha da arttığı belirlenmiştir.

Sonuç olarak, nicel ve nitel değerlendirmeler neticesinde sponjin bazlı iskelelerin antibakteriyel özellikler gösterdiği tespit edilmiştir. Bu özelliklerin, sponjin yapısındaki terpenoidler, alkaloidler, peptitler, polifenoller ve polisakkaritler gibi ikincil metabolitlerden kaynaklandığı düşünülmektedir. Bu bileşikler, bakteri hücre zarlarını bozarak veya metabolik yolları engelleyerek antibakteriyel aktivite gösterir [251, 252]. Ayrıca, B-HAp kaplamanın bu etkiyi belirgin şekilde artırdığı gözlenmektedir. Bu durum yapıdaki borun, bakteriyel metabolik yolları hedef alarak hücre zarlarını destabilize ettiği ve quorum sensing mekanizmalarını bozması ile ilişkilendirilmiştir [253]. Özellikle her iki bakteri türünde de gözlemlenen benzer inhibisyon paternleri, B-HAp kaplamalarının geniş spektrumlu antibakteriyel özellikler sağladığını göstermektedir. Elde edilen antibakteriyel deney sonuçları, doğal sponjin matriksi ile bor katkısının iskele temelli kemik doku mühendisliği uygulamalarında enfeksiyon kontrolünü artırmada tamamlayıcı bir rol üstlenebileceğini ortaya koymaktadır.

KISIM II

4.6. *Sarcotragus foetidus* Sünger Kolajenin İzole Edilmesi

Literatürde deniz süngerlerinden kolajen izolasyonu için çeşitli protokoller bulunmaktadır. Çalışmamızda literatürden farklı olarak izolasyon süresini kısaltmak ve verimi artırmak amacıyla modifiye bir yöntem geliştirilmiş ve elde edilen kolajen izolatı kapsamlı bir şekilde karakterize edilmiştir.

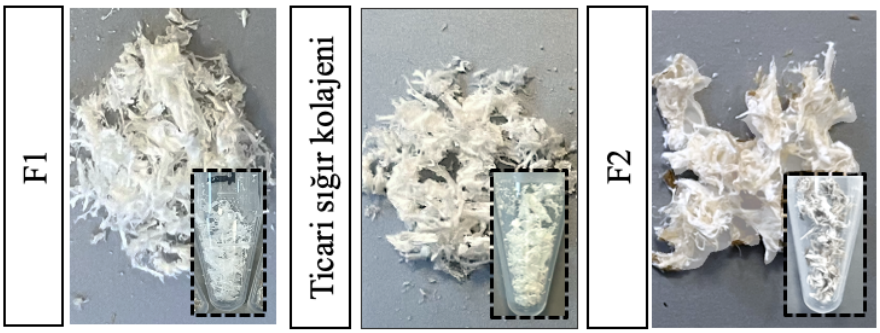
4.6.1. Sünger Kolajeninin Karakterizasyonu

Tez çalışmasında, *Sarcotragus foetidus* süngerinden kolajen izolasyonu amacıyla hipotonik tampon, SDS ile hücresizleştirme ve tuz içeren çözücülerin kullanıldığı, asidik çöktürmeye dayalı bir yöntem uygulanmıştır. Geliştirilen iki farklı formülasyona ait gravimetrik ölçümler sonucunda, kolajen izolasyon verimi F1 ve F2 formülasyonları için sırasıyla yaklaşık %10 ve %12 olarak belirlenmiştir. Bu verim değerlerinin, literatürde bildirilen birçok çalışmaya göre daha yüksek olduğu görülmektedir. Örneğin, *Geodia cydonium* süngerine yönelik yapılan bir çalışmada, herhangi bir denatüran madde kullanılmadan gerçekleştirilen izolasyon sonucunda kolajen verimi %1,7 olarak belirlenmiştir [224]. Benzer şekilde, *Ircinia fusca* süngerinden izole edilen Tip I ve IV kolajenlerin toplam miktarı kuru sünger ağırlığına göre yaklaşık %12,3'e olarak bulunmuş, bu değerin büyük kısmının çözünmeyen kolajen formuna ait olduğu bildirilmiştir [254]. Literatürde en yüksek verimlerden biri, %30 oranıyla *Chondrosia reniformis* süngerinden elde edilmiştir [225]. Bu yüksek izolasyon verimi, süngerin yumuşak yapısı, spikül içermemesi ve neredeyse tamamen kolajenden oluşan matriks yapısı ile ilişkilendirilmektedir.

Sarcotragus foetidus türü yapısal olarak daha kompleks bir matrikse sahip olup belirli oranda silika spikül ve diğer hücresel kalıntılar içerebilmektedir. Bu durum, toplam kuru ağırlık içerisinde kolajen oranını azaltarak izolasyon verimini sınırlayabilir. Ayrıca, bu çalışmada kullanılan ekstraksiyon yöntemi, pepsin gibi enzimlerle yapılan daha agresif protokollere kıyasla daha ılımlı koşullar içermekte olup, bazı çözünür kolajen formlarının kaybına yol açabilecek asidik çöktürme ve santrifüjleme adımlarını içermektedir. Öte yandan, deniz süngerlerinin biyokimyasal içerikleri çevresel faktörlere (sıcaklık, besin

durumu, habitat koşulları) bağlı olarak değişkenlik gösterebilmekte, bu da izolasyon verimlerini doğrudan etkilemektedir.

Tüm bu etkenler göz önünde bulundurulduğunda, *Sarcotragus foetidus* süngerinden elde edilen %10-12 aralığındaki kolajen verimi, hem literatürle uyumlu hem de modifiye edilen yöntemin etkinliğini ortaya koyan anlamlı bir sonuç olarak değerlendirilmektedir. Farklı formülasyonlar kullanılarak izole edilen kolajen örneklerine ve karşılaştırma amacıyla kullanılan ticari sığır kolajenine ait dijital kamera görüntüleri **Şekil 4.29**'da sunulmuştur.



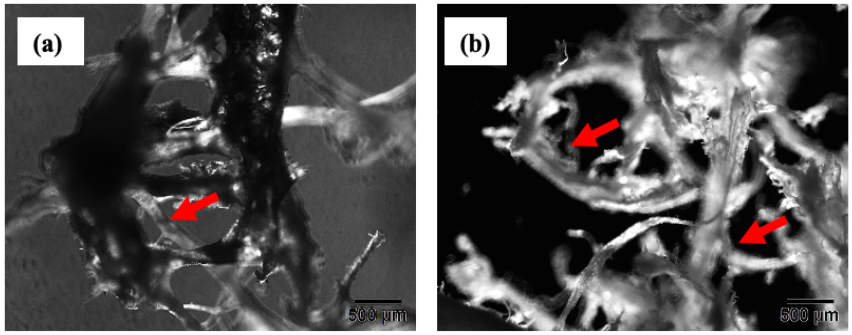
Şekil 4.29. Farklı formülasyonlarla elde edilen kolajen örnekleri ve ticari sığır kolajeninin makroskobik görüntüleri (Sağ alt köşe: Eppendorf örnekleri).

Dijital kamera görüntüleri incelendiğinde, izole edilen kolajen örneklerinin makroskobik özelliklerinin ticari sığır kolajeni ile benzerlik gösterdiği belirlenmiştir. Özellikle, her iki kolajen örneğinde de lifli bir yapı gözlemlenmiş ve renklerinin beyazımsı tonlarda olduğu görülmüştür. Bu sonuç, geliştirilen izolasyon yönteminin kolajenin doğal morfolojik bütünlüğünü koruyarak başarılı bir şekilde saflaştırılabildiğini göstermektedir.

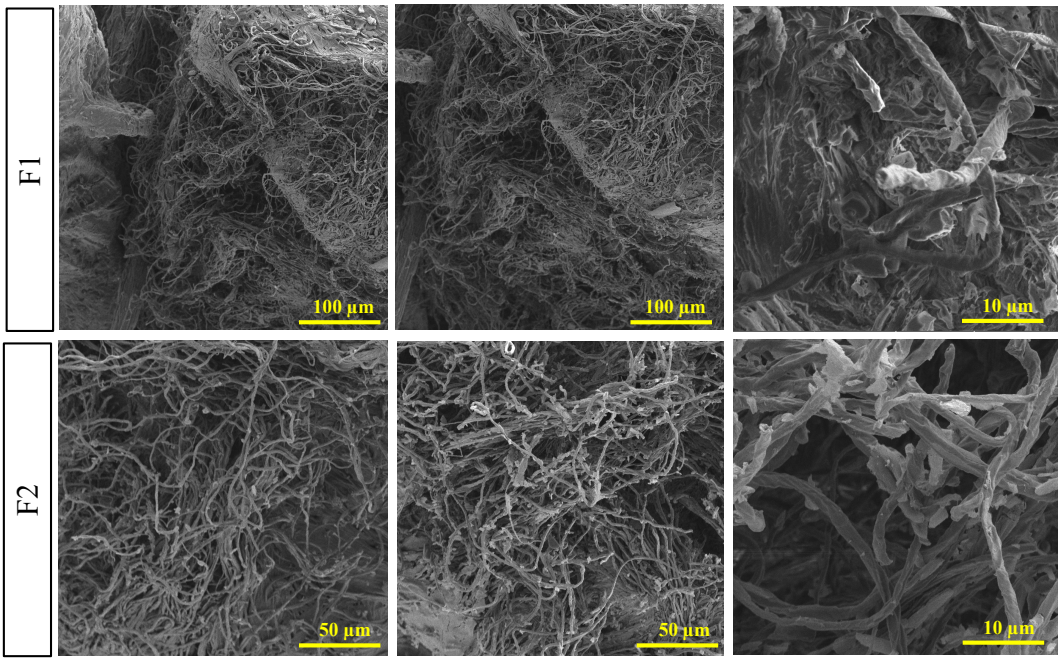
Bu doğrultuda, geliştirilen modifiye izolasyon yönteminin, hem izolasyon süresini kısalttığı hem de literatürde bildirilen verim oranlarına kıyasla daha yüksek bir izolasyon verimi sağladığı sonucuna varılabilir. Ayrıca, izole edilen kolajenin makroskobik yapısal özelliklerinin ticari kolajen ile benzerlik göstermesi, uygulanan yöntemin kolajen lif yapısını koruyacak şekilde optimize edildiğini desteklemektedir.

4.6.1.1. Optik Mikroskop Görüntüleri ve SEM Analizi

İzole edilen kolajenin morfolojik özellikleri optik mikroskop ve taramalı elektron mikroskobu (SEM) kullanılarak incelenmiştir. Bu kapsamda sulu ortamda süspanse halde bulunan kolajen örnekleri analiz yapılacak yüzeye damlatılarak kurutulmuştur. Kurutma işleminin ardından, örnekler optik mikroskop ve SEM ile incelenmiştir. *Sarcotragus foetidus* süngerinden elde edilen kolajen örneklerinin optik mikroskop ve SEM görüntüleri sırasıyla **Şekil 4.30** ve **4.31**'de sunulmuştur.



Şekil 4.30. (a) F1 (b) F2 formülasyonları kullanılarak izole edilen kolajen örneklerine ait optik mikroskop görüntüleri. Kırmızı oklar kolajen fibrillerini göstermektedir.

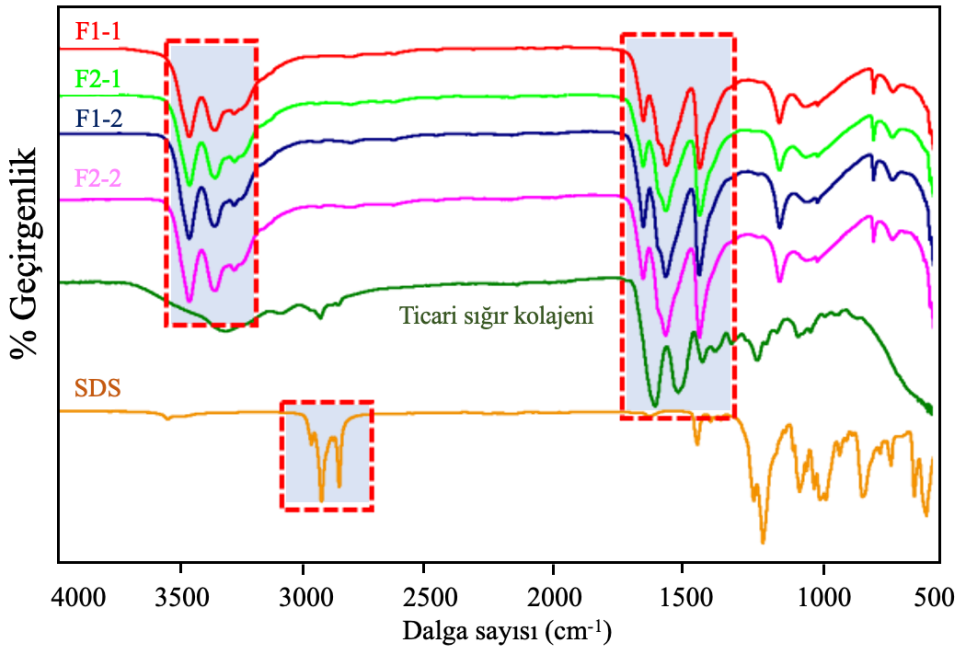


Şekil 4.31. F1 ve F2 formülasyonları kullanılarak izole edilen kolajen örneklerine ait farklı büyütmelerdeki SEM görüntüleri.

Literatürde kolajen yüzey morfolojilerinin dört farklı biçimde olduğu belirtilmiştir. Bunlar; nano lif ve gözenek içermeyen pürüzsüz bir yüzey, nano liflerden oluşan ancak gözenek içermeyen yüzey, nano lifli ve gözenekli yüzey, nano fiberlerle kombinasyon halinde ve farklı boyutlarda (makro ve/veya mikro) iki tip gözenekten oluşan yüzeylerdir [255]. Tez kapsamında optik mikroskop ve SEM ile incelenen kolajen örneklerinde, her iki formülasyon için de benzer sonuçlar elde edilmiştir. Kolajenin yüzey morfolojisinin nano lif ve gözenek içermeyen, pürüzsüz bir yapıda olduğu gözlemlenmiş; ancak yüzeyde hafif fibril kırıklarına rastlanmıştır. İzole edilen kolajen örneklerinde gözlenen bu fibril kırıklarının, izolasyon süreci sırasında uygulanan kimyasal ve mekanik stresler ile kurutma aşamasında oluşan çekme gerilimlerinden kaynaklanabileceği düşünülmektedir.

4.6.1.2. Kimyasal Özelliklerin Belirlenmesi

Kolajen örneklerinin kimyasal yapısının belirlenebilmesi için toz haldeki örnekler ATR-FTIR ile 400-4000 cm^{-1} dalga boyu aralığında incelenmiştir. Analiz sonucunda elde edilen spektrumlar birbirleri ile karşılaştırılarak **Şekil 4.32**'de sunulmuştur.



Şekil 4.32. Farklı izolasyon formülasyonları kullanılarak elde edilen kolajen örneklerine ait ATR-FTIR spektrumları. (Formülasyon adının sonundaki '1' birinci paraleli, '2' ise ikinci paraleli temsil etmektedir).

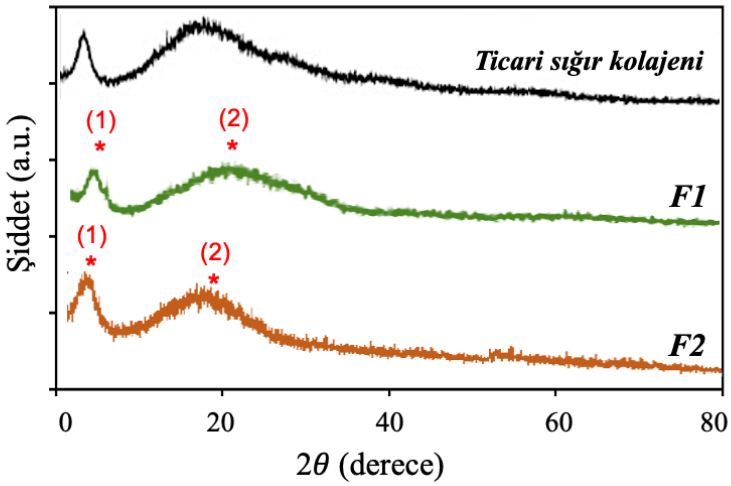
Şekil 4.32'de sunulan ATR-FTIR spektrumları analiz edildiğinde, kolajene özgü karakteristik amid bantlarının, her iki formülasyona ait spektrumlarda net bir şekilde gözlemlendiği belirlenmiştir. Yaklaşık 3400 cm^{-1}'deki Amid A bandı N–H gerilme titreşimlerini temsil ederek amino gruplarının korunmuş olduğunu gösterir. Dalga sayısı 1650 cm^{-1} civarında yer alan Amid I bandı, protein yapısındaki C=O gerilme titreşimlerinden kaynaklanmakta olup, kolajenin moleküler düzeydeki yapısal bütünlüğünü yansıtır. Bu bandın çözülmesiyle elde edilen alt bileşenlerden α-heliks (~1655 cm^{-1}) ve β-tabaka (~1630 cm^{-1} ve ~1690 cm^{-1}) oranları, ikincil yapı dağılımını ortaya koyamakta ve protokolün triple-helikal (üçlü sarmal) yapıyı koruduğunu göstermektedir. Spektrumlarda 1550 cm^{-1} bölgesindeki Amid II bandı, N–H bükülme ve C–N gerilme titreşimlerini yansıtırken; 1240 cm^{-1} civarındaki Amid III bandı ise C–N gerilmesi ve N–H bükülmesinin kombinasyonunu temsil eder [256].

Ayrıca, izolasyon sürecinde hücresizleştirme ajanı olarak kullanılan SDS'e özgü karakteristik bantlar (2918 cm^{-1} ve 2850 cm^{-1} civarında C-H gerilme titreşimleri ile 1200-1000 cm^{-1} aralığında S-O gerilmesi) kolajen örneklerine ait spektrumlarda tespit edilmemiştir. Bu durum, izolasyon sonrası uygulanan yıkama işlemlerinin başarılı olduğunu ve yapıda toksik SDS kalıntısının kalmadığını göstermektedir.

Sonuç olarak, ATR-FTIR spektrumları, her iki formülasyonda da kolajene özgü amid bantlarının varlığını göstererek üçlü sarmal yapının korunduğunu ve izolasyonun yapısal bütünlüğü bozmadığını doğrulamaktadır.

4.6.1.3. Kristalografik Özelliklerin Belirlenmesi

Süngerden elde edilen kolajen örneklerinin kristalin yapı özelliklerini değerlendirmek amacıyla X-Işını Kırınımı (XRD) analizi gerçekleştirilmiş olup XRD difraktogramları **Şekil 4.33**'te sunulmuştur.



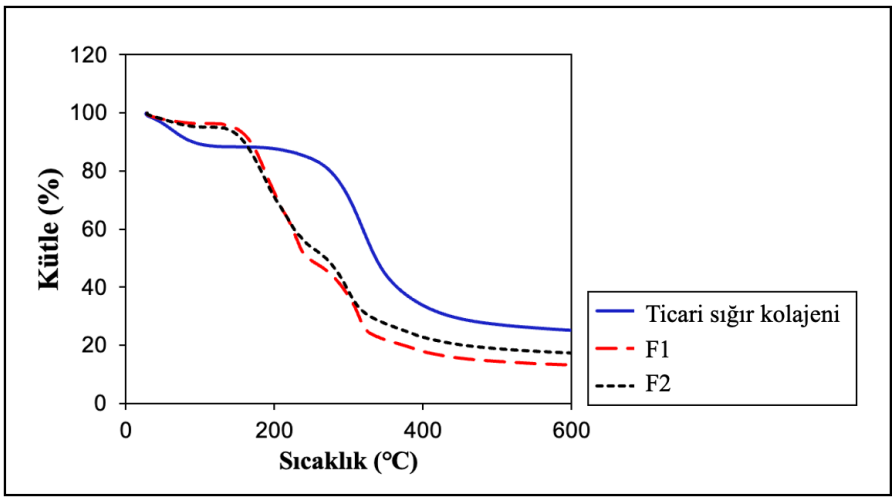
Şekil 4.33. F1 ve F2 formülasyonları kullanılarak izole edilen kolajen örnekleri ile ticari sığır kolajenine ait XRD difraktogramları.

XRD analizi sonucunda, izole edilen kolajen örneklerinde iki karakteristik pik tespit edilmiştir. İlk pik, kolajen moleküllerinin aksiyel periyodisitesini (uzunlamasına düzenli dizilim) temsil ederken; ikinci pik, üçlü sarmal kolajen moleküllerinin lateral dizilimini yansıtarak kolajen fibrillerinin yarı kristalin doğasını ortaya koymuştur [257]. Bu karakteristik pikler, kolajen yapısının belirli bir moleküler düzenlilik sergilediğini göstermektedir. Öte yandan, gözlemlenen piklerin geniş ve düşük yoğunluklu olması, izole edilen kolajen örneklerinde belirgin bir amorf fazın hakim olduğunu işaret etmektedir. Amorf yapı, kolajenin doğal esnekliğinin korunduğunu ancak tam anlamıyla kristal bir organizasyonun oluşmadığını göstermektedir. Bu durum, sünger kökenli kolajenlerin doğal yapısal düzensizliklerinden ve biyolojik çeşitliliklerinden kaynaklanabilir.

Sonuç olarak, elde edilen XRD verileri, sünger kökenli kolajenlerin her iki formülasyonda da doğal yapılarını koruyarak etkin şekilde izole edilebildiğini ve biyomedikal uygulamalar için uygun potansiyele sahip olduklarını göstermektedir.

4.6.1.4. Termal Özelliklerin Belirlenmesi

Sünger kolajeni örneklerinin ısısal karakteristik özellikleri TGA ve DSC analizleri ile belirlenmiştir. Elde edilen termogramlar sırasıyla **Şekil 4.34** ve **4.35**'te sunularak örneklere ait kütle kayıpları ve ısısal özellikleri tespit edilmiştir.

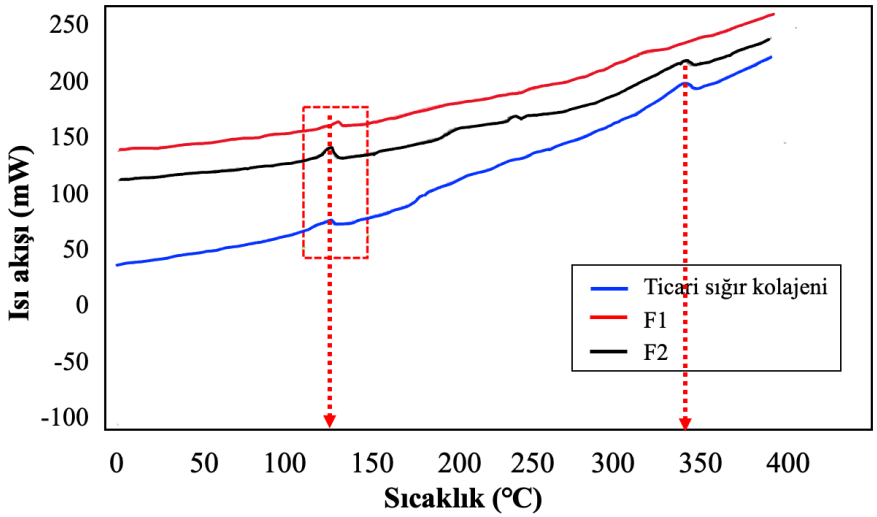


Şekil 4.34. F1 ve F2 formülasyonları kullanılarak izole edilen kolajen örnekleri ile ticari sığır kolajenine ait TGA termogramları.

Yapılan termal analizler sonucunda, izole edilen kolajenin termal bozunmasının iki aşamada gerçekleştiği gözlemlenmiştir. İlk aşamada meydana gelen ağırlık kaybı, kolajen molekülündeki hidrofilik gruplara bağlı serbest ve yapısal suyun buharlaşmasından kaynaklanmaktadır. Bu basamakta özellikle hidrojen bağlarının kopmasıyla su kaybı meydana gelmiştir. İkinci aşamada ise, polimerik yapının bozulmasıyla birlikte, kolajenin peptit zincirlerindeki kovalent bağların (özellikle peptit bağlarının -C=O-NH-) kırılması ve sakkarit halkalarının dehidrasyonu ile belirgin bir kütle kaybı gerçekleşmiştir [258]. Termogram verilerinden de görüldüğü üzere, farklı formülasyonlarla izole edilen kolajen örneklerinin benzer termal bozunma profillerine sahip olduğu belirlenmiş ve bu durum uygulanan izolasyon yöntemlerinin kolajenin temel termal stabilitesini değiştirmediğini göstermiştir.

Şekil 4.35'te ısıtma hızı artırıldıkça, kolajen örneklerinin diferansiyel ısıl davranışlarının daha belirgin hale geldiği gözlemlenmiştir. Termogramlarda, tüm kolajen örneklerinde yaklaşık 140°C'de belirgin bir endotermik pik meydana geldiği ve bu sıcaklıkta kolajenin doğal yapısında bulunan sekonder, tersiyer ve kuaterner yapıların bozularak primer yapıya dönüştüğü tespit edilmiştir. Bu sıcaklıkta gözlenen endotermik olay, kolajenin denatürasyonu ve üçlü sarmal yapısının çözülmesi ile ilişkilendirilmiştir. Buna ek olarak, yaklaşık 350°C civarında bir diğer endotermik pik daha gözlemlenmiştir. Bu pik, kolajen molekülünde peptit bağlarının kopmasına ve ana polimer zincirinin termal olarak

ayrışmasına işaret etmektedir. Bu sıcaklık bölgesindeki endotermik olay, kolajenin tamamen bozunmaya uğradığını ve moleküler yapısının çözündüğünü göstermektedir.



Şekil 4.35. F1 ve F2 formülasyonları kullanılarak izole edilen kolajen örnekleri ile ticari sığır kolajenine ait DSC termogramları.

4.6.1.5. Toplam Protein Miktarının Belirlenmesi

İzole edilen örneklerin protein içeriğini belirlemek amacıyla Bradford spektrofotometrik yöntemi uygulanmıştır. Bradford analizi, proteinlerin içerdiği aromatik ve bazik amino asit kalıntılarına bağlanan Coomassie Brilliant Blue boyasının oluşturduğu renk değişimini temel alır ve bu yönüyle toplam protein tayininde sıkça kullanılmaktadır. Tez çalışmasında elde edilen örneklerin yalnızca kolajen içerdiği ve başka protein fraksiyonları içermediği göz önüne alındığında, Bradford analizi ile elde edilen toplam protein miktarı, izole edilen kolajenin yaklaşık miktarını ifade edecek şekilde değerlendirilmiştir.

Bradford analizi sonucunda, F1 formülasyonunda izole edilen kolajen örneklerinde ~ 310 mg/g kuru kütle, F2 formülasyonunda ise ~ 350 mg/g kuru kütle olarak ölçülmüştür. Bu değerler, literatürde farklı deniz süngerlerinden izole edilen kolajen örnekleri için belirtilen protein içerikleriyle karşılaştırıldığında oldukça yüksektir.

Örneğin, Palella ve ark. (2011) [254] tarafından yürütülen bir çalışmada, *Ircinia fusca* süngerinden elde edilen toplam protein miktarı 139,46 ± 6,97 mg/g kuru sünger olarak

raporlanmıştır. Bir diğer çalışmada ise farklı sünger türlerinin protein içerikleri karşılaştırılmış; toplam protein oranlarının %2,74 ile %33,31 arasında, kuru ağırlığa göre ise 24,16 mg/g ile 209,55 mg/g arasında değiştiği bildirilmiştir. Bu kapsamda, %33,31 protein içeriği ile en yüksek değerin *Callyspongia fibrosa* süngerine, %2,74 protein içeriği ile en düşük değerin ise *Pseudoceratina purpurea* süngerine ait olduğu belirtilmiştir [259]. Buna ek olarak, Tziveleka ve ark. (2017) [248], *Axinella cannabina* süngerinden izole edilen kolajenin çözünmeyen fraksiyonunda protein içeriğini 126 mg/g olarak bildirmiştir.

Tez çalışmasında elde edilen 310-350 mg/g aralığındaki değerler, literatürde bildirilen örneklere kıyasla daha yüksek olup, dikkate değer bir farklılık ortaya koymaktadır. Bu farklılık, birkaç etkene bağlı olarak açıklanabilir. Öncelikle, kullanılan modifiye izolasyon protokolü, kolajen kaybını en aza indirecek şekilde optimize edilmiştir. Özellikle yıkama ve saflaştırma adımlarında uygulanan kontrollü işlemler, kolajen zincirlerinin yapısal bütünlüğünün korunmasına ve protein kaybının azaltılmasına katkı sağlamıştır. Ayrıca, *Sarcotragus foetidus* süngerinin doğal yapısında daha yüksek miktarda fibrilöz protein içeriğine sahip olması da elde edilen yüksek protein konsantrasyonunu destekleyen bir diğer faktördür [16].

Sonuç olarak, Bradford analizinden elde edilen bu bulgular, hem uygulanan izolasyon yönteminin verimliliğini hem de *Sarcotragus foetidus*'un kolajen açısından zengin bir kaynak olduğunu açıkça ortaya koymaktadır.

4.6.1.6. Hidroksiprolin Analizi

İzole edilen kolajen örneklerinin amino asit bileşimini ve saflık düzeyini değerlendirmek amacıyla hidroksiprolin analizi gerçekleştirilmiştir. Hidroksiprolin, kolajene özgü bir amino asit olup, bu analiz kolajen varlığının ve yapısal bütünlüğünün dolaylı bir göstergesi olarak kabul edilmektedir.

Yapılan ölçümler sonucunda, F1 ve F2 formülasyonlarının her ikisinde de hidroksiprolin oranı yaklaşık %9 olarak hesaplanmıştır. Bu değer, literatürde yer alan bazı çalışmalarla karşılaştırıldığında anlamlı düzeydedir. Örneğin, *Spongia officinalis* süngerinin farklı formlarında hidroksiprolin içeriği sert *Spongia* kolajeni için %4,6, yumuşak *Spongia*

kolajeni için %3,6 olarak bildirilmiştir [260]. *Spongia* örneklerinde tespit edilen düşük hidroksiprolin düzeylerinin, ekstraktlarda bulunan üçlü sarmal yapıya sahip olmayan kolajen polipeptitlerinin ve ayrıca kolajenle güçlü şekilde ilişkili olduğu bilinen glikoproteinlerin varlığından kaynaklandığı belirtilmiştir. Yapılan başka bir çalışmada, *Geodia cydonium* süngerinden izole edilen kolajenin hidroksiprolin oranı yaklaşık %8 olarak raporlanmıştır [224]. Karşılaştırma açısından, literatürde sığır kaynaklı Tip I kolajende bu oranın yaklaşık %10 civarında olduğu belirtilmektedir [83].

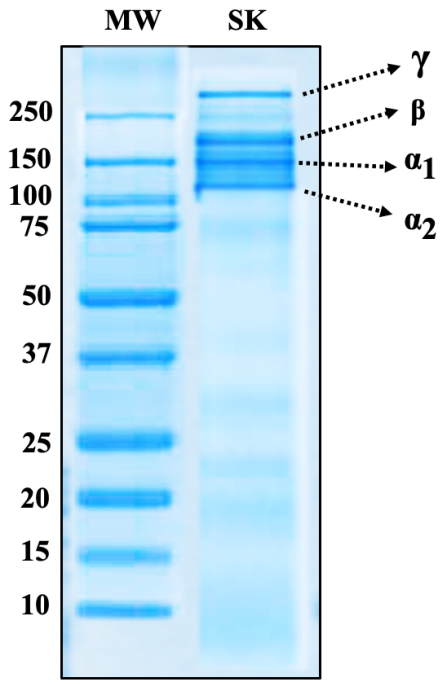
Tez çalışmasında elde edilen hidroksiprolin oranlarının yüksek oluşu, izole edilen örneklerin kolajen açısından zengin olduğunu ve uygulanan izolasyon yönteminin, kolajenin üçlü sarmal yapısını ve kimyasal bütünlüğünü büyük ölçüde koruduğunu göstermektedir. Bu sonuçlar, hem izolasyon sürecinin etkinliğini hem de elde edilen kolajenin yüksek saflıkta olduğunu desteklemektedir.

Çalışmanın ilerleyen aşamalarında, en yüksek izolasyon verimi ve kolajen içeriğinin F2 formülasyonunda elde edilmesi nedeniyle, kolajen izolasyonunda bu formülasyonun kullanılmasına karar verilmiştir. Bu formülasyonla elde edilen kolajen örnekleri, "***SK***" (sünger kolajeni) olarak adlandırılmış ve devam eden çalışmalar bu örnek üzerinden yürütülmüştür.

4.6.1.7. Sodyum Dodesil Sülfat Poliakrilamid Jel Elektroforezi (SDS-PAGE)

Tez çalışması kapsamında izole edilen kolajen örneklerinin moleküler ağırlık profili (örneğin α, β, γ zincirleri) ve saflık düzeyi, hidroksiprolin analizini tamamlayıcı nitelikte, SDS-PAGE analizi ile incelenmiştir.

Kolajen molekülü iki α zinciri ve bir β zincirinden oluşmaktadır. β (dimer) zincirinin moleküler ağırlığı yaklaşık 200 kDa iken, α zincirlerinin moleküler ağırlıkları 110 kDa'ya yakın veya daha büyüktür. β zincirinin varlığı, kolajenin moleküller arası etkileşimler içerdiğini ortaya koymaktadır. Öte yandan, γ (trimer) zincirinin varlığı, kolajenin üç zincirinin intramoleküler çapraz bağlarla birbirine bağlandığını göstermektedir [261].



Şekil 4.36. Sünger kolajenine (SK) ait SDS-PAGE jel elektroforez görüntüsü (MW: standart protein ağırlığı, kDa)

Şekil 4.36'da görülen jel, *Sarcotragus foetidus* deniz süngerinden izole edilen kolajenin alt birim bantlarını göstermektedir. Jelde, 150-100 kDa aralığında iki alfa zincirinin (α_1 ve α_2) karakteristik bantları gözlemlenmekte olup, α_2 zinciri α_1 zincirine göre daha düşük oranda bulunmaktadır ve bant genişliği de daha dardır. Ayrıca, 200-250 kDa aralığında yüksek moleküler ağırlıklı β bileşeni de tespit edilmiştir. β zincirinin varlığı, kolajenin moleküller arası etkileşimlerini işaret etmektedir [262]. Jel üzerinde yaklaşık 275 kDa civarındaki γ (trimer) zincirinin de gözlenmesi, kolajenin üç zincirinin molekül içi çapraz bağlarla birbirine bağlandığını göstermektedir (**Şekil 4.36**). Bu durum, tip I kolajen ile uyumlu bir profil ortaya koymakta olup, elde edilen sonuçlar literatürdeki çalışmalarla da örtüşmektedir. Ayrıca, **Şekil 4.36**'de gözlenen belirgin bant yoğunluğu ve netliği, tez çalışması kapsamında izole edilen kolajenin saf bir şekilde elde edildiğine işaret etmektedir.

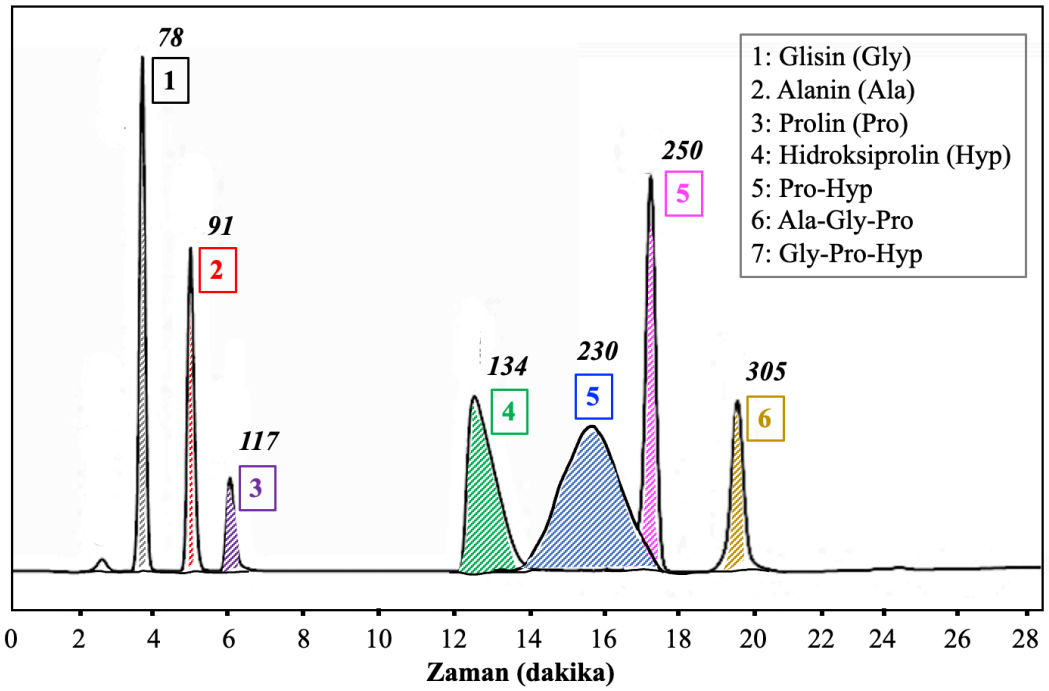
Literatürde deniz süngerlerinden izole edilen kolajenin SDS-PAGE analiziyle karakterize edildiği çeşitli çalışmalar mevcuttur. Pozzolini ve ark'nın 2021 yılında yaptıkları bir çalışmada [16] *Ircinia* oros ve *Sarcotragus foetidus* türlerinden izole edilen kolajen filamentlerinin biyokimyasal karakterizasyonu yapılmıştır. Bu kapsamda gerçekleştirilen

SDS-PAGE analizi, her iki örnekte de yaklaşık 130 kDa moleküler ağırlığa sahip ana kolajen alt birim bandının varlığını ortaya koymuştur. Analiz, 7% poliakrilamid jel kullanılarak gerçekleştirilmiş ve örnekler 90 °C'de 5 dakika ısıtıldıktan sonra jel üzerine yüklenmiştir. Elektroforez sonrasında jel, kolloidal Coomassie mavisi ile boyanarak protein bantları görselleştirilmiştir. Elde edilen sonuçlar, deniz süngerlerinden izole edilen kolajenlerin, memeli kaynaklı kolajenlere alternatif olarak biyomedikal uygulamalarda kullanılabileceğini göstermiştir [16]. Başka bir çalışmada, *Hippospongia communis* türünden izole edilen sponjin örnekleri üzerinde detaylı bir SDS-PAGE analizi yapılmıştır. Bu analiz, sponjin liflerinin ana yapısal protein bileşenlerinin memeli kolajen tip I ve III ile uyumlu olduğunu ortaya koymuştur. Elde edilen bulgular, sponjin liflerinin memeli kolajenleriyle önemli ölçüde yapısal benzerlikler taşıdığını göstermiştir. Ayrıca, bu kolajenlerin sponjin yapısının temel bileşenleri olduğu ifade edilmiştir [263].

4.6.1.8. Sıvı Kromatografi-Kütle Spektrometrisi (LC-MS) Analizi

Tez çalışması kapsamında izole edilen kolajenin aminoait profili ve ptoteomik özellikleri SDS-PAGE analizi tamamlayıcı nitelikte LC-MS analizi ile incelenmiştir. Analiz sonucunda pikler renk kodlarıyla işaretlenerek m/z değerleri ile birlikte **Şekil 4.37**'de sunulmuştur.

Kolajen, karakteristik amino asit bileşimiyle dikkat çeken bir proteindir ve yapısının yaklaşık %60'ını glisin, prolin ve hidroksiprolin oluşturur. Glisin, üçlü sarmal yapının sıkı bir şekilde birleşimini sağlayarak kolajenin mekanik dayanıklılığına ve yapısal stabilitesine önemli katkı sağlar. Prolin ve hidroksiprolin ise kolajenin yapısal bütünlüğü ve termal kararlılığı açısından kritik rol oynar. Ayrıca, daha düşük oranlarda bulunan alanin gibi amino asitler de kolajenin yapısal desteğini güçlendirir. Kolajen zincirlerinde en yaygın olarak gözlenen tekrar eden yapılar "Gly-Pro-X" ve "Gly-X-Hyp" dizileridir; burada "X" herhangi bir amino asidi temsil eder. Bu özel amino asit düzeni, kolajenin kendine özgü üçlü sarmal yapısının oluşumunu ve stabilitesini belirler [264].



Şekil 4.37. Sünger kolajenine (SK) ait LC-MS kromatogramı; LC Koşullar: Kolon: C18 ters faz kolonu (Reverse-Phase, RP-C18); Mobil Faz: A fazı: Su + %0,1 formik asit B fazı: Asetonitril (ACN) + %0,1 formik asit. Akış Hızı: 0,5 mL/dk.

Şekil 4.37'de sunulan kromatogramda, kolajen örneklerinden elde edilen amino asit ve kısa peptit profilleri, tanımlanmış m/z değerleriyle birlikte gösterilmektedir. Çıkış zamanlarına göre sıralanan pikler sırasıyla glisin, alanin, prolin, hidroksiprolin, Pro-Hyp, Ala-Gly-Pro ve Gly-Pro-Hyp bileşenlerine karşılık gelmektedir. Bu bileşenlerin tespiti, kolajenin karakteristik yapısını ve stabilitesini değerlendirmek açısından oldukça önemlidir. Literatürde de belirtildiği üzere, kolajenin üçlü sarmal yapısının stabilizasyonu büyük ölçüde glisin, prolin ve hidroksiprolin oranlarına bağlıdır [265]. Ayrıca, hidroksiprolin ve prolin düzeylerinin kolajenin termal kararlılığı üzerinde belirleyici etkisi olduğu; Gly-Pro gibi dipeptitlerin ise kolajen yıkımı veya modifikasyon süreçlerinde rol oynadığı bildirilmektedir [266].

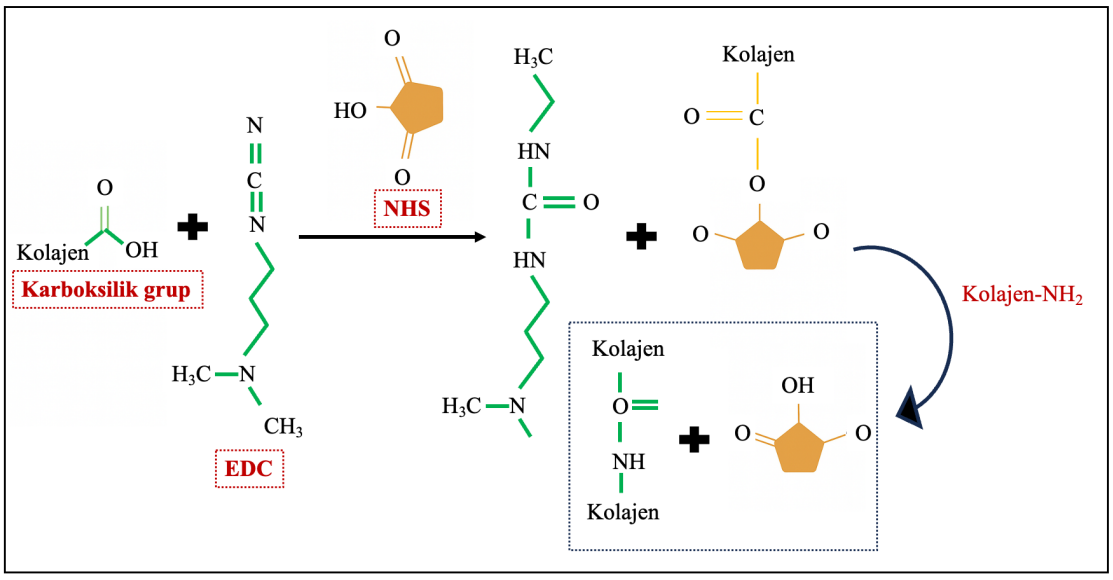
Sonuç olarak kromotogram bulguları, izole edilen kolajenin amino asit ve peptit bileşimi açısından hem yapısal özgünlüğünü hem de biyofonksiyonel bütünlüğünü büyük ölçüde koruduğunu göstermekter. Özellikle hidroksiprolin ve prolin varlığı, bu kolajenin doku mühendisliği ve biyomedikal uygulamalar açısından umut vadeden bir biyomalzeme olduğunu desteklemektedir.

4.7. Kolajen Hidrojellerin Üretimi ve Karakterizasyon Çalışmaları

4.7.1. Hidrojellerin Üretimi

Tez çalışmasının bu bölümünde *Sarcotragus foetidus* süngerinden izole edilen kolajenden kararlı yapıda hidrojeller elde etmek amacıyla çapraz bağlama koşulları araştırılmıştır. Bu kapsamda, hidrojel oluşumunu sağlamak için kolajen ve EDC konsantrasyonları ile EDC/NHS molar oranları farklı değerlerde değiştirilerek optimize edilmiştir. Çalışmada kullanılan bu parametreler ve elde edilen sonuçlar **Çizelge 4.5**'te sunulmaktadır.

Kolajenin EDC/NHS ile çapraz bağlanması, "karbodiimid kimyası" olarak bilinen bir reaksiyon mekanizmasıyla gerçekleşmektedir. Bu mekanizmada EDC, karbodiimid çapraz bağlayıcı ajan olarak görev yaparken; NHS, ara ürün stabilizatörü olarak rol alır. İlk aşamada, EDC aracılığıyla kolajenin karboksil grupları aktif hale getirilir. NHS ilavesiyle, oluşan kararsız ara ürünler daha stabil NHS esterlerine dönüştürülür. Kolajenin yapısındaki serbest amin grupları ($–NH_2$) ise bu NHS esterlerine nükleofilik saldırıda bulunur ve stabil amid bağlarının oluşmasına katkı sağlar. Böylece, kolajen molekülleri arasında kovalent çapraz bağlar meydana gelir. Bu ayrıntılı reaksiyon mekanizması **Şekil 4.38**'de şematize edilmiştir.



Şekil 4.38. Kolajenin EDC/NHS ile çapraz bağlanması sırasında gerçekleşen reaksiyonun mekanizması.

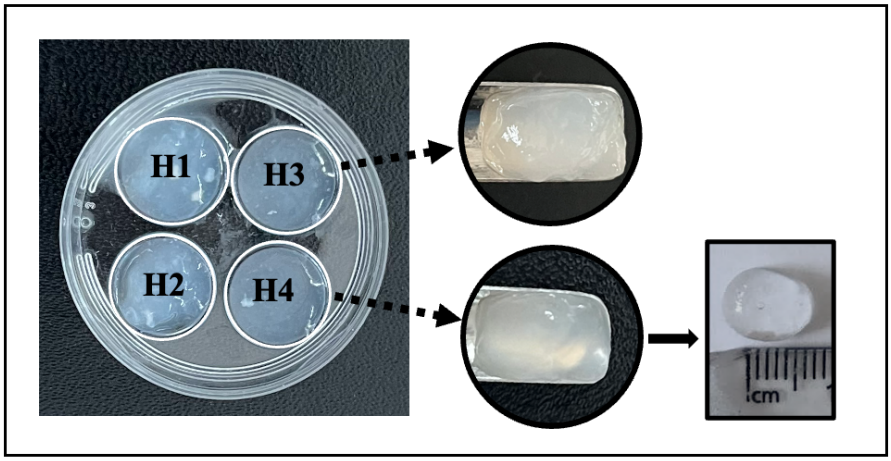
Çizelge 4.5. Kolajen hidrojelleri oluşturmak için çalışılan proses değişkenleri.

Kolajen konsatrasyonu (mg/mL)	EDC konsantrasyonu (% k/h)	EDC/NHS oranı (mol:mol)	Hidrojel oluşumu ve stabilitesi
5	1	1:1	Hidrojel oluşmadı
5	1	5:1	Hidrojel oluşmadı
5	5	1:1	Hidrojel oluşmadı
5	5	5:1	Hidrojel oluşmadı
10	1	1:1	Hidrojel oluşmadı
10	1	5:1	Hidrojel oluşmadı
10	5	1:1	Hidrojel oluşmadı
10	5	5:1	Hidrojel oluştu. PBS'de 37°C'de 1 günde bozundu
20	1	1:1	Hidrojel oluşmadı
20	1	5:1	Hidrojel oluştu. PBS'de 37°C'de 1 günde bozundu
20	5	1:1	Hidrojel oluştu. PBS'de 37°C'de 1 günde bozundu
***20**	**5**	**5:1**	**Kararlı yapıda hidrojeller elde edildi**

**: optimum proses değişkenleri*

Çizelge 4.5 incelendiğinde, dört formülasyonda hidrojel oluşumu gözlemlenmiştir. Ancak bu formülasyonlardan üçünde, hidrojelin 1 gün içerisinde bozunarak stabil kalmadığı belirlenmiştir. Oluşan hidrojelere ait mikroskobik kamera görüntüleri **Şekil 4.39**'da sunulmuştur. Hidrojel oluşumunun, kolajen konsantrasyonu ile doğru orantılı olduğu görülmektedir. Yüksek kolajen konsantrasyonu, kolajen zincirleri arasındaki temas noktalarını artırmakta ve bu da çapraz bağlanmayı hem tetiklemekte hem de güçlendirmektedir. Öte yandan, EDC konsantrasyonu ile çapraz bağlanma oranı arasında da doğrusal bir ilişki olduğu gözlemlenmiştir. EDC konsantrasyonunun artması, kolajende daha fazla karboksil grubunun aktive edilmesini sağlamakta ve böylece çapraz bağlanma oranını yükseltmektedir. Bu durum, yapının stabilitesini güçlendirerek hidrojelin dayanıklılığını artırır. Ancak, EDC konsantrasyonunun aşırı yüksek olması, yapının kırılgan hale gelmesine de yol açabilmektedir.

a)



b)

Hidrojel	% Kolajen (mg/mL)	% EDC (k/h)	EDC/NHS (mol:mol)
H1	10	5	5:1
H2	20	1	5:1
H3	20	5	1:1
H4	20	5	5:1

Şekil 4.39. a) 35 mm çapındaki 4 bölmeli hücre kültürü Petri kabının her bir bölmesine 100 µL hidrojel çözeltisi uygulanarak EDC/NHS ile çapraz bağlanan hidrojellere ait makroskobik kamera görüntüleri, b) fomülasyonların içerikleri.

Literatürde genellikle kullanılan EDC konsantrasyonu yaklaşık %1 (k/h veya h/h) düzeyindedir [267-269]. Bununla birlikte, daha yüksek konsantrasyonların sitotoksik etkilere yol açabileceği bildirilmiştir [270]. Bu nedenle, başlangıç aşamasında %1 (k/h) EDC konsantrasyonu kullanılarak çalışmalar gerçekleştirilmiştir. Ancak bu EDC konsantrasyonunda, düşük kolajen konsantrasyonlarında hidrojel oluşmamıştır. Sadece 20 mg/mL kolajen içeren örnekte hidrojel oluşumu gözlenmiş, ancak bu yapı 1 gün içerisinde bozunmuştur. Literatürde Salthouse ve ark.nın (2024) yaptığı çalışma [232] dikkate alınarak, EDC konsantrasyonu %5 (k/h) seviyesine çıkarılmış ve bu çalışmayla benzer şekilde, bu konsantrasyonun hidrojel oluşumu için optimum değer olduğu belirlenmiştir. Kullanılan EDC ve NHS oranı da çapraz bağlanma sürecinde önemli bir parametre olup, optimize edilmesi gerekmektedir. Çapraz bağlanma reaksiyonunda NHS ilavesi, EDC aracılığıyla kolajenin karboksil gruplarında oluşan ara ürünleri stabilize eder. NHS konsantrasyonunun düşük olması durumunda, ara ürün hızla hidrolize olur ve reaksiyon verimi düşerek çapraz bağlanma gerçekleşmeyebilir. Bu nedenle, optimum NHS konsantrasyonunda çalışmak büyük önem taşımaktadır. Literatürde, EDC/NHS

oranının genellikle 1:1 ile 5:1 arasında değiştiği rapor edilmiştir [232]. Bu literatür verileri dikkate alınarak, tez çalışmasında EDC/NHS oranı 1:1 ve 5:1 olarak seçilmiştir. Sonuçlar, özellikle 5:1 oranında hidrojel oluşum potansiyelinin arttığını ve bu bulgunun literatürdeki verilerle uyumlu olduğunu ortaya koymuştur.

Kolajenin EDC/NHS ile çapraz bağlanmasında sıcaklık ve pH da önemli parametrelerdir. EDC/NHS aracılı çapraz bağlanma reaksiyonu, düşük pH ortamında gerçekleşirse kolajenin amin grupları protonlanacağı için amid bağı oluşumu zorlaşır. Öte yandan, yüksek pH değerlerinde reaktif ara ürünler hızla hidrolize olacağından amid bağlarının oluşumu engellenir. Bu nedenle, literatürde de önerildiği gibi [232] pH 6 koşullarında ve oda sıcaklığında deneyler yürütülmüştür. Oluşan hidrojellerin jelleşme süreleri incelendiğinde, sürelerin 2-4 saat arasında değiştiği görülmüştür. **Çizelge 4.6** incelendiğinde, kolajen ve EDC konsantrasyonlarının artmasıyla birlikte jelleşme süresinin azaldığı gözlemlenmiştir. Öte yandan, EDC/NHS oranının ise jelleşme süresi üzerinde belirgin bir etkisi olmadığı belirlenmiştir.

Çizelge 4.6. Kolajen hidrojellerin jelleşme süreleri.

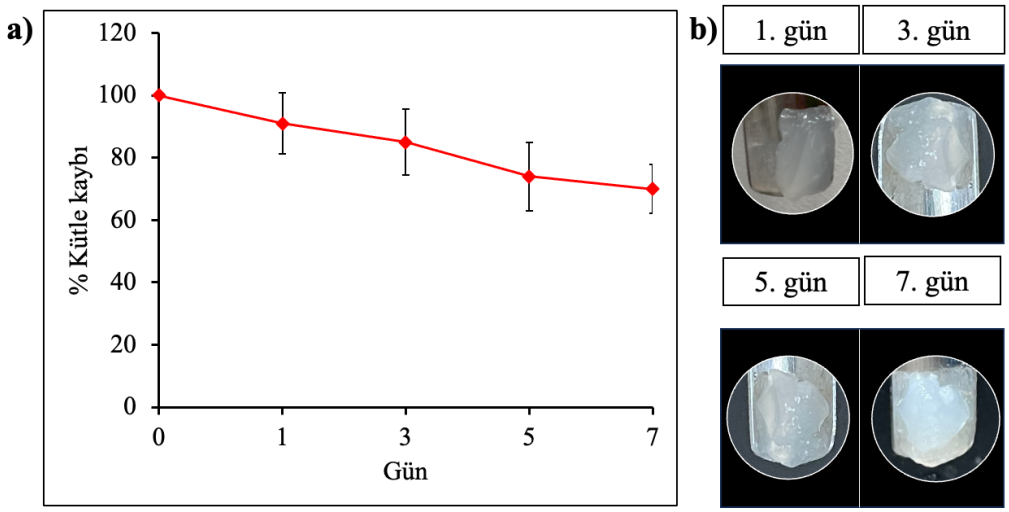
Hidrojel	Kolajen konsatrasyonu (mg/mL)	EDC konsantrasyonu (% k/h)	EDC/NHS oranı (mol:mol)	Zaman (saat)
H1	10	5	5:1	4
H2	20	1	5:1	3
H3	20	5	1:1	2
***H4**	**20**	**5**	**5:1**	**2**

**: optimum proses değişkenlerinin kullanıldığı formülasyon*

4.7.2. Hidrojellerin Karakterizasyonu

Çalışmanın bu bölümünde kararlı yapıda hidrojellerin elde edildiği H4 formülasyonuyla üretilen hidrojeller kullanılarak karakterizasyon çalışmaları gerçekleştirilmiştir. İlk olarak, kolajen hidrojellerin biyobozunurluk profillerini değerlendirmek amacıyla, 7 gün boyunca 37 °C'de PBS tamponu içinde deneyler yürütülmüştür. Hidrolitik bozunma, kimyasal olarak kararsız bağların kopması sonucu meydana gelir. H4 grubu hidrojele ait

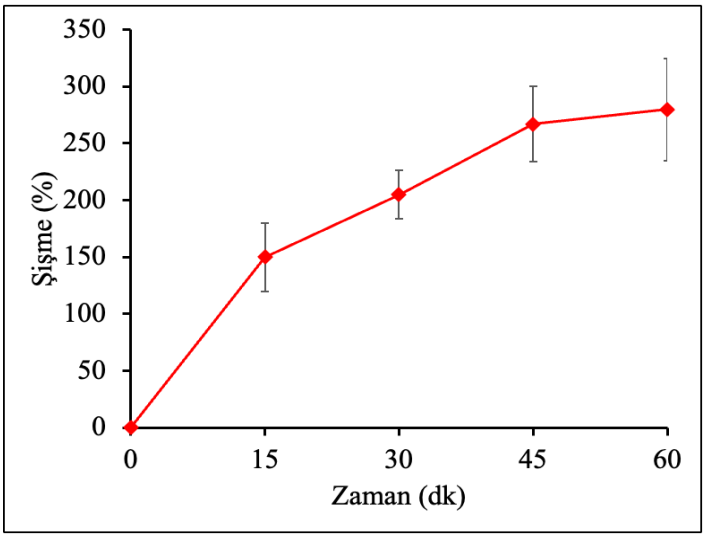
7 gün süresince % kütle kayıplarını gösteren grafik **Şekil 4.40.a**'da sunulmaktadır. Ayrıca, 1., 3., 5. ve 7. gün sonunda elde edilen hidrojel görüntüleri ise **Şekil 4.40.b**'de verilmiştir.



Şekil 4.40. a) H4 formülasyonu ile üretilmiş ve EDC/NHS ile çapraz bağlanmış hidrojellerin 7 gün süresince hidrolitik ortamdaki bozunma profilini gösteren grafik (n=3), b) hidrojelin 1., 3., 5. ve 7. gün makroskobik kamera görüntüleri.

Şekil 4.40 incelendiğinde, H4 formülasyonu ile üretilen kararlı yapıdaki hidrojelin birinci günde ~%10'unun, üçüncü günde ~%15'inin, beşinci günde ~%25'inin ve yedinci günde ise ~%30'unun bozunduğu görülmektedir. Bu sonuçlar, hidrojelin kontrollü ve yavaş bir bozunma profili sergilediğini ortaya koymaktadır. H4 hidrojeli, %5 (k/h) EDC konsantrasyonu kullanılarak ve EDC/NHS oranı 5:1 olacak şekilde çapraz bağlanmıştır. Bu çapraz bağlanma sayesinde, H4 hidrojeli yapısında kovalent çapraz bağlar barındırmaktadır. Bu durum, hidrojelin daha yavaş bozunmasına neden olmaktadır. Kolajenin çapraz bağlanma derecesine bağlı olarak farklı hızlarda bozunabileceği bilinmektedir. Salthouse ve ark. (2024) [232] yaptığı bir çalışmada, EDC konsantrasyonunun hidrojel stabilitesine etkisi araştırılmıştır. Yüzde 1 (h/h) EDC konsantrasyonu kullanıldığında hidrojellerin hızla bozunduğu ve 3. günde %75'e varan kütle kaybı gösterdiği bulunmuştur. EDC konsantrasyonu %5 (h/h)'e çıkarıldığında ise, hidrojellerin stabilitesi belirgin şekilde arttığı ve %50'den az kütle kaybı gözlenmiştir. Bu sonuçlar, daha yüksek EDC konsantrasyonlarının hidrojel stabilitesini artırabileceğini göstermekte olup bizim sonuçlarımız ile uyumludur.

Hidrojellerin su veya tampon çözeltiyi absorbe etme özelliği “su tutma” ya da “şişme” olarak bilinir ve bu özellik, hidrojel karakterizasyonunda kritik bir role sahiptir. Şişme olayı, hidrojel yapısındaki hidrofilik grupların suyla etkileşmesi sonucu meydana gelir. H4 grubu hidrojellerin fizyolojik koşullarda su tutma kapasiteleri gravimetrik yöntemle belirlenmiş ve elde edilen grafik **Şekil 4.41**’de sunulmuştur.



Şekil 4.41. H4 formülasyonu ile üretilmiş ve EDC/NHS ile çapraz bağlanmış hidrojellerin su alım kapasitesi (% şişme değerleri).

Elde edilen veriler doğrultusunda, H4 grubu hidrojelin yaklaşık 60. dakikada denge şişmeye ulaştığı belirlenmiştir. Hidrojellerin 1 saatlik süre zarfındaki şişme oranları; 15. dakikada %150±30, 30. dakikada %205±21, 45. dakikada %267±33 ve 60. dakikada %280±45 olarak ölçülmüştür. Biyobozunurluk sonuçlarıyla paralel olarak, hidrojeller zamanla su alarak şişmiş, bu sürecin devamında ise hidrolitik bozunmaya uğrayarak kütle kaybetmiştir. Sionkowska ve ark’nın yaptığı çalışmada (2024) [271], kolajen örneklerinin şişme kapasitelerinin analiz başlangıcından itibaren yaklaşık iki saat içinde maksimum seviyeye ulaştığı belirlenmiştir. Saf kolajen filminin %889 oranında şiştiği tespit edilmiş, EDC/NHS ile çapraz bağlanan örneklerin ise daha düşük şişme kapasitesine sahip olduğu ifade edilmiştir. Tez çalışması kapsamında üretilen H4 grubu hidrojeller de bu bulgularla uyumlu bir şişme profili sergilemiştir; yaklaşık 1 sa içerisinde dengeye ulaştığı ve yaklaşık %250 oranında ağırlık artışı gösterdiği gözlemlenmiştir.

Sonuç olarak, bu tez çalışmasında *Sarcotragus foetidus* süngerinden yüksek verimle ve yüksek saflıkta kolajen izole edilmiş; yapılan amino asit profili ve proteomik analizler sonucunda, izole edilen kolajenin memeli tip I kolajene benzer özellikler taşıdığı doğrulanmıştır. Ayrıca, farklı çapraz bağlama prosesleri optimize edilerek elde edilen kolajen hidrojellerin karakterizasyonu gerçekleştirilmiş ve bu hidrojellerin yumuşak doku mühendisliği uygulamaları için umut vadeden biyomalzemeler olduğu ortaya konmuştur.

KISIM III

Glioblastoma, yüksek invazivlik ve düşük hayatta kalma oranıyla bilinen, IV. derece difüz gliomadır. Merkezi sinir sistemindeki tümörlerin yaklaşık %15'ini, malign tümörlerin yaklaşık %50'sini ve gliomaların ise yaklaşık %60'ını oluşturur. Glioblastoma hastalarında ortalama yaşam süresi 12-15 ay iken 5 yıllık sağkalım oranı ise yalnızca %7'dir. Glioblastoma ciddi nörolojik, psikolojik ve yaşam kalitesi sorunlarına yol açmakta ve tedavisi, hastaya özel planlanan ve cerrahi, radyasyon ve kemoterapiyi içeren multidisipliner bir yaklaşımı gerektirmektedir.

Tez çalışmasının bu bölümünde, standart kemoterapiye destek olarak gallik asit (GA) yüklü ilaç taşıyıcı nanopartikül temelli 3B doku iskelesi sistemlerinin geliştirilmesi ve bunların lokal glioblastoma tedavisinde potansiyel kullanımının incelenmesi hedeflenmiştir. Bu amaç doğrultusunda, ilk olarak emülsiyon hazırlama-çözücü buharlaştırma yöntemi kullanılarak GA yüklü PBAT nanopartikülleri üretilmiştir. Ardından, bu nanopartiküller ONM ile kaplanmış ve kapsamlı fiziksel, kimyasal ve termal analizlerle karakterize edilmiştir. Ayrıca, geliştirilen GA-ONM-PBAT nanopartiküllerinin T98G insan glioblastoma hücre hattı kullanılarak *in vitro* hücre kültürü çalışmaları yapılmış; bu sayede hücre canlılığı ve antitümör mekanizmaları değerlendirilmiştir. ONM kaplamasının, GA'nın kontrollü salımını destekleyerek antikanser etkisini maksimize edeceği hipotezi ortaya konmuş; ayrıca, GA-ONM-PBAT nanopartikülleri *Sarcotragus foetidus* sponjin iskelelere yüklenerek glioblastoma tedavisinde lokal olarak kullanılabilecek bir sistem geliştirilmiştir.

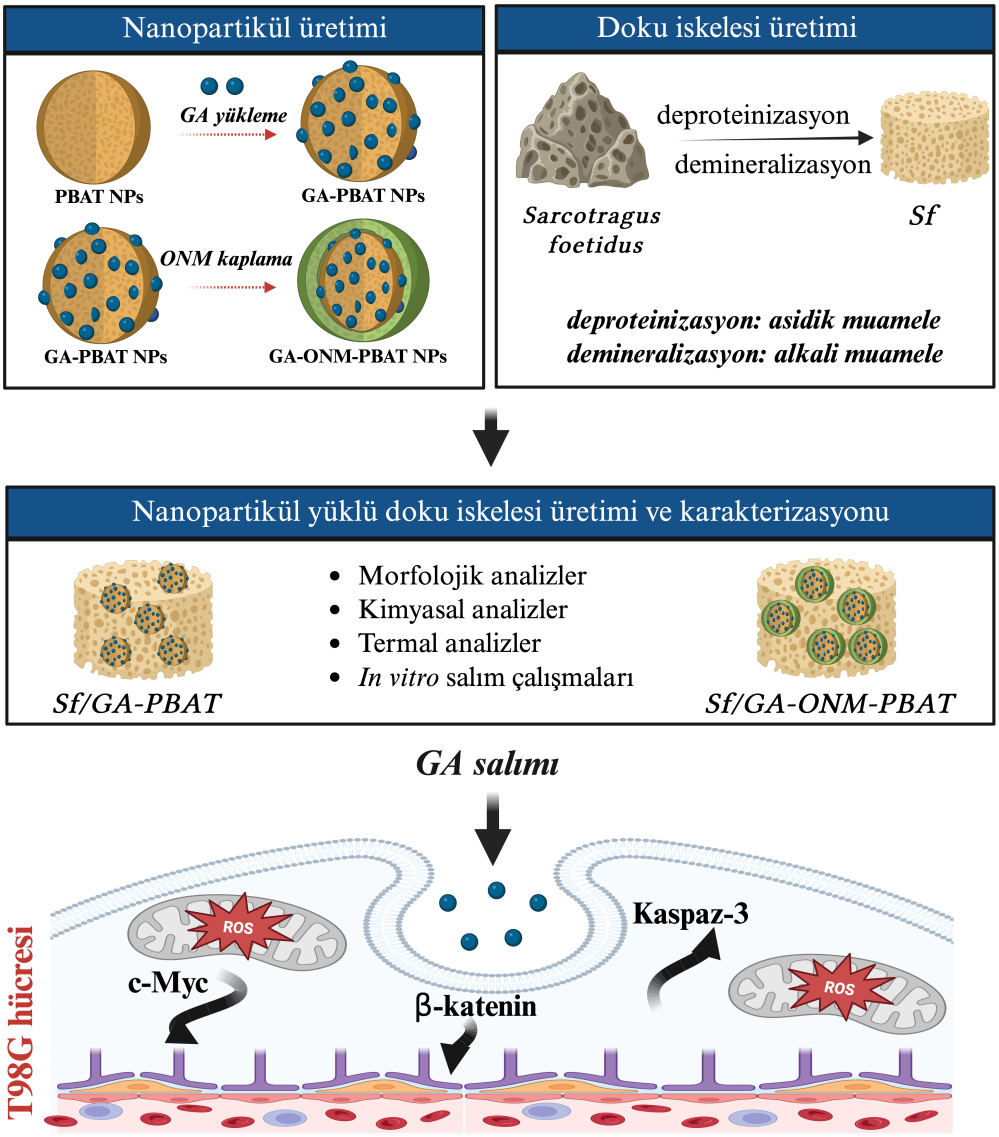
Bu çalışma ONM'yi nanopartikül kaplama materyali olarak ilk kez kullanmakta ve GA ile etkileşimini partikül sistemi içerisinde inceleyerek glioblastoma tedavisine yönelik yenilikçi bir yaklaşım sunmaktadır. Ayrıca, çalışma kapsamında GA yüklü PBAT

nanopartikülleri de ilk kez sentezlenmiştir. Bunun yanı sıra, *Sarcotragus foetidus* süngerlerinin ilaç taşıyıcı sistem olarak yumuşak doku mühendisliğinde ilk kez kullanılması, çalışmanın özgünlüğünü ve bilimsel katkısını vurgulamaktadır.

Tez çalışmasının bu bölümündeki ana aşamalar aşağıdaki şekilde özetlenebilir:

1. PBAT nanopartiküllerinin üretimi ve karakterizasyonu,
2. PBAT nanopartiküllere GA yüklenmesi,
3. *Opuntia ficus indica* müsilajının (ONM) izolasyonu ve karakterizasyonu,
4. *Sarcotragus foetidus* süngerinden doku iskelesi üretimi,
5. GA yüklü ve ONM kaplı PBAT taşıyıcı sistemlerin (GA-ONM-PBAT NPs) hazırlanması ve fiziksel, kimyasal, termal özelliklerinin incelenmesi,
6. Bu nanopartiküllerin *Sarcotragus foetidus* doku iskelesine yüklenmesi (Sf/GA-ONM-PBAT) ve karakterize edilmesi,
7. GA'nın *in vitro* salım davranışının analiz edilmesi,
8. *İn vitro* hücre kültürü deneyleriyle biyolojik etkilerin ve antikanser mekanizmalarının araştırılması.

Bu bölümde gerçekleştirilen çalışmaların bulguları ve tartışmaları ayrıntılı bir şekilde sunulmuş; ayrıca, bu çalışmaların genel akış süreci **Şekil 4.42**'de şematik olarak özetlenmiştir.



Şekil 4.42. Tez çalışmasının üçüncü kısmına ait akış şeması (BioRender.com ile oluşturulmuştur; https://BioRender.com).

4.8. Boş PBAT Nanopartiküllerin Üretimi

Çalışmanın bu bölümünde, GA'nın kontrollü salımı için partiküler ilaç taşıyıcı sistemler geliştirilmiştir. Bu amaçla, ilk olarak emülsiyon hazırlama-çözücü buharlaştırma yöntemi ile PBAT nanopartikülleri üretilmiştir. Bu yöntemde, polimer konsantrasyonu, emülgatörün tipi ve konsantrasyonu, karıştırma hızı ve süresi partikül boyutunu etkileyen önemli parametrelerdir. Ön çalışmalara dayanarak, karıştırma hızı ve süresi sırasıyla 24 000 rpm ve 10 dk'da sabit tutulmuş; polimer konsantrasyonu, emülgatör konsantrasyonu ve organik (o) / sulu (w) faz oranları gibi parametreler değiştirilmiştir (**Çizelge 4.7**). Farklı

formülasyonlar kullanılarak üretilen boş PBAT nanopartiküllerinin ortalama çap değerleri **Çizelge 4.7**'de ve SEM görüntüleri ise **Şekil 4.43**'te verilmiştir.

Çizelge 4.7. Emülsiyon hazırlama-çözücü buharlaştırma yöntemi ile üretilen boş PBAT nanopartiküllere ait formülasyonlar ve ortalama çap değerleri.

Formülasyonlar	PBAT (% k/h)	DMAB (% k/h)	o/w oranı (h/h)	Ortalama çap (nm)
F1	0,5	0,1	1:4	303 ± 51
F2	0,5	0,1	1:2	295 ± 80
F3	1,0	0,1	1:4	388 ± 74
F4	1,0	0,1	1:2	370 ± 55
F5	2,5	0,1	1:4	570 ± 105
F6	2,5	0,1	1:2	533 ± 101
F7*	**0,5**	**1,0**	**1:4**	**171 ± 40**

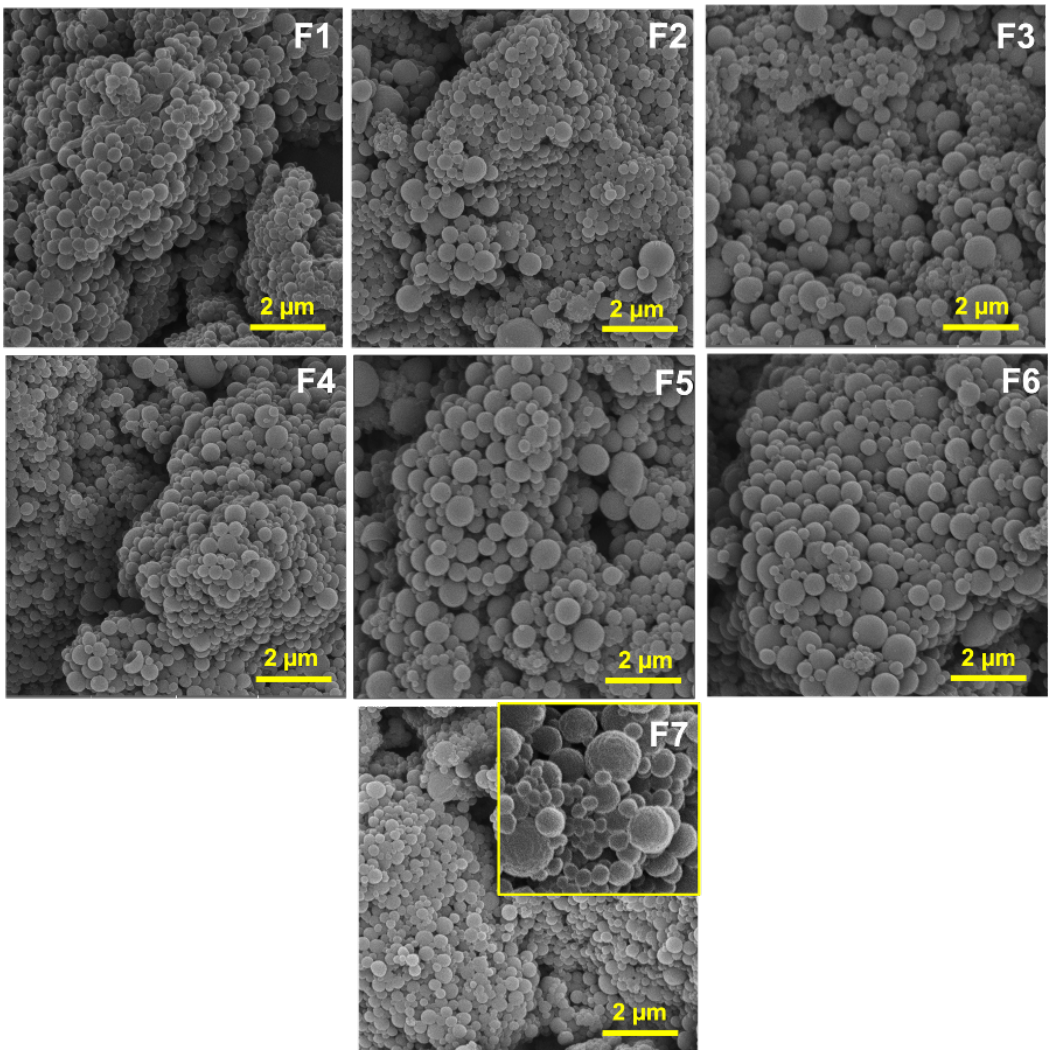
Homojenizasyon hızı: 24 000 rpm; süresi: 10 dk.
** : Seçilen formülasyon (F7) koyu olarak belirtilmiştir.*

Tez çalışmasında ilk altı formülasyonda (**Çizelge 4.7**), DMAB oranı %0,1 (k/h)'de sabit tutulurken, PBAT konsantrasyonu optimize edilmiştir. Bu süreçte en küçük partikül çapının %0,5 (k/h) PBAT konsantrasyonunda elde edildiği görülmüştür. Ayrıca, DMAB konsantrasyonunun dört katına çıkarılmasının partikül çapını yaklaşık %40 oranında küçülttüğü literatürde rapor edilmiştir [272]. Bu bulgulardan yola çıkılarak, PBAT konsantrasyonu %0,5'e sabitlenmiş ve F7 formülasyonunda DMAB oranı %0,1'den %1'e yükseltilmiştir.

PBAT konsantrasyonunun %2,5'ten %0,5'e düşürülmesi partikül boyutunda anlamlı bir azalışa neden olmuştur. Mainardes ve ark. (2005) [273] yaptığı çalışmada farklı miktarlarda PLGA (12,5 mg, 25 mg, 50 mg) içeren nanopartiküller hazırlanmış ve 243 ± 12 nm ile en küçük partikül boyutu en düşük konsantrasyonda PLGA içeren formülasyonda elde edilmiştir. Oganik fazdaki polimer miktarının azalması organik fazın vizkositesini azaltmıştır. Vizkosite azaldıkça emülsiyon damlacıklarının boyutu azalmış, dolayısıyla çok daha küçük boyuta sahip partiküller elde edilmiştir. Ayrıca, emülsiyondaki su fazı hacminin azalması, nano damlacıkların oluşumunda kayma

kuvvetlerine karşı düşük viskoz direnç yaratmış ve dolayısıyla daha küçük nano parçacıklar elde edilmiştir [274].

Emülgatör seçiminin partikül boyutu üzerinde etkili olduğu bilinmektedir. Çalışmada emülgatör olarak kullanılan DMAB çift kuyruklu katyonik bir yüzey aktif madde olduğundan düşük kritik misel konsantrasyonuna sahiptir. Bu nedenle çok düşük konsantrasyonlarda bile bir araya gelerek misel oluşturabilmektedir. Bu durum da misel yapıları arasındaki ara yüzey gerilimini azaltarak daha küçük boyutta partiküllerin üretimine olanak sağlamaktadır [246]. Emülgatör miktarı da nanopartikülün özelliklerini etkileyen önemli parametrelerdendir. Eğer emülgatör konsantrasyonu çok düşük ise polimer damlacıklarının agregasyonu meydana gelir.



Şekil 4.43. Farklı formülasyonlara (F1-F7) ait boş PBAT nanopartiküllerin SEM görüntüleri.

F7 formülasyonu ile üretilen nanopartiküller, 200 nm'nin altında bir çap değerine sahip olup, bu özelliğiyle formülasyonlar arasında en küçük partikül boyutuna ulaşmıştır. Literatürde, 200 nm'den küçük nanopartiküllerin kan-beyin bariyerini (BBB) geçebildiği ifade edilmektedir [275]. Her ne kadar bu çalışmada geliştirilen nanopartiküller lokal uygulama için tasarlanmış olsa da, partikül boyutları nedeniyle F7 formülasyonu en uygun aday olarak belirlenmiş ve BBB hedefli çalışmalar için de potansiyel taşıdığı desteklenmiştir. Bu nedenle, hem GA yüklü hem de GA içermeyen nanopartiküllerin üretimini içeren sonraki deneyler, F7 formülasyonu kullanılarak gerçekleştirilmiştir.

Şekil 4.43 incelendiğinde, tüm formülasyonlar için nanopartiküllerin homojen dağılmış ve küresel formda olduğu, ancak partikül yüzeyinde delikli ve pürüzlü yapıların oluştuğu görülmektedir. Nanopartiküllerde gözlemlenen pürüzlü ve düzensiz yüzey morfolojisi, yarı kristalin bir polimer olan PBAT'ın tipik davranışını desteklemektedir. PBAT'ın yaklaşık %24 kristal özellik sergilediği bilinmektedir [276] ve bu tür yarı kristalin polimerler, kristalleşmenin tetiklediği hızlı faz geçişleri nedeniyle genellikle düzensiz yüzeyler oluşturur [46]. PBAT polimeri daha önce Brunner ve arkadaşlarının yaptığı bir çalışmada ilaç salım sistemleri için kullanılmıştır Bu çalışmada bizim sonuçlarımızı destekleyecek görüntüler elde edilmiş ve retinoik asit yüklü 1% (k/h) PBAT konsantrasyonu ile hazırlanmış mikropartiküllerin açık gözenekli ve pürüzlü bir morfolojik yapıya sahip olduğu rapor edilmiştir [191].

4.9. GA Yüklü PBAT Nanopartiküllerin Üretimi ve Optimizasyonu

Optimizasyon işlemi RSM'de 2 faktörlü ve 2 seviyeli Central Composite Design (CCD) deseni ile gerçekleştirilmiştir. Optimize edilecek iki faktör kütlece GA/PBAT oranı ve sulu faz içerisindeki GA miktarı (k/h) olarak belirlenirken, iki seviye ise bu faktörlere ilişkin en yüksek ve en düşük değerlerdir. Bu değerler **Çizelge 4.8**'de özetlenmiştir.

Çizelge 4.8. RSM'de kullanılan parametreler, CCD için bağımsız değişkenler ve seviyeleri

Faktör	İsim	Birim	Minimum	Maksimum
A	$m_{GA/PBAT}$	% (k/k)	5	20
B	Sulu faz içerisindeki GA	% (k/h)	0,1	0,2

RSM için oluşturulan iki faktöre ait sınır uzay verileri Design-Expert programına girilmiş ve program tarafından oluşturulan deneme seti ve deney sonuçları ise **Çizelge 4.9**'da verilmiştir. Sistem yanıtı olan nanopartikül çapı, her bir deneme setindeki örneklerin SEM analiziyle elde edilen görüntülerinden ImageJ programı kullanılarak bulunmuştur. Bir diğer sistem yanıtı olan enkapsülasyon verimi ise **Bölüm 3.18.5'te** detaylı olarak anlatılan yöntemle hesaplanmıştır.

Çizelge 4.9. Optimizasyon çalışmaları, sistem yanıtları ve nanopartiküllere yüklenen GA miktarı.

Set	Faktör A: $m_{GA/PBAT}$ (% k/k)	Faktör B: sulu faz içerisindeki GA (% k/h)	Ortalama çap, D (nm)	Yüklenen miktar (µg GA/mg partikül)	Enkapsülasyon verimi, EE (%)
1	1,9	0,15	175 ± 52	72,3 ± 5,4	89,2 ± 3,7
2	5,0	0,20	179 ± 58	74,4 ± 7,1	88,1 ± 5,9
3	5,0	0,10	182 ± 64	78,6 ± 9,2	86,6 ± 7,2
4	12,5	0,15	223 ± 80	80,3 ± 4,7	82,3 ± 4,5
5	12,5	0,15	225 ± 88	82,9 ± 6,9	81,5 ± 6,3
6	12,5	0,15	221 ± 81	83,7 ± 6,1	79,5 ± 5,8
7	12,5	0,22	197 ± 72	81,7 ± 8,3	85,4 ± 4,8
8	12,5	0,15	224 ± 79	83,6 ± 3,9	80,8 ± 4,2
9	12,5	0,15	225 ± 62	83,1 ± 8,5	81,2 ± 5,3
10	12,5	0,08	248 ± 53	84,7 ± 4,9	78,0 ± 2,9
11	20,0	0,1	305 ± 61	86,1 ± 5,6	69,3 ± 3,1
12	20,0	0,2	291 ± 68	85,2 ± 7,9	75,1 ± 4,3
13	23,1	0,15	308 ± 56	87,5 ± 7,0	62,3 ± 5,6

Her bir deneme seti için bulunan sistem yanıtları (ortalama nanopartikül çapı ve enkapsülasyon verimi) tekrar programa girilerek nanopartikül üretim sistemi modellenmiştir. CCD desenine uygun nanopartikül çapı ve enkapsülasyon verimi için ikinci dereceden polinomik denklemli (quadratic model) 2 ayrı modelleme gerçekleştirilmiştir. Elde edilen modellerin anlamlılığı ANOVA analizi ile incelenmiştir.

ANOVA analizinde nanopartikül çapı ve enkapsülasyon verimi için modellere ait *p* değerlerinin (*p<0,0001* ve *p=0,0001*, sırasıyla) istatistiksel olarak anlamlı olması nedeniyle oluşturulan modeller geçerlidir. **Çizelge 4.10** ve **11**'de istatistiksel olarak anlamlı tüm parametreler (*) ile işaretlenmiş ve bu parametreleri içeren kodlu ve gerçek denklemler aşağıda verilmiştir.

Nanopartikül çapı optimizasyonu için kodlu değerlerden oluşan model denklem:

$$\mathrm{D\ (nm)} = 223{,}60 + 55{,}03\ \mathrm{A} - 7{,}02\ \mathrm{B} + 3{,}00\ \mathrm{AB} + 12{,}45\ \mathrm{A}^2 + 0{,}45\ B^2 \qquad \text{Eşitlik-14}$$

Nanopartikül çapı optimizasyonu için gerçek değerlerden oluşan model denklem:

$$\mathrm{D\ (nm)} = 206{,}56 + 0{,}60\left(\mathrm{m}_{\frac{\mathrm{GA}}{\mathrm{PBAT}}}\right) - 294{,}31(\text{Sulu faz içerisindeki GA, \%}) + 8{,}00\left(\mathrm{m}_{\frac{\mathrm{GA}}{\mathrm{PBAT}}}\right)(\text{Sulu faz içerisindeki GA, \%}) + 0{,}22\left(\mathrm{m}_{\frac{\mathrm{GA}}{\mathrm{PBAT}}}\right)^2 + 180\ (\text{Sulu faz içerisindeki GA, \%})^2 \qquad \text{Eşitlik-15}$$

Enkapsülasyon verimi optimizasyonu için kodlu değerlerden oluşan model denklem:

$$\mathrm{EE\ (\%)} = 80{,}60 - 8{,}47\ \mathrm{A} - 2{,}36\ \mathrm{B} + 0{,}75\ \mathrm{AB} - 2{,}42\ \mathrm{A}^2 + 0{,}82\ \mathrm{B}^2 \qquad \text{Eşitlik-16}$$

Enkapsülasyon verimi optimizasyonu için gerçek değerlerden oluşan model denklem:

$$\mathrm{EE\ (\%)} = 92{,}07 - 0{,}35\left(\mathrm{m}_{\frac{\mathrm{GA}}{\mathrm{PBAT}}}\right) - 76{,}75\ (\text{Sulu faz içerisindeki GA, \%}) + 2{,}00\left(\mathrm{m}_{\frac{\mathrm{GA}}{\mathrm{PBAT}}}\right)(\text{Sulu faz içerisindeki GA, \%}) - 0{,}04\left(\mathrm{m}_{\frac{\mathrm{GA}}{\mathrm{PBAT}}}\right)^2 + 330\ (\text{Sulu faz içerisindeki GA, \%})^2 \qquad \text{Eşitlik-17}$$

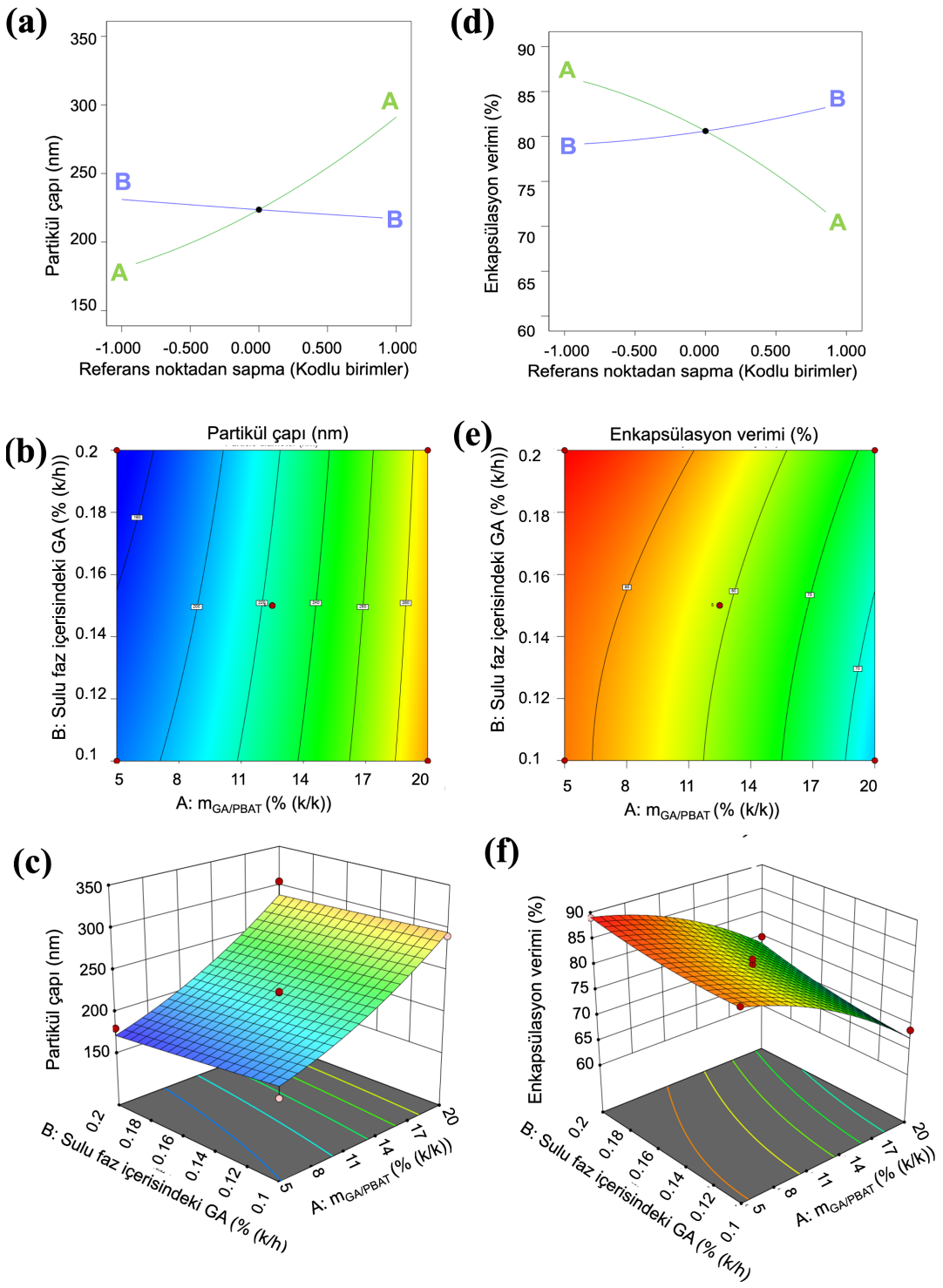
Çizelge 4.10. Ortalama partikül çapına ait ikinci dereceden model için varyans analizi (ANOVA).

	Karelerin toplamı	***df***	**Ortalama kare**	***F*-değeri**	***p*-değeri**	**Önemi**
Model	25743,37	5	15148,67	30,70	0,0001	*
A	24225,59	1	24225,59	144,46	< 0,0001	*
B	393,75	1	393,75	2,35	0,1693	
AB	36,00	1	36,00	0,2147	0,6572	
A^2	1078,28	1	1078,28	6,43	0,0389	*
B^2	1,41	1	1,41	0,0084	0,9295	
Kalan	1173,86	7	167,69			
Uygunsuzluk	1162,66	3	387,55	138,41	0,0002	*
Hata	11,20	4	2,80			

Çizelge 4.11. GA enkapsülasyon verimine ait ikinci dereceden model için varyans analizi (ANOVA).

	Karelerin toplamı	***df***	**Ortalama kare**	***F*-değeri**	***p*-değeri**	**Önemi**
Model	671,11	5	134,22	67,29	< 0,0001	*
A	574,09	1	574,09	287,82	< 0,0001	*
B	44,65	1	44,65	22,39	0,0021	*
AB	2,25	1	2,25	1,13	0,3235	
A^2	40,91	1	40,91	20,51	0,0027	*
B^2	4,73	1	4,73	2,37	0,1673	
Kalan	13,96	7	1,99			
Uygunsuzluk	8,76	3	2,92	2,25	0,2251	
Hata	5,20	4	1,30			

İstatistiksel olarak anlamlı olmayan parametrelerin (**Çizelge 4.10** ve **4.11**) sistem yanıtları üzerinde etkisi olmadığı gözlenmiştir. **Şekil 4.44.a-f**'de nanopartikül çap ve enkapsülasyon verimi değerlerine ait modellerin pertürbasyon, kontur ve 3B yüzey grafikleri yer almaktadır. **Şekil 4.44.a** ve **d**'de verilen pertürbasyon grafiklerinden tasarım parametrelerinin sistem yanıtı üzerindeki etkileri belirlenebilmektedir.

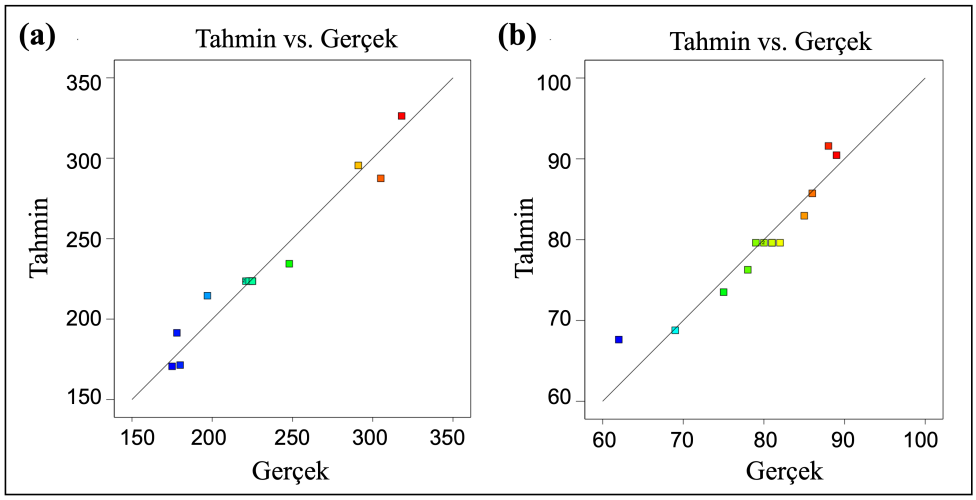


Şekil 4.44. RSM'de kullanılan parametreler ve modelin grafikleri, (a ve d) pertürbasyon çizimleri, (b ve e) kontur çizimleri ve (c ve f) partikül çapı ve enkapsülasyon verimi üzerindeki önemli parametrelerin 3B yüzey çizimleri.

Kütlece GA/PBAT oranının ve GA'nın sulu faz oranının eğri bir fonksiyona sahip olması, bu parametrelerin nanopartikül çapı ve enkapsülasyon verimi üzerinde etkili olduğunu

ifade etmektedir. **Çizelge 4.10** ve **4.11**'te en yüksek F değeri ile en düşük *p* değerine sahip kütlece GA/PBAT oranının partikül çapı ve enkapsülasyon verimi üzerinde en yüksek etkiye sahip olduğu belirlenmiştir. Ayrıca, sulu faz içerisindeki GA miktarının enkapsülasyon verimini partikül çapına göre daha çok etkilediği bulunmuştur. **Şekil 4.44.b** ve **e**'de verilen kontür grafikleri de bu etkiyi doğrulamaktadır. **Şekil 4.44.c** ve **f**'de verilen 3B yüzey grafiklerinin de polinomik bir modeli temsil ettiği belirlenmiştir.

Sistem tarafından modellenen sonuçlar ile deneysel sonuçlar arasındaki farklar **Şekil 4.45**'de verilmiştir. **Şekil 4.45.a** ve **b**'de verilen tahmini ve gerçek değerler arasındaki regresyon grafiklerinde noktaların diyagonal doğruya yakın olduğu görülmüş ve sistem tarafından oluşturulan tahmini değerlerin deneysel sonuçlarla örtüştüğü belirlenmiştir.



Şekil 4.45. Tahmin edilen ve gerçek değerler için tanısal grafikler, (a) partikül çapı (nm) ve (b) enkapsülasyon verimi (%).

Çizelge 4.9 incelendiğinde, GA yüklü nanopartiküllerin, boş nanopartiküllere (F7) kıyasla daha büyük boyutlara sahip olduğu gözlemlenmiştir. İlacın partiküllerin içerisine girmesi veya yüzeyine adsorbe olması partikül boyutunun artmasına neden olmuştur Yükleme sırasında yüzeye adsorbe olan ve nanopartikül içerisine hapsolan ilacın partikül boyutunda artışa neden olduğu literatürde yapılan çalışmalarla gösterilmiştir [277, 278]. Ayrıca, emülsiyondaki GA miktarı arttıkça, nanopartikül başına düşen GA miktarının da arttığı gözlemlenmiş ve bunun sonucunda daha büyük nanopartiküllerin oluştuğu belirlenmiştir. Polimerin sınırlı enkapsülasyon kapasitesi, daha yoğun bir dispers fazın oluşmasına yol açarak partikül boyutunun artmasına katkıda bulunmuş olabilir [279].

Çalışma kapsamında PBAT nanopartiküllere ait GA enkapsülasyon verimleri %62,3 - %89,2 aralığında hesaplanmıştır (**Çizelge 4.9**). Farklı polimerlerle yürütülen çalışmalarda, GA'nın enkapsülasyon veriminin ~%65-90 aralığında olduğu belirtilmiştir [40, 280-282]. Shrivastava ve ark. (2016) [281] yaptıkları çalışmada %66,25 enkapsülasyon verimine sahip GA yüklü Eudragit mikroküreler üretmişlerdir. Başka bir çalışmada GA'nın PLGA nanopartiküllerine %82,9 oranında enkapsüle olduğu belirtilmiştir [282].

Organik fazda GA/PBAT (k/k) oranındaki artış, enkapsülasyon verimini azaltmış, ancak emülsiyondaki GA miktarını artırmıştır; böylece, mg nanopartiküllerin başına µg GA miktarı artmıştır (**Çizelge 4.9**). Organik fazdaki viskozite artışı, büyük emülsiyon damlacıkları oluşturmuştur. Nanopartikül oluşumu sırasında oluşan bu büyük damlacıklar, GA'nın su fazına difüzyonunu hızlandırmıştır. GA arttığında, itici güç (konsantrasyon farkı) de artmış ve bu durum GA'nın su fazına difüzyonunu artırmıştır. Bu durum, farklı polimerler ve ilaçlarla yapılan diğer çalışmalar tarafından da raporlanmıştır [246, 283, 284]. GA su fazına %0,2 (k/h) konsantrasyonda eklendiğinde, PBAT nanopartiküllerinin enkapsülasyon verimi, %0,1 (k/h) GA eklendiği duruma kıyasla yaklaşık 1,5 kat artmıştır (**Çizelge 4.9**). GA hidrofilik bir molekül olduğundan partikül oluşumu sırasında su fazına difüze olma eğilimindedir. Su fazına %0,2 (k/h) GA eklenmesi, partikül üretimi sırasında GA'nın organik fazdan su fazına difüzyonunu kısmen önlemiştir.

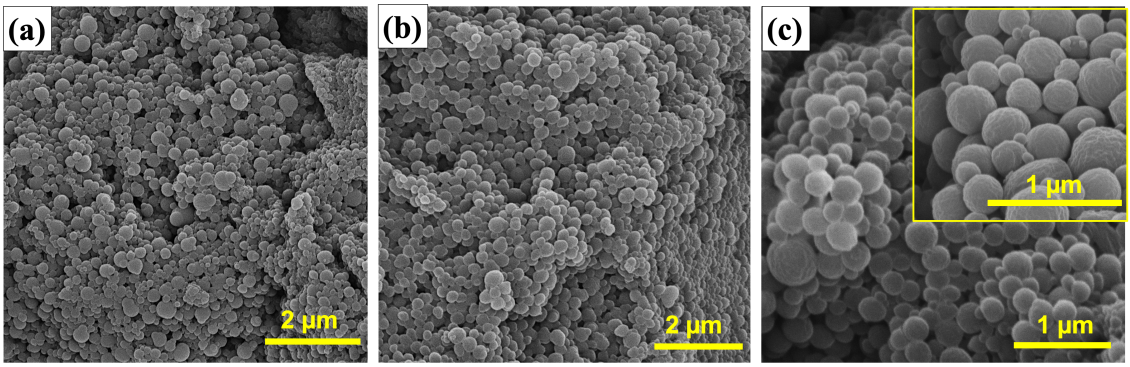
Bu tez çalışmasında, sağlıklı hücreler üzerindeki toksisiteyi en aza indirmek amacıyla, partikül boyutu 190-200 nm aralığında ve en az %80 enkapsülasyon verimine sahip GA yüklü PBAT nanopartikülleri üretmek hedeflenmiştir [246]. Bu amaç doğrultusunda, RSM çalışması sonrasında organik fazdaki GA/PBAT oranı %5 (k/k) olarak belirlenmiş; PBAT konsantrasyonu %0,5 (k/h) ve sulu fazdaki GA konsantrasyonu ise %0,15 (k/h) olarak ayarlanmıştır. DMAB oranı %1 (k/h) seviyesinde sabit tutulmuş; bu koşullarda, 24 000 rpm'de 10 dk süreyle homojenizasyon yapılmıştır. Böylece, modelin güven aralıkları içerisinde istenen optimum kriterleri karşılayan GA yüklü PBAT nanopartikülleri başarıyla elde edilmiştir.

Çalışma kapsamında optimize edilmiş koşullar altında üretilen GA-PBAT nanopartiküller için çap değeri 181 ± 47 nm olarak belirlenmiştir. Van der Waals çekim kuvvetleri ve toplam yüzey veya ara yüzey enerjisini minimize etme eğilimleri nedeniyle, nanoyapılı partiküller genellikle geniş bir yüzey alanına sahip olup, bu durum kümelenme ve aglomerasyona yol açabilmektedir. Tween-80, nanopartiküllerin aglomerasyonunu önlemek ve stabiliteyi artırmak için kullanılan non-iyonik yüzey aktif bir maddedir [285]. Yüzey gerilimini azaltmak ve itici etkileşimleri artırmak amacıyla optimum koşullardaki emülsiyona %0,1 ve %0,5 (h/h) oranlarında Tween-80 eklenmiştir [285]. Tween-80 içeren nanopartiküllerin ortalama çapları sırasıyla %0,1 (h/h) için 185 ± 52 nm ve %0,5 (h/h) için 190 ± 69 nm olarak ölçülmüştür. Bu sonuçlar, Tween-80 eklenmesinin partiküllerin boyutu üzerinde anlamlı bir etkisinin olmadığını göstermektedir. Bu durumun eklenen Tween-80'in emülsiyon içerisindeki oranının düşük olmasından kaynaklandığı düşünülmüştür. Shafie ve ark. (2013) [286] yaptıkları çalışmada betametazon sodyum fosfat yüklü kitosan-aljinat nanopartiküller üretmişler ve farklı Tween-80 konsantrasyonlarının partikül çapı üzerindeki etkisini araştırmışlardır. Yüksek Tween-80 konsantrasyonlarının (% 1 ve 1,5) partiküllerin çapını artırdığını bulmuşlardır. Bu durumun polimer yüzeyine adsorbe olan Tween-80 miktarının artmasına bağlı olarak polimerlerin yüzey gerilimlerinin artmasından kaynaklandığını belirtmişlerdir. Ayrıca, düşük Tween-80 konsantrasyonu (%0,5) durumunda nanopartiküllerin aglomerasyonunun azaldığını ve buna bağlı olarak partikül boyutunun azaldığını bildirmişlerdir.

Tween-80 ilave edilmediği durumda optimize koşullarda üretilen GA-PBAT NP'lerinin enkapsülasyon verimi ve ilaç yükleme değeri sırasıyla %86,9 ± 6,3 ve 89,1 ± 7,1 µg GA/mg partikül olarak hesaplanmıştır. Yüzde 0,1 Tween-80 içeren formülasyonda, enkapsülasyon verimi yaklaşık %86 ve ilaç yükleme kapasitesi ise 88,5 ± 6,25 µg GA/mg partikül olarak belirlenmiştir. Öte yandan, %0,5 Tween-80 içeren formülasyonda ise kapsülleme verimi yaklaşık %87 olurken, ilaç yükleme miktarı 89,7 ± 5,0 µg GA/mg partikül olarak bulunmuştur. Tween-80 ilavesinin enkapsülasyon verimi ve ilaç yüklemesi üzerinde önemli bir etkisi olmadığı gözlemlenmiştir.

Sonuç olarak, partikül boyutunda ve enkapsülasyon veriminde önemli bir değişikliğe neden olmadan aglomerasyonu en aza indiren %0,5 (h/h) Tween-80 içeren

formülasyonun, sonraki çalışmalar için kullanılmasına karar verilmiştir. Bu formülasyon, çalışmanın devamında GA-PBAT NPs olarak adlandırılmış; bu nanopartiküllerin SEM görüntüleri ve özellikleri ise sırasıyla **Şekil 4.46** ve **Çizelge 4.12**'de sunulmuştur.



Şekil 4.46. (a) Emülsiyon hazırlama-çözücü buharlaştırma ile hazırlanan boş PBAT ve (b, c) GA-PBAT nanopartiküllerin farklı büyütmelerdeki SEM görüntüleri.

Çizelge 4.12. PBAT nanopartiküllere ait özellikler.

Nanopartikül (NPs)	Ortalama çap (nm)	GA Enkapsülasyon verimi (%)	Yükleme miktarı (µg GA/mg partikül)
Boş PBAT	171 ± 40	-	-
GA-PBAT	190 ± 69	87,2 ± 6,9	89,7 ± 5,0

4.10. ONM Kaplama ve Stabilite Çalışmaları

Şekil 4.47.a'da ONM'ye ait SEM görüntüleri yer almakta olup, ONM'nin küresel formdan ziyade düzensiz bir yapıda olduğu gözlemlenmiştir. Bu görüntüler, literatürde farklı bitkilerden izole edilen müsilaj örneklerine ait SEM görüntüleriyle benzerlik göstermektedir [287].

GA-PBAT nanopartiküllerin ONM ile kaplanması esnasında nanopartiküllerin ONM ile hangi oranda kullanılması gerektiği, farklı konsantrasyonlarda ONM çözeltileri (1, 5 ve 10 mg/mL) kullanılarak belirlenmiştir. Bütün ONM konsantrasyonlarında kaplama sonrası nanopartiküller yıkanmış ve nanopartikül yüzeyine adsorbe olmamış ONM ortamdan uzaklaştırılmıştır. Yıkama suları toplanarak adsorbe olmamış ONM miktarı belirlenmiş ve kaplama verimi (%) hesaplanmıştır. Artan ONM miktarları ile kaplanma oranı bir miktar artmış ancak bu artışlar istatitisksel olarak anlamlı bulunmamıştır (**Çizelge 4.13**). Ayrıca, kaplı nanopartiküllerin stabilitesini belirlemek için

nanopartiküller 72 sa boyunca PBS (pH 7,4) ortamında ve asetat tamponunda (pH 5,5) inkübe edilmiştir. Kaplama işlemi sırasında 5 mg/mL ONM konsantrasyonu kullanıldığında, pH 7,4'te 72 sa sonra ONM'nin yaklaşık %77'sinin partiküller üzerinde kaldığı (**Çizelge 4.13**), pH 5,5'te ise bu değerin yaklaşık %75 olduğu belirlenmiştir. Asidik ortamda kaplama miktarında hafif bir azalma gözlenmiş olsa da, bu değişiklik istatistiksel olarak anlamlı bulunmamıştır (*p>0,05*). Bu değerler, diğer ONM konsantrasyonlarına kıyasla en yüksek kaplama oranlarını temsil etmekte olup; bu nedenle, çalışmanın devamında kaplama işlemleri için hem nötral hem de asidik ortamlarda en yüksek stabiliteyi sağlayan 5 mg/mL ONM çözeltisinin kullanılmasına karar verilmiştir. Kaplama işlemi sırasında çapraz bağlayıcı ajan olarak kullanılan $CaCl_2$'nin yapısındaki Ca^{+2} iyonları iyonik bağlanma ile PBAT'ın karboksil gruplarındaki negatif yüklü oksijen atomlarına bağlanmış ve bu durum kaplamanın stabilitesini artırmıştır.

Çizelge 4.13. ONM kaplama verimi ve kaplama stabilitesi.

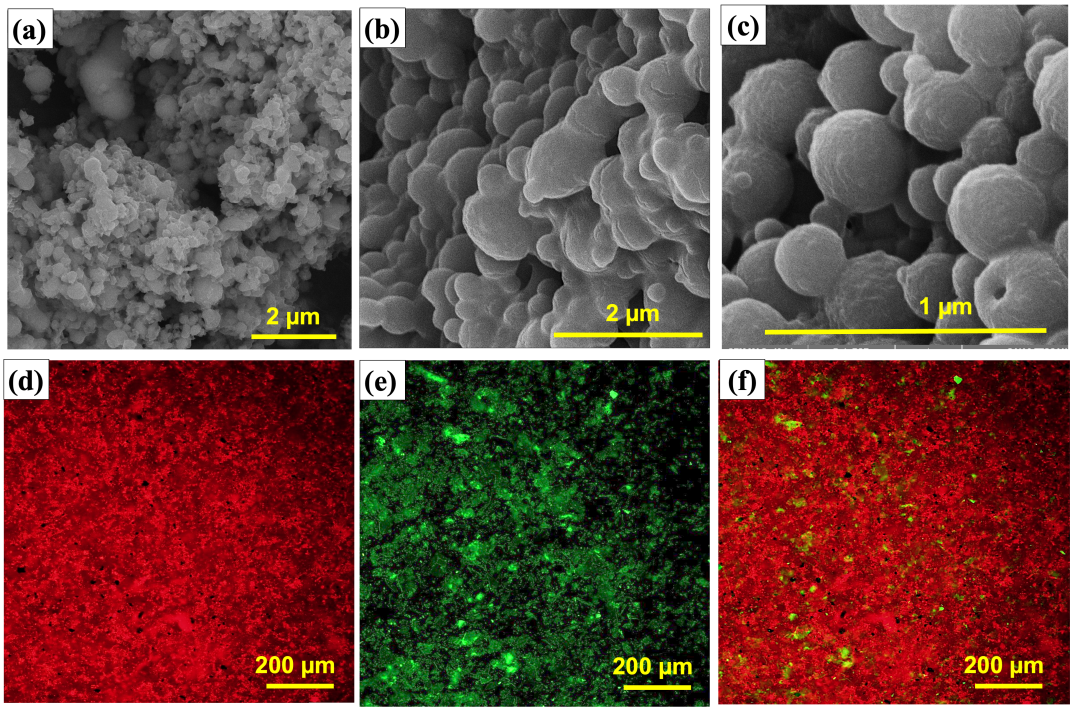
ONM konsantrasyonu (mg/mL)	**ONM kaplama verimi (%)**	**Yetmiş iki saat sonra nanopartikülün üzerinde kalan kaplamanın yüzdesi (%)**	
		@ PBS (pH 7,4)	**@ asetat tamponu (pH 5,5)**
10	64,5 ± 4,3	70,6 ± 5,6	69,3 ± 4,4
5	63,2 ± 1,5	76,7 ± 3,8	74,9 ± 2,6
1	61,2 ± 2,9	68,3 ± 7,0	68,1 ± 5,3

GA-ONM-PBAT nanopartiküllere ait SEM görüntüler literatürde sınırlı sayıda bulunan müsilaj kaplama görüntüleri ile benzerlik göstermektedir (**Şekil 4.47.b** ve **c**). ONM ile kaplama öncesi ve sonrasında elde edilen partikül boyutu değerlerinde kaplamanın partikül boyutunu artırdığı ancak bu artışın istatistiksel olarak anlamlı olmadığı gözlenmiştir (*p>0,05*) (**Çizelge 4.14**). Glioblastoma tedavisinin çalışıldığı literatürdeki benzer çalışmalar 200 nm civarında partiküller kullanılarak yapılmış olup, bu bilgiler ışığında çalışma kapsamında üretimi yapılan nanopartiküllerin de amaca uygun olduğu belirlenerek karakterizasyon çalışmalarına ve ardından *in vitro* çalışmalara geçilmiştir.

Çizelge 4.14. ONM kaplı GA-PBAT nanopartiküllere ait özellikler.

Nanopartikül (NPs)	Ortalama çap (nm)	GA Enkapsülasyon verimi (%)	Yükleme miktarı (µg GA/mg partikül)
GA-ONM-PBAT	196 ±91	87,2 ± 6,9	89,7 ± 5,0

GA-ONM-PBAT nanopartiküllerde kaplamanın varlığını görüntüleyebilmek için SEM analizine ek olarak floresan boyamalar gerçekleştirilmiştir. Floresan boyamalarda organik bir boya olan Sudan I ile boyanan ONM kırmızı ile FITC ile işaretli GA-PBAT nanopartiküller ise yeşil ile görüntülenmiştir (**Şekil 4.47.d-f**). Kaplama sonrasında yeşil floresan boyamanın şiddeti azalmış ve bu durum kaplamanın etkin bir şekilde gerçekleşmiş olduğu ile ilişkilendirilmiştir.



Şekil 4.47. (a) *Opuntia ficus indica'dan* izole edilen musilaj (ONM) ve (b, c) GA-ONM-PBAT nanopartiküllerinin farklı büyütmelerdeki SEM görüntüleri, (d) Sudan I ile boyanmış ONM'nin (e) FITC yüklü PBAT nanopartiküllerin ve (f) Sudan I ile boyanan ONM ile kaplanmış FITC yüklü PBAT nanopartiküllerin optik mikroskop görüntüleri.

Çalışma kapsamında kaplama ajanı olarak kullanılan ONM nin yüzey gerilimi bileşimi ile değişmekle birlikte yaklaşık 50 dyn/cm'dir [288]. PBAT'ın yüzey gerilimi ise 44,2 dyn/cm'dir [289]. PBAT ile ONM'nin yüzey gerilimlerinin birbirine yakın ve düşük

olması ONM'nin PBAT yüzeyine adsorbe olmasını ve yüzeye yapışmasını sağlamaktadır. Ayrıca, ONM'deki hidroksil grupları ile PBAT'daki karboksil grupları arasında oluşan kovalent bağlar da ONM'nin PBAT yüzeyine tutunmasını desteklemektedir. Yüzeye tutunmada ONM'nin polisakkarit yapısından gelen katyonik iyonlarla PBAT'ın yüzeyinde bulunan anyonik iyonlar arasında gerçekleşen iyonik bağlanmanın da etkili olduğu düşünülmüştür.

Literatürde farklı bitkilerden ekstrakte edilen müsilajın kaplama materyali olarak partiküler sistemlerde kullanıldığı bir adet çalışma bulunmaktadır. Ghumman ve ark'nın (2019) yaptıkları çalışmada [200] Taro bitkisinin kök gövdesinden müsilaj izole edilmiş ve pregabalin salımı için müsilaj-aljinat mikroküreler üretilmiştir. Elde edilen sonuçlar, müsilaj kaplamanın uzun süreli ilaç salımı için yardımcı bir ajan olarak kullanılabileceğini göstermiştir [200]. Benzer şekilde, tez çalışmasında ONM kaplı PBAT nanopartikülleri GA taşıyıcı sistem olarak geliştirilmiştir. Bu tez çalışmasının özgün yanı ise, ilk kez GA yüklü PBAT nanopartiküllerinin sentezlenerek *Opuntia ficus indica* (nopal) müsilajı (ONM) ile kaplanmasıdır. Böylece, GA ve ONM'nin antikanser etkileri ilk kez tek bir sistemde birlikte incelenmiştir.

4.11. Nanopartiküllerin Karakterizasyonu

4.11.1. Yüzey Yükünün Belirlenmesi

Çalışma kapsamında, partiküllerin yüzey yüklerini belirlemek ve uzun süreli stabilitelerini değerlendirmek amacıyla zeta potansiyel analizleri gerçekleştirilmiştir. Zeta potansiyel, nanopartikül süspansiyonlarının stabilitesini etkileyen önemli bir parametre olup, partiküller arasındaki elektrostatik itme kuvvetine bağlı olarak değerlendirilir. Genellikle ±30 mV'den büyük zeta potansiyel değerleri, kolloidal sistemlerde yüksek stabiliteyi işaret etmektedir [290, 291]. Ayrıca, zeta potansiyel analizleri yalnızca kolloidal stabiliteyi değerlendirmek için değil, aynı zamanda *in vivo* uygulamalarda partiküllerin yüzey yüklerinin biyolojik etkileşimler üzerindeki etkisini anlamak için de önem taşımaktadır. Ölçülen yüzey yükü değerleri, partiküllerin uzun vadeli stabilitesi hakkında bilgi verirken, nanosistemlerin farmakokinetik davranışlarını ve fagositoza uğrama potansiyellerini de etkileyebilir [292]. Özellikle sıfıra yakın zeta potansiyel değerine sahip nanopartiküller, yüksek pozitif yüke sahip partiküllerle kıyaslandığında, fagositik alım oranlarının daha düşük olduğu bilinmektedir. Zeta

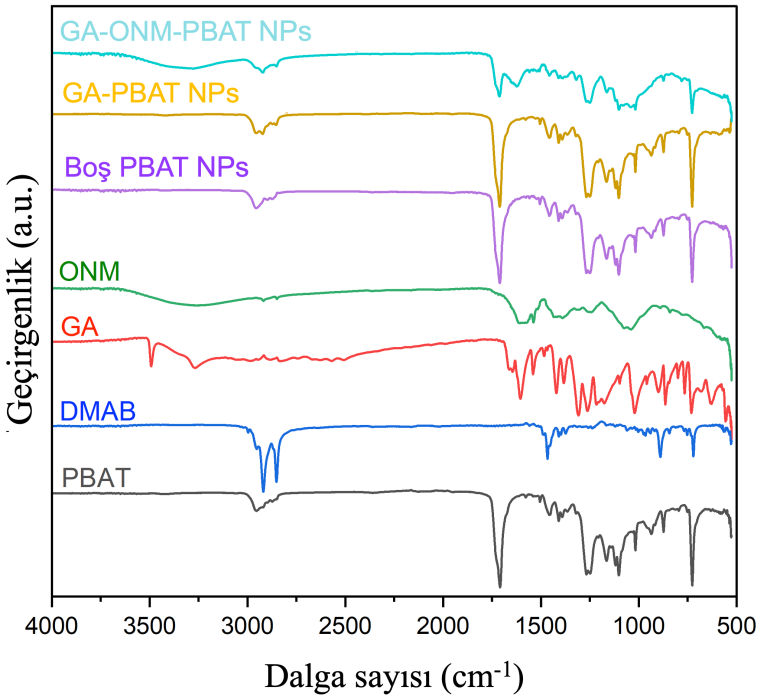
potansiyeline etki eden temel faktörün kullanılan polimer tipi olduğu bilinmektedir. Boş PBAT nanopartiküllerin zeta potansiyeli -19,8 ± 3,4 mV olarak ölçülmüştür (**Çizelge 4.15**). Boş PBAT nanopartiküllerin yüzey yükü, PBAT yüzeyinde çokça yer alan karboksilik asit (-COOH) gruplarının varlığından dolayı negatif değerdedir. GA-PBAT nanopartiküllerin zeta potansiyel değerleri -21,2 ± 2,8 mV'dir (**Çizelge 4.15**). Boş nanopartiküller ile GA-PBAT nanopartiküller kıyaslandığında zeta potansiyel değerinin negatif yönde artışı gözlenmiştir. Buna GA yapısında bulunan yoğun hidroksil grupları neden olmuştur. Yapıdaki karboksil grupları (PBAT'tan) ve hidroksil grupları (GA'dan) nanopartikül yüzeyine yakın yerleşmiş ve buna bağlı olarak yüksek zeta potansiyel değeri ölçülmüştür. Aktaş ve ark'nın (2005) [293] yaptıkları çalışmada, negatif yüklü kaspaz inhibitörünün (Z-DEVD-FMK) kitosan nanopartiküllerine yüklenmesi sonrasında zeta potansiyelinde düşüş olduğu belirlenmiştir. Çalışma sonucunda, etken madde içermeyen kitosan nanopartiküllerinin zeta potansiyeli +28,4 mV olarak ölçülürken, Z-DEVD-FMK yüklendiğinde bu değerin +20,25 mV'a düştüğü tespit edilmiştir. Bu sonuçlar, nanopartiküllerin yüzey yükünün, yüklenen maddenin elektriksel özelliğinden önemli ölçüde etkilendiğini ortaya koymaktadır. Tez çalışması kapsamında geliştirilen GA-ONM-PBAT NP'lerinin zeta potansiyeli -17,7 ± 4,1 mV olarak ölçülmüştür (**Çizelge 4.15**). *Opuntia ficus indica* anyonik polisakkaritlerden oluşmaktadır ve izole edilen müsilaj karboksilik grupların varlığı nedeni ile negatif yüzey yüküne sahiptir [294]. Dolayısıyla ONM-PBAT NP'lerin negatif zeta potansiyel değerine sahip olması beklenen bir durumdur. Sonuç olarak, tüm nanopartikül formülasyonlarının yüksek negatif zeta potansiyel değerlerine sahip olduğu saptanmış olup, ilgili veriler toplu olarak **Çizelge 4.15**'te sunulmuştur.

Çizelge 4.15. PBAT nanopartiküllerin zeta potansiyel değerleri.

Nanopartikül (NPs)	Zeta potansiyel (mV)
Boş PBAT	-19,8 ± 3,4
GA-PBAT	-21,2 ± 2,8
GA-ONM-PBAT	-17,7 ± 4,1

4.11.2. Kimyasal Yapı Analizi

PBAT polimerinin, ONM'nin ve sentezlenen nanopartiküllerin kimyasal yapıları ATR tekniği kullanılarak FTIR analizi ile karakterize edilmiştir ve sonuçlar **Şekil 4.48**'de sunulmuştur. PBAT reçinesine ait spektrum incelendiğinde, karakteristik olarak 1267 cm^{-1} ve 1165 cm^{-1} dalga sayılarında aromatik-alifatik ester gruplarında bulunan O=C-O-C gerilimleri, 1709 cm-1'de alifatik ve aromatik grubunda bulunan C=O gerilmesi ve 2954 cm^{-1}'de aromatik grubundaki C-H bağının piki görülmektedir [45, 295, 296]. Bu pikler PBAT'ı tanımlayan gösterge pikleridir. Spektrumda 716 cm^{-1}'de görülen pik CH_2 grubunun piki olup, uzun zincirli bileşiklerde belirgindir. PBAT nanopartiküllerine ait spektrumlarda PBAT'ın ester ve aromatik-alifatik ester gruplarına ait karakteristik pikler görülmektedir. PBAT için karakteristik piklerin boş PBAT, GA-PBAT ve GA-ONM-PBAT nanopartiküllere ait spektrumlarda olduğu, dolayısıyla polimerin partikül formuna gelirken kimyasal yapısında herhangi bir değişimin olmadığı görülmüştür. Nanopartikül üretim aşamasında emülgatör olarak kullanılan DMAB'a özgü FTIR piki olan 2835-2940 cm^{-1} dalga boylarındaki alifatik C-H piklerinin [246] boş PBAT, GA-PBAT ve GA-ONM-PBAT nanopartiküllerinin spektrumlarında bulunmadığı gözlenmiştir. Dolayısıyla, toksik etkiye sahip DMAB emülgatörünün üretim sonrası uygulanan yıkama ile nanopartiküllerden tamamen uzaklaşıp yapıya katılmadığı belirlenmiştir. GA'nın FTIR spektrumunda yaklaşık 3200-3500 cm^{-1}'de görülen pikler O-H gerilmeleri ve hidrojen bağları nedeniyle görülmektedir [297]. Ayrıca, 1604 cm^{-1} de görülen bant C=O bandına, 1421 cm^{-1}'de görülen pik aromatik zincire, 1261 cm^{-1}'de görülen pik C-O gruplarına aittir. Ek olarak 1021 cm^{-1}'de görülen pik C-O grubuna aittir [280]. GA için karakteristik olan bu piklere GA-PBAT ve GA-ONM-PBAT nanopartiküllerde rastlanmamıştır. Bu durumun eklenen GA'nın PBAT polimerine göre oranının düşük olmasından kaynaklandığı düşünülmüştür. ONM'ye ait spektrum incelendiğinde, karakteristik olarak 3000-3600 cm^{-1} dalga sayısı aralığında polisakkaritlerde bulunan O-H gerilmesi, 2918 cm^{-1}'de alifatik ve aromatik grubunda bulunan C=O gerilmesi ve 2954 cm^{-1}'de aromatik grubundaki C-H bağının piki görülmektedir [47]. GA-ONM-PBAT nanopartikül spektrumunda ONM'nin 1039 cm^{-1}'te bulunan C-O-C grubuna ait pik 1017 cm^{-1}'de görülmektedir. Bu durum GA-ONM-PBAT nanopartikül ONM'nin varlığını göstermiş ve kaplamanın gerçekleştiğini kanıtlamıştır.



Şekil 4.48. Çalışma kapsamında üretilen nanopartikülere ile PBAT, DMAB, GA ve ONM'ye ait ATR-FTIR spektrumları.

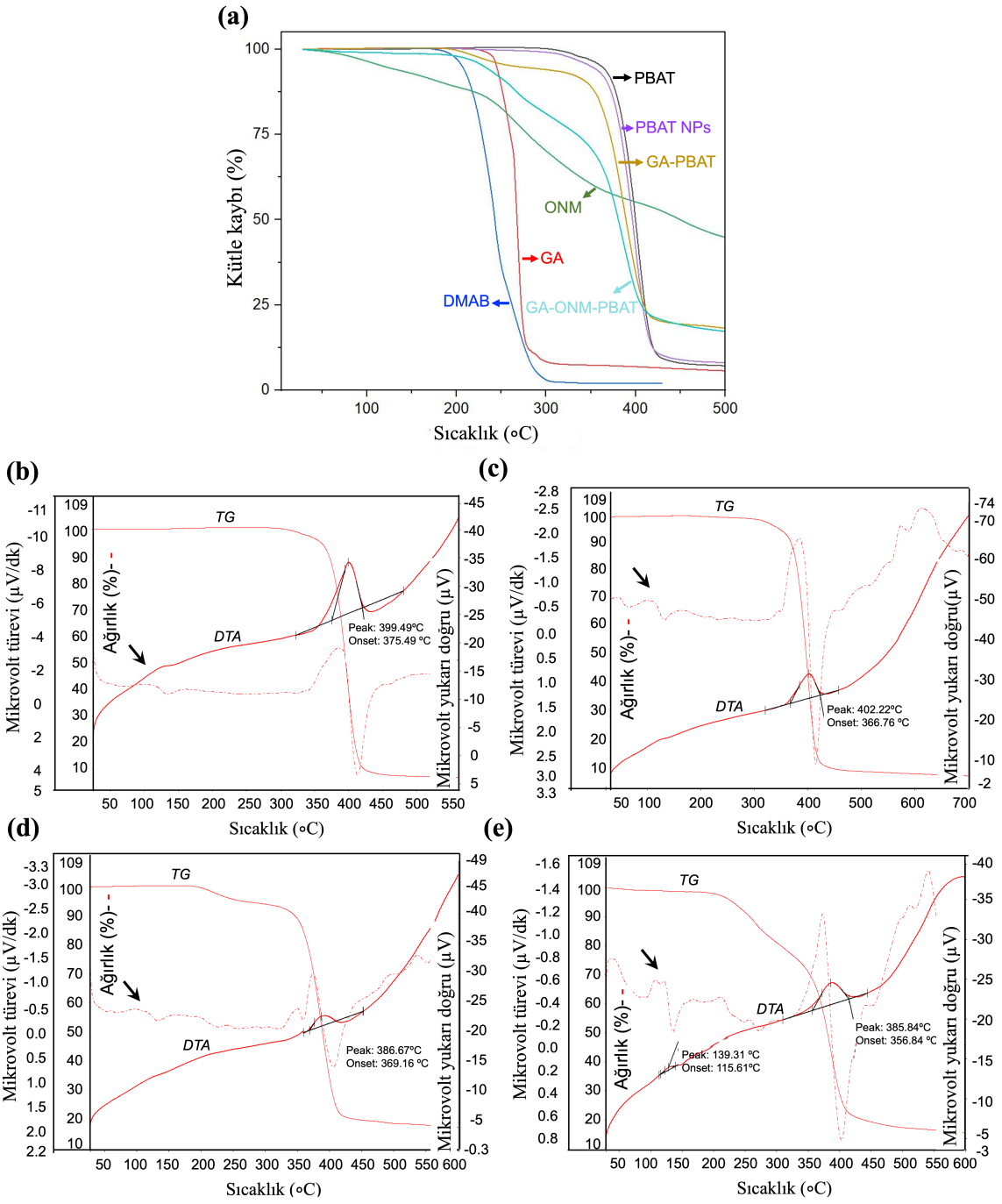
4.11.3. Termal Özelliklerin Belirlenmesi

Nanopartiküllerin termal özelliklerinin belirlenebilmesi için Termogravimetrik ve Diferansiyel Termal analiz kapsamında elde edilen termogramlar **Şekil 4.49.a-e'**de verilmiştir. PBAT reçinesine ait termogramlar incelendiğinde (**Şekil 4.49.a,c**) PBAT'ın termal bozunması tek aşamalı olarak gerçekleşmekte olup 375°C de başlamış ve %93 kütle kaybı ile sonuçlanmıştır. Bu bozunma, esas olarak polimer iskeletindeki ester bağlarının kopması ile ilgilidir ve bu durum, alifatik-aromatik kopoliester zincirlerinin depolimerizasyonuna ve uçucu hale gelmesine yol açar [42]. Ayrıca, DTA eğrisinde 110°C'de gözlenen endotermik pik, PBAT'ın erime noktasını belirtmektedir. Boş PBAT nanopartiküle ait termogramlar da PBAT reçinesi ile benzerlik göstermekte olup nanopartiküllerin %91'i 367°C'de termal olarak bozunmuştur (**Şekil 4.49.a, c**). Bu durum PBAT'ın naopartikül formuna geçerken termal özelliklerinde bir değişim olmadığını göstermektedir. Nanopartikül üretim aşamasında emülgatör olarak kullanılan DMAB'ın termal bozunması, yapısındaki C-H bağlarının kırılmasından kaynaklanarak yaklaşık 200 °C'de başlamaktadır (**Şekil 4.49.a**). Nanopartiküllerin bozunma sıcaklıklarının bu değerin üzerinde olması toksik etkiye sahip olan DMAB'ın yapıya katılmadığını ifade etmektedir. Gallik asit, tek aşamada termal bozunmaya uğrayarak yaklaşık 240 °C'de

kütlesinin yaklaşık %93'ünü kaybetmiştir (**Şekil 4.49.a**). Bu kayıp, karboksilik asit grubunun dekarboksilasyonu ve fenolik -OH gruplarının dehidroksilasyonu ile ilişkilendirilmektedir [298]. **Şekil 4.49.a**'da ONM'ye ait termogram, 20-100ºC aralığında yapısından nemin uzaklaştığını ve ardından 260-380°C'de polisakkarit zincirlerinin termal bozunmaya uğradığını göstermektedir. Bu kütle kaybı, glikozidik bağların kopmasıyla ilişkilidir. 500°C'nin üzerindeki sıcaklıklarda ise artık organik maddenin tam oksidasyonu ve karbonizasyonu meydana gelmektedir [299]. Benzer olarak Nayak ve ark. (2013) selülozik yapıdaki glikozit bağlarının bozulmasının, bitki müsilajı'nın yaklaşık 300°C'de ayrışmasına neden olduğunu rapor etmiştir [300].

GA-PBAT nanopartiküllerin termal bozunması incelendiğinde iki aşamalı olduğu görülmüştür (**Şekil 4.49.a, d**). Yaklaşık 369°C'de gözlenen kayda değer kütle kaybı (~%75) PBAT polimerinin dekompozisyonu ve depolimerizasyonundan kaynaklanmaktadır. İkinci basamakta 200-230°C sıcaklık aralığında gözlenen ~%6 kütle kaybı ise üretim aşamasında yapıya katılan GA'nın termal bozunmasından kaynaklanmaktadır. Gallik asitin PBAT nanopartikül yapısına dahil edilmesi, erime noktasında herhangi bir değişikliğe sebep olmamıştır. Bu durumun GA-PBAT nanopartikül üretim aşamasında yapıya katılan kütlece GA/PBAT oranının düşük olmasından kaynaklandığı düşünülmüştür. GA-ONM-PBAT nanopartiküllerin termal bozunma davranışı incelendiğinde ise 3 aşamalı olarak gerçekleştiği belirlenmiştir. Yaklaşık 200°C'de başlayan kayıp GA'nın bozunmasını ifade etmektedir. İkinci aşama olarak 356°C'de gözlemlenen ~%63'lük kütle kaybı ise PBAT'ın dekompozisyonu ve depolimerizasyonu ile ONM yapısındaki polisakkaritlerin bozulmasıdır. Yaklaşık 550ºC'de gözlenen üçüncü aşama ise yapının tamamen okside olmaya başladığını göstermektedir.

GA-ONM-PBAT nanopartiküllerinde, diğer nanopartiküllere göre daha erken başlayan termal bozunma, yapılarında bulunan GA ve ONM'nin düşük termal kararlılığa sahip olmasından kaynaklanmaktadır [300, 301]. Ayrıca, GA ve ONM'deki karboksil gruplarının polimer zincirinin kopmasını kolaylaştırdığı, önceki çalışmalarda da rapor edildiği üzere [302], nanopartiküllerin azalan termal kararlılığını açıklamaktadır.



Şekil 4.49. Çalışma kapsamında üretilen nanopartikülerin (a) TGA termogramları; (b) PBAT reçinesinin, (c) boş PBAT, (d) GA-PBAT ve (e) GA-ONM-PBAT nanopartiküllerinin DTA termogramları. Siyah oklar T_m değerlerini göstermektedir.

Şekil 4.49.b'de, 110 °C'de gözlemlenen endotermik pik, PBAT'ın yarı kristalin yapısını gösteren erime sıcaklığına karşılık gelmektedir. GA-ONM-PBAT nanopartiküllerinin DTA termogramında (**Şekil 4.49.e**), erime sıcaklığında yaklaşık 5 °C'lik küçük bir artış tespit edilmiştir ve bu durum, ONM ile PBAT arasındaki hidrojen bağlarına

atfedilmektedir. Bu etkileşim, ATR-FTIR analizinde -OH gerilme bantlarındaki kaymalarla da desteklenmiştir. Ayrıca, boş PBAT, GA-PBAT ve GA-ONM-PBAT nanopartiküllerinde kalan kütle yüzdeleri sırasıyla %9, %25 ve %37 olarak ölçülmüştür. Bu bulgular bir arada değerlendirildiğinde, GA ve ONM'nin PBAT nanopartiküllere başarıyla dahil edildiği sonucuna varılmıştır.

4.11.4. Nanopartiküllerin Stabilite ve Morfolojik Değerlendirmesi

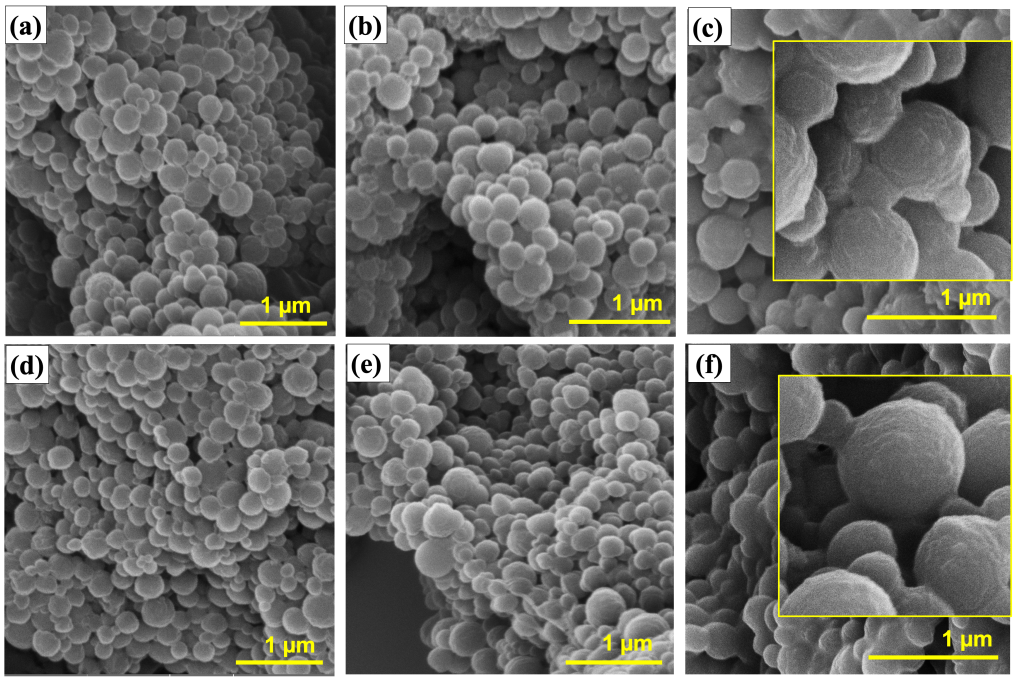
Nanopartiküllerin stabilitesi, 37 °C'de saf suda ve pH 5,5'teki asetat tamponunda 7 gün süreyle inkübe edilerek değerlendirilmiştir. Tümör mikroçevresinin asidik olduğu ve ekstraselüler alanda genellikle pH 6,5-6,8, endozomal/lizozomal bölmelerde ise yaklaşık pH 5,5 gibi daha düşük değerlere sahip olduğu bilinmektedir. Bu nedenle, *in vivo* koşulları daha iyi yansıtabilmek amacıyla, nanopartiküllerin stabilitesi hem nötral hem de asidik pH koşullarında incelenmiştir. Analiz kapsamında nanopartiküllerin 0. ve 7. günlerde Zeta potansiyelleri ölçülmüş ve ortalama ± standart sapma olarak saf su ve asetat tamponunun kullanıldığı durumlar için sırasıyla **Çizelge 4.16 ve 4.17**'de sunulmuştur. Ayrıca, 7. günde SEM analiziyle (**Şekil 4.50**) ImajeJ programı kullanılarak nanopartiküllerin ortalama partikül boyutları hesaplanmıştır (**Çizelge 4.16** ve **4.17**)

Çizelge 4.16. Saf su ortamında inkübe edilen nanopartiküllerin farklı zaman noktalarındaki ortalama çap ve zeta potansiyel değerleri. Değerler ortalama ± standart sapma olarak ifade edilmiştir.

Nanopartikül (NPs)	Ortalama partikül çapı (nm)	Zeta potansiyel (mV)	
		0. gün	7. gün
Boş PBAT	170 ± 67	-19.8 ± 3.4	-20.2 ± 4.2
GA-PBAT	186 ± 92	-21.2 ± 2.8	-21.9 ± 1.9
GA-ONM-PBAT	195 ± 94	-17.7 ± 4.1	-17.9 ± 3.2

Çizelge 4.17. Asetat tamponunda (pH 5,5) inkübe edilen nanopartiküllerin farklı zaman noktalarındaki ortalama çap ve zeta potansiyel değerleri. Değerler ortalama ± standart sapma olarak ifade edilmiştir.

Nanopartikül (NPs)	Ortalama partikül çapı (nm)	Zeta potansiyel (mV)	
		0. gün	7. gün
Boş PBAT	168 ± 79	-17.1 ± 2.3	-18.6 ± 1.8
GA-PBAT	184 ± 89	-19.1 ± 3.1	-19.9 ± 3.7
GA-ONM-PBAT	194 ± 90	-15.7 ± 2.0	-16.2 ± 4.0



Şekil 4.50. Yedi gün boyunca saf suda inkübe edilen c) boş PBAT, d) GA-PBAT ve e) GA-ONM-PBAT nanopartiküllerine ait SEM görüntüleri; asetat tamponunda (pH 5,5) inkübe edilen f) boş PBAT, g) GA-PBAT ve h) GA-ONM-PBAT nanopartiküllerine ait SEM görüntüleri.

Sıfırıncı ve 7. günlerde yapılan zeta potansiyeli ölçümleri, değerlerin tüm nanopartikül örneklerinde her iki ortamda da negatif kaldığını ve inkübasyon süresi boyunca anlamlı bir değişim olmadığını göstermiştir. ($p>0,05$). (**Çizelge 4.16** ve **4.17**). Asetat tamponundaki (pH 5,5) zeta potansiyel değerlerinin, saf sudaki değerlere göre daha az negatif olduğu görülmüş; bu durum, asidik ortamda nanopartikül yüzeyinin protonlanmasına ve dolayısıyla negatif yüzey yükünün azalmasına bağlanmıştır [292]. Bu

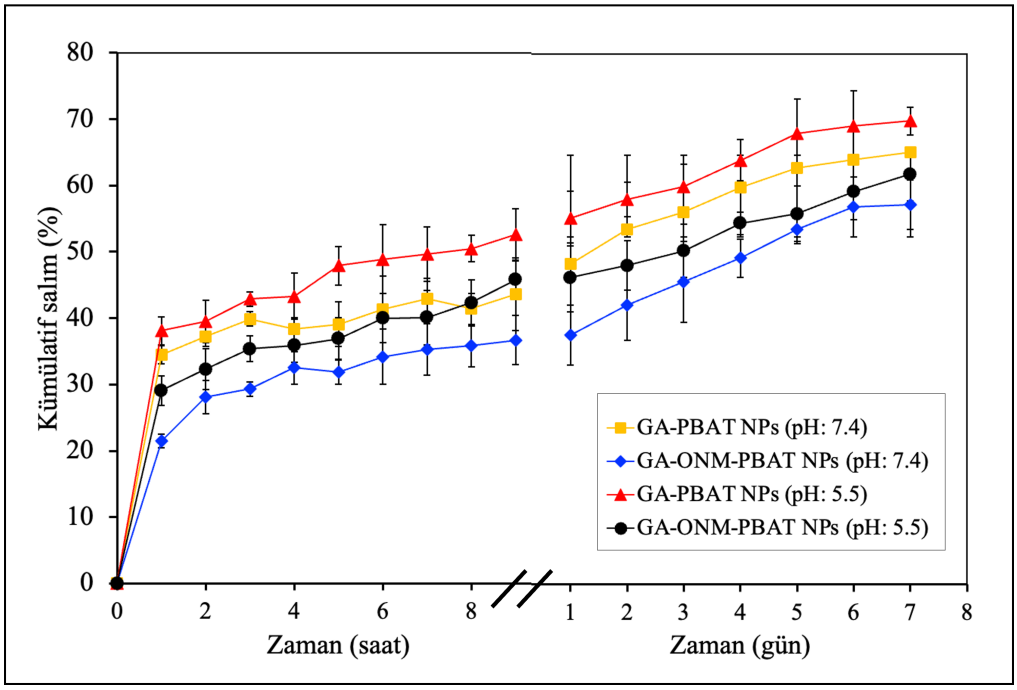
durum, üç nanopartikül formülasyonunun tamamında gözlemlenmiştir. Ayrıca, 7. günde gerçekleştirilen SEM analizinde (**Şekil 4.50.a-f**), saf suda ve asetat tamponunda inkübe edilen nanopartiküllerin morfolojisinin, başlangıç görüntüleriyle (**Şekil 4.46** ve **4.47**) karşılaştırıldığında anlamlı bir değişim göstermediği belirlenmiştir. Tüm bu veriler bir arada değerlendirildiğinde, inkübasyon süresince zeta potansiyelinin tutarlılığı ve morfolojik yapının değişmemesi, nanopartiküllerin iyi bir stabiliteye sahip olduğunu ortaya koymaktadır.

4.12. *İn Vitro* GA Salım Çalışmaları ve Salım Kinetiğinin Belirlenmesi

İn vitro GA salım çalışmaları, GA-PBAT ve GA-ONM-PBAT nanopartikülleri kullanılarak 7 gün boyunca üç paralel örnekle gerçekleştirilmiştir. Tümör mikroçevresinin asidik özellikte olması nedeniyle, *in vivo* koşullara daha yakın bir değerlendirme yapabilmek amacıyla GA salım çalışmaları hem nötral (pH 7,4) hem de asidik (pH 5,5) ortamlarda gerçekleştirilmiştir. PBAT nanopartiküllerden yüzde kümülatif GA salımını gösteren grafikler, **Şekil 4.51**'de verilmiştir. Ayrıca, PBAT nanopartiküllerden farklı sürelerde partikül başına salınan gallik asit miktarları ise **Çizelge 4.18**'de sunulmuştur.

Her iki nanopartikül formülasyonunda da GA'nın salım profili, başlangıçta hızlı bir salımı takiben daha yavaş ve sürekli bir salım fazı ile karakterize edilen iki aşamalı bir profil sergilemiştir. İlk 24 saat içinde, ani patlama etkisi (burst effect) ile, GA-PBAT nanopartiküllerinden yaklaşık %48 oranında GA salınırken, GA-ONM-PBAT nanopartiküllerinde bu oran biraz daha düşük, yaklaşık %37 olarak gözlemlenmiştir (pH 7,4). Asidik ortamda (pH 5,5) ise GA salımı artmış; ilk 24 saatte GA-PBAT nanopartiküllerinden yaklaşık %55 ve GA-ONM-PBAT nanopartiküllerinden yaklaşık %46 GA salınmıştır. Geri kalan GA'nın da polimerin tamamen bozunmasının ardından salınacağı düşünülmektedir. Ani patlama etkisi ile salım, partikül yüzeyine elektrostatik etkileşimlerle bağlanan biyoaktif ajanın salım ortamında partikül yapısından uzaklaşması sonucu gerçekleşmektedir. ONM kaplaması nedeniyle nanopartikül çapının artması, ilaç difüzyon yolunu uzatarak GA'nın başlangıçtaki hızlı salımını azaltmıştır [246].

Yedi günlük süre boyunca, pH 7,4'te toplam GA salımı GA-PBAT nanopartiküllerinden yaklaşık %65, GA-ONM-PBAT nanopartiküllerinden ise yaklaşık %57 olarak gerçekleşmiştir. Asidik ortamda (pH 5,5) ise bu değerler sırasıyla yaklaşık %70 ve %62'ye yükselmiş; bu durum, asidik koşullarda daha hızlı bir salım profili sergilendiğini göstermiştir. GA'nın bu hızlı salımı, PBAT'taki ester bağlarının asit tarafından parçalanması ve GA'nın moleküler hareketliliğinin artmasından kaynaklanmaktadır [303]. Her iki salım ortamında da (pH 7,4 ve 5,5), GA-ONM-PBAT nanopartiküllerinde GA-PBAT nanopartiküllerine göre daha yavaş bir salım gözlenmiş; bu durum, difüzyon mesafesinin artması ve salım kinetiğini etkilemesiyle açıklanmıştır.



Şekil 4.51. Fizyolojik ve asidik ortamlarda kümülatif GA salım grafiği (n=3).

Çizelge 4.18. Fizyolojik (pH 7,4) ve asidik (pH 5,5) ortamda partiküllerden toplam salınan GA miktarı (µg GA/mg partikül).

Fizyolojik ortam / **Nanopartikül (NPs)**	**1 sa**	**24 sa**	**48 sa**	**72 sa**	**7 gün**
GA-PBAT	37,9 ± 1,5	53,2 ± 3,8	58,5 ± 7,9	61,8 ± 5,7	71,7 ± 5,1
GA-ONM-PBAT	31,3 ± 1,2	41,4 ± 4,9	46,3 ± 5,8	50,1 ± 6,7	63,0 ± 4,1
Asidik ortam / **Nanopartikül (NPs)**	**1 sa**	**24 sa**	**48 sa**	**72 sa**	**7 gün**
GA-PBAT	44,3 ± 2,1	59,6 ± 6,8	62,3 ± 5,2	64,0 ± 5,5	73,5 ± 2,3
GA-ONM-PBAT	36,2 ± 1,0	51,6 ± 3,9	53,3 ± 5,4	55,2 ± 5,9	65,7 ± 4,1

Literatürde PBAT'ın partiküler formda ilaç taşıyıcı sistemlerde kullanıldığı yalnızca bir çalışmaya rastlanmıştır. Bu çalışmada, PBAT mikropartikülleri içerisinde hidrofobik bir molekül olan retinoik asit yüklenmiş ve salım profili incelenmiştir. Bulgulara göre, ilk gün retinoik asidin yaklaşık %10'u salınmış, 7. günün sonunda salım oranının %25'e ulaştığı ve bu sürecin yavaş ve kontrollü bir salım profili sergilediği rapor edilmiştir. Ayrıca, retinoik asidin salımının yaklaşık 14. güne kadar lineer bir şekilde devam ettiği belirtilmiştir [191]. Tez çalışması kapsamında sentezlenen PBAT partiküller nanoboyutta olduğu için literatürde bulunan mikropartiküler sistemden farklı sonuçlar elde edilmesi beklenen bir durumdur. Çünkü ilaç salımında partikül boyutu önemli bir parametredir. Küçük partikül boyutuna sahip nanopartiküller, daha büyük bir yüzey alanına sahiptir. Bu geniş yüzey alanı, yüzeyde veya yüzeye yakın bölgelerde bulunan ilacın hızlı salınmasına yol açarak genellikle ani bir salım profili oluşturur. Buna karşın, partikül içinde enkapsüle olmuş ilaç yavaşça difüze olmaktadır.

GA'nın bilinen çok önemli biyoaktif özelliklerini korumak, bunlara ek olarak düşük yarı-ömür ve biyoyararlanımını artırmak için kontrollü salım sistemleri ile birlikte kullanıldığı pek çok çalışma literatürde bulunmaktadır. Singh ve ark. (2011) çalışmalarında çözücü buharlaştırma yöntemiyle GA enkapsüle edilen fosfotidilkolin mikroküreler sentezlemişlerdir. Mikrokürelerden 24 saat sonunda GA'nın %93'ünün salındığını ve geliştirdikleri mikrokürelerin GA'nın biyoyararlanımını artırmak için kullanılabileceğini belirtmişlerdir [40]. Başka bir çalışmada GA'nın sprey kurutma yöntemi kullanılarak enkapsülasyonu gerçekleştirilmiştir. Enkapsülasyonda polimer olarak *Opuntia ficus*

indica bitkisinden elde edilen müsilaj kullanılarak GA'nın %65 ini ~2 günde salan bir sistem geliştirilmiştir [304]. Bir diğer çalışmada Dorniani ve ark. (2016) [167] tarafından kanser terapileri için GA yüklü grafen oksit nanokompozit yapılar geliştirilmiştir. Geliştirilen yapılardan GA'nın salımı incelenmiş ve 5 günde GA'nın %81'inin salındığı belirtilmiştir. Mahmoob ve ark. (2020) [282] ise yaptıkları bir çalışmada GA yüklü PLGA nanopartiküller geliştirmişlerdir. Gallik asit PLGA nanopartikülleri içerisine başarılı bir şekilde yüklenmiş ve 48 saatte GA'nın %98'i salınmıştır. Literatürdeki sonuçlara kıyasla geliştirdiğimiz GA-PBAT ve GA-ONM-PBAT nanopartiküllerden GA'nın salımı daha uzun dönemli ve kontrollü gerçekleşmiştir. Bu durum nanopartiküllerin temel yapısını oluşturan PBAT'ın biyobozunurluğu ve yüzey yapısı ile ilişkilendirilmiştir.

GA-PBAT ve GA-ONM-PBAT nanopartiküllerden kümülatif GA salım verileri çeşitli ilaç salım modelleri (sıfırıncı derece, birinci derece, Higuchi, Hixson-Crowell) kullanılarak matematiksel olarak analiz edilmiştir. Salım kinetiklerine göre elde edilen grafiklerin lineer regresyon katsayıları (R^2) 1'e en yakın olan model, salınım kinetiği için en uygun model olarak belirlenmiştir. Salım kinetiği modellerine ait hız sabitleri ve doğrusal regresyon katsayıları (R^2) **Çizelge 4.19**'da özetlenmiştir. Bire en yakın R^2 değerleri, pH 7,4 için GA-PBAT ve GA-ONM-PBAT nanopartiküllerinde sırasıyla 0,9165 ile 0,2560 $\mu g.h^{-1/2}$ hız sabitleri ile Higuchi kinetik modeli için elde edilmiştir. Bu değerler pH 5,5 için ise sırasıyla 0,9071 ile 0,2092 $\mu g.h^{-1/2}$ olarak hesaplanmıştır. Bu durum iki koşulda da hem GA-PBAT hem de GA-ONM-PBAT nanopartiküllerinden GA salımının baskın olarak difüzyona dayalı bir salınım mekanizması olan Higuchi salınım modelini takip ettiğini göstermektedir. Fick'in difüzyon yasasına dayanan Higuchi modeli, esas olarak difüzyonla kontrol edilen sistemlerden ilaç salınımını karakterize etmek için sıklıkla kullanılır. GA'nın nanopartiküllerden salım kinetiği birçok parametre tarafından belirlenmektedir. Bu süreçte, salım genellikle difüzyon kontrolünde gerçekleşse de, polimerin kimyasal yapısı, kristallik derecesi ve biyobozunurluk özellikleri de salım davranışını önemli ölçüde etkileyen faktörlerdendir [246].

Çizelge 4.19. Fizyolojik ve asidik ortamda PBAT ve ONM-PBAT nanopartiküllerinden GA salımına ait kinetik modelleri.

Farklı salım kinetiği modellerinden elde edilen kinetik parametreler								
a) Fizyolojik ortam (pH 7,4)								
Nanopartikül (NPs)	**Sıfırıncı derece**		**Birinci derece**		**Higuchi**		**Hixson-Crowell**	
	R^2	**k ($\mu g.h^{-1}$)**	**R^2**	**k (h^{-1})**	**R^2**	**k ($\mu g.h^{-1/2}$)**	**R^2**	**k ($h^{-1/3}$)**
GA-PBAT	0,9107	0,0257	0,8997	0,0186	0,9801	0,9165	0,9332	0,0012
GA-ONM-PBAT	0,8732	0,0078	0,8136	0,0006	0,9765	0,2560	0,9487	0,0063
b) Asidik ortam (pH 5,5)								
Nanopartikül (NPs)	**Sıfırıncı derece**		**Birinci derece**		**Higuchi**		**Hixson-Crowell**	
	R^2	**k ($\mu g.h^{-1}$)**	**R^2**	**k (h^{-1})**	**R^2**	**k ($\mu g.h^{-1/2}$)**	**R^2**	**k ($h^{-1/3}$)**
GA-PBAT	0,8903	0,0561	0,8823	0,0126	0,9752	0,9071	0,9165	0,0078
GA-ONM-PBAT	0,8655	0,0101	0,8269	0,0010	0,9551	0,2092	0,9179	0,0099

4.13. Hücre Kültür Çalışmaları

4.13.1. GA'nın Farklı Konsantrasyonlarının HUVEC ve T98G Hücreleri Üzerindeki Etkisinin İncelenmesi

İnsan glioblastoma hücre hattı (T98G) ve insan umbilikal damar endotel hücreleri (HUVEC) yüzeye bağlı proliferasyon davranışı sergilemektedir. Çalışma kapsamında, T98G ve HUVEC hücreleri, sırasıyla glioblastoma ve sağlıklı hücreler üzerinde gallik asidin (GA) etkisini incelemek için kullanılmıştır. GA'nın farklı konsantrasyonlarının (0-1000 μM) T98G ve HUVEC hücrelerinin proliferasyonu üzerindeki etkisini incelemek için beş günlük *in vitro* hücre kültürü çalışmaları gerçekleştirilmiştir. GA içermeyen (0 μM) kültür ortamı ile muamele edilen hücreler kontrol grubu olarak kullanılmıştır.

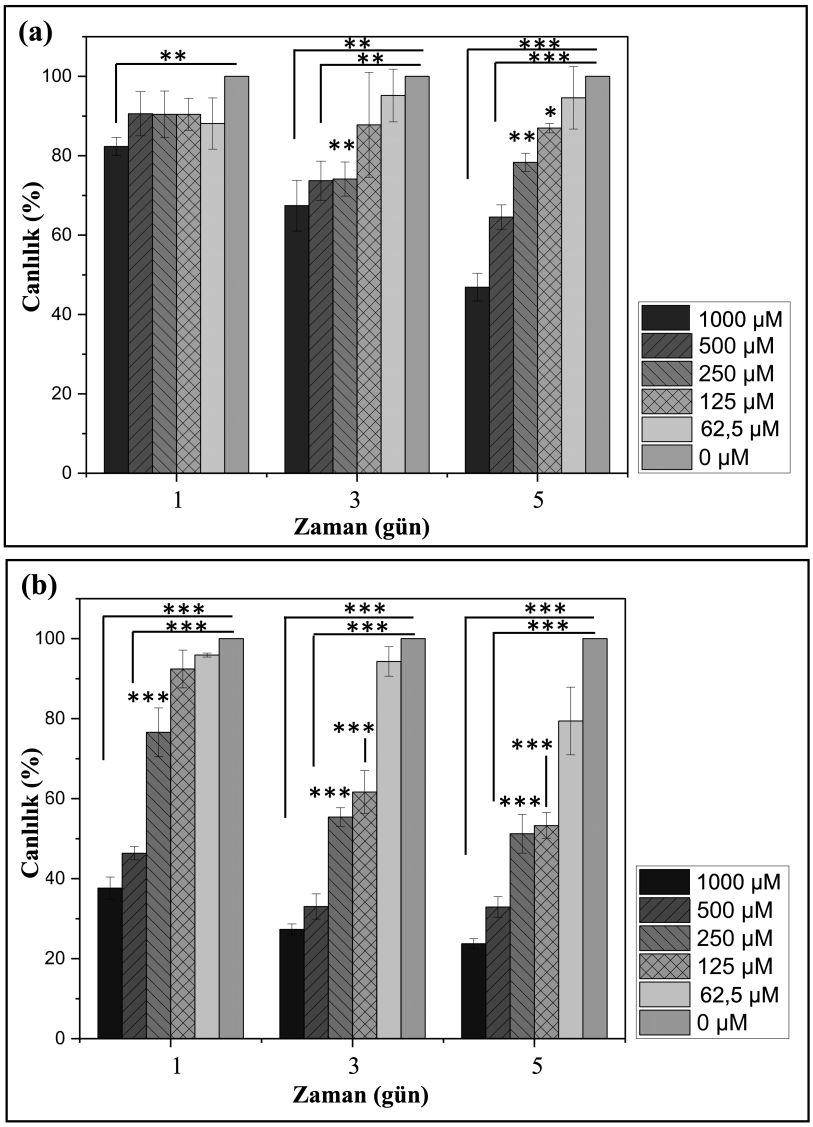
4.13.1.1. MTT Analizi

MTT analizi ile belirlenen hücre canlılık değerleri, sırasıyla T98G hücreleri ve HUVEC'ler için **Şekil 4.52.a** ve **b**'de verilmiştir. **Şekil 4.52.a**'da verilen T98G

hücrelerinin MTT değerleri incelendiğinde, T98G hücrelerinin düşük doz GA'ya dirençli olduğu ve 62,5 µM konsantrasyonundaki serbest GA'nın kültür süresi boyunca hücre proliferasyonu üzerinde olumsuz bir etkisi olmadığı gözlemlenmiştir (*p>0,05*). Aksine, kültürün ilk gününde 1 000 µM GA konsantrasyonunun hücre canlılığını önemli ölçüde azalttığı görülmektedir. Kültürün ilk gününde, yalnızca 1000 µM GA dozu hücre canlılığını %82'ye düşürmüştür (***p<0,01*). Üçüncü günde ise, GA uygulaması 250 µM'de hücre canlılığını %74'e (***p<0,01*), 500 µM'de %73'e (***p<0,01*) ve 1000 µM'de %67'ye (***p<0,01*) kadar azaltmıştır. Beş günlük GA uygulamasının ardından, T98G hücrelerinde tüm dozlarda istatistiksel olarak anlamlı canlılık azalmaları gözlenmiş; en yüksek doz olan 1000 µM'de canlılık oranı %46 seviyesine kadar düşmüştür.

Gallik asidin GBM hastalarının tedavisinde uygulanması, endotelyal hücreler dahil olmak üzere geniş bir hücre popülasyonunu etkilemektedir. Çalışmada GA'nın sağlıklı hücreler üzerindeki sitotoksik etkisini araştırmak için insan umbilikal damar endotel hücreleri (HUVEC) kullanılmış ve HUVEC'lere uygulanan GA doz aralığı da 0-1000 µM arasında tutulmuştur. **Şekil 4.52.b**'de, kontrol hücreleriyle karşılaştırmalı olarak, 1., 3. ve 5. günlerde GA uygulamasının her doz değeri için grup içi karşılaştırmaları yapılmıştır. Yüz yirmi beş µM GA uygulanan HUVEC'lerin, hücre canlılığı 3. günde %61'e (****p<0,001*) ve 5. günde %53'e (****p<0,001*) düşmüş; 24 saat sonunda ise anlamlı bir canlılık azalması gözlenmemiştir. Beş yüz µM GA ile tedavi edilen hücrelerin canlılık oranları, 1. günde %46'ya (****p<0,001*), 3. günde %33'e (****p<0,001*) ve 5. günde %32'ye (****p<0,001*) gerilemiştir. Ayrıca, en yüksek doz olan 1000 µM GA uygulamasında, hücre canlılığı 1. günde %37, 3. günde %27 ve 5. günde %23'e kadar düşmüştür (****p<0,001*).

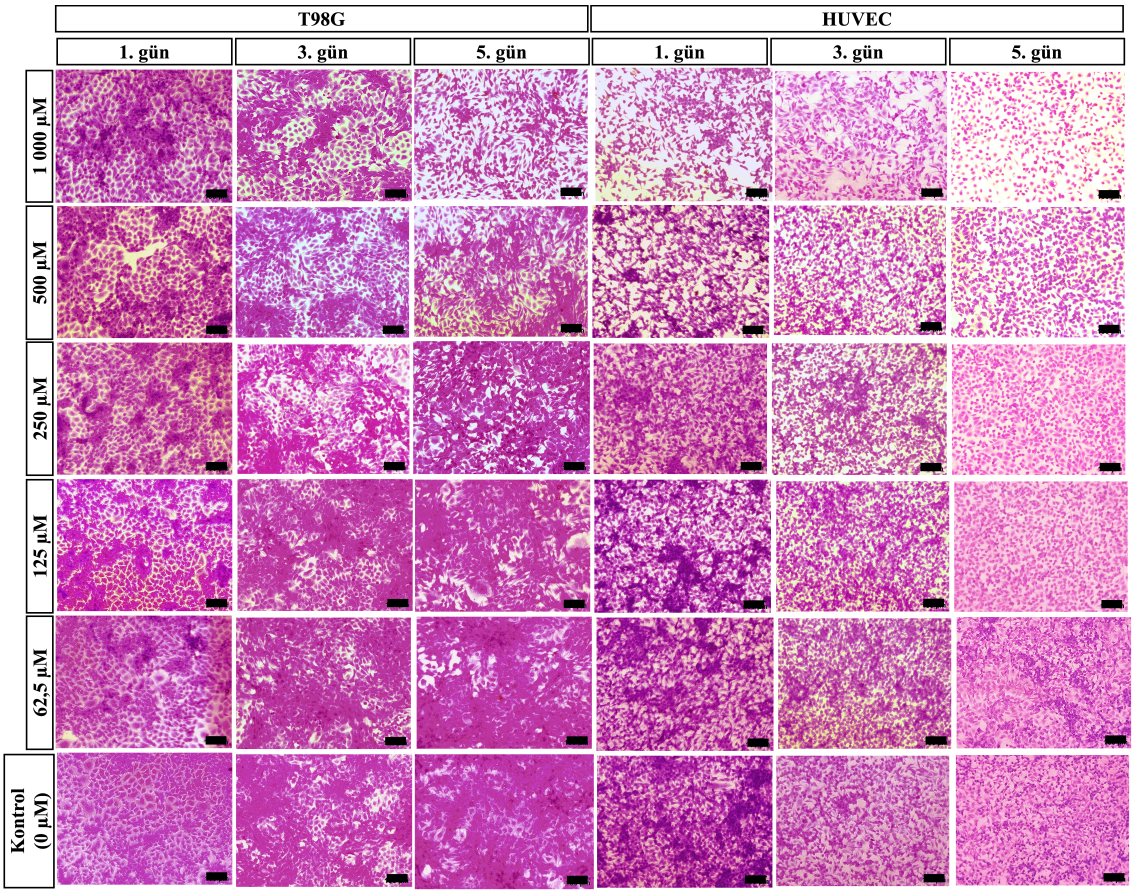
T98G hücreleri ve HUVEC'ler için hücrelerin %50'sini inhibe eden doz miktarı olarak tanımlanan IC_{50} değerleri, **Şekil 4.52.a** ve **b**'de verilen % canlılık değerleri ve GraphPad Prism programı kullanılarak hesaplanmıştır. Beşinci gün sonunda IC_{50} değeri T98G hücreleri için 750 µM, HUVEC'ler için ise 120 µM olarak belirlenmiştir. Bu sonuç, literatürde T98G hücreleri için belirtilen ~600 µM IC_{50} değeriyle uyum göstermekte olup, bu durum sürekli GA maruziyetinin hücre proliferasyonunu önemli ölçüde inhibe ettiğini ortaya koymaktadır [305].



Şekil 4.52. (a) T98G hücreleri ve (b) HUVEC'ler için farklı miktarlardaki GA'nın canlılık üzerindeki etkisini gösteren 5 günlük MTT sonuçları. (İstatistiksel olarak anlamlı farklılıklar n =3 *$p<0,05$, **$p<0,01$, ***$p<0,001$, 0 µM kontrol grubu iken). Ekim yoğunluğu: $4x10^4$ hücre/mL.

4.13.1.2. Morfolojik Analiz

Farklı dozlarda (0-1000 µM) GA ile etkileştirilen T98G hücreleri ve HUVEC'ler kültürün 1, 3 ve 5. günlerinde kristal viyole ile boyanmış ve optik mikroskop ile incelenmiştir. Elde edilen optik mikroskop görüntüleri **Şekil 4.53**'te sunulmuştur.



Şekil 4.53. Farklı miktarlardaki GA'nın T98G hücreleri ve HUVEC'lerin canlılığı üzerindeki etkisini gösteren kristal viyole boyama görüntüleri (ölçek çubukları her bir şekil için 100 µm'yi temsil etmektedir).

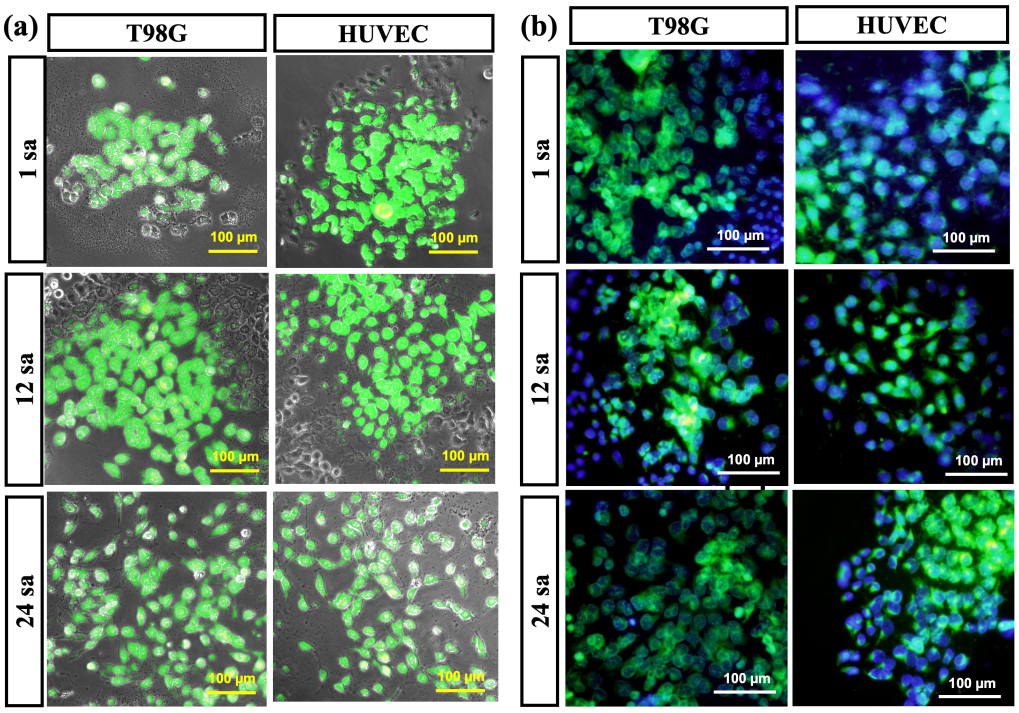
Kristal viyole boyama sonuçları, kontrol grubu (0 µM) hücrelerinin çok çekirdekli ve fibroblast benzeri bir yapı sergilediğini göstermektedir. GA dozunun artmasıyla birlikte her iki hücre tipinde de hücre yoğunluğunda bir azalma gözlemlenmiştir. Yüksek GA dozlarında hücreler sağlıklı yapılarını kaybetmekte ve yuvarlak şekilli morfoloji sergileyerek hücre ölümüne gitmektedir. Özellikle 1000 µM GA konsantrasyonunda, her iki hücre için de hücre sayısında belirgin bir azalma meydana gelmiş ve hücrelerin büyük çoğunluğu sağlıksız bir morfoloji sergilemiştir. Kristal viyole boyama ile elde edilen görüntüler, MTT sonuçlarıyla tutarlılık göstermektedir.

MTT ve kristal viyole boyama sonuçları birlikte değerlendirildiğinde, T98G hücrelerinin düşük GA konsantrasyonlarına karşı dirençli olduğunu, ancak HUVEC'lerin bu dozlardan önemli ölçüde etkilendiğini göstermektedir. Bu durum, sağlıklı hücrelerin DNA onarım

kapasitelerinin sınırlı olması ve apoptoz mekanizmalarını daha hızlı bir şekilde aktive edebilmeleriyle açıklanabilir.

4.13.2. PBAT Nanopartikülleri ile Yürütülen Hücre İçerisine Alım Çalışmaları

PBAT nanopartiküllerinin hücre içerisine alım çalışmaları kapsamında T98G hücreleri ve HUVEC'ler 24 sa boyunca FITC işaretli PBAT nanopartikülleri ile muamele edilmiştir. Hücreler, kültürün 1, 12 ve 24. saatlerinde optik ve floresan mikroskop altında incelenmiştir. T98G hücrelerinin ve HUVEC'lerin mikroskop görüntüleri **Şekil 4.54.a** ve **b**'de sunulmaktadır. Kültürün ilk saatinden itibaren hem T98G hücreleri hem de HUVEC'lerin FITC işaretli nanopartikülleri hücre içerisine aldığı belirlenmiş ve kültürün ilerleyen saatlerinde nanopartiküllerin hücre çekirdeği ve sitoplazmasında bulunduğu tespit edilmiştir (**Şekil 4.54. a,b**).



Şekil 4.54. T98G hücreleri ve HUVEC'lerin birleştirilmiş mikroskop görüntüleri: (a) ışık ve floresan, (b) DAPI ile boyanmış; yeşil alanlar FITC işaretli nanopartikülleri temsil etmektedir. Ekim yoğunluğu: $4x10^4$ hücre/mL.

Nanopartiküllerle etkileşime giren hücrelerin 10X büyütme görüntüleri, PBAT nanopartiküllerinin hücreler tarafından hücre alımını analiz etmek ve hücre alım

yüzdesini belirlemek için kullanılmıştır. Hesaplanan hücre alım yüzdeleri **Çizelge 4.20**'de sunulmuştur.

Çizelge 4.20. PBAT nanopartiküllerinin T98G hücreleri ve HUVEC'ler tarafından hücre içine alım yüzdesi (n=3). Ekim yoğunluğu: $4x10^4$ hücre/mL.

Hücre	Hücre içine alım (%)		
	1 sa	24 sa	48 sa
T98G	43,4 ± 2,2	60,1 ± 6,6	67,8 ± 5,1
HUVEC	35,3 ± 3,2	41,9 ± 6,1	45,3 ± 7,5

Kültürün ilk saatinde, HUVEC'lerin ortamda bulunan FITC işaretli PBAT nanopartiküllerinin yaklaşık %35'ini aldığı, T98G hücrelerinin ise %43'ünü aldığı belirlenmiştir. Takip eden saatlerde hücreler tarafından alınan partikül yüzdesinde anlamlı bir değişiklik gözlemlenmemiştir. HUVEC'ler tarafından alınan partikül sayısının, T98G hücreleri tarafından alınanlardan daha düşük olduğu bulunmuştur. Kanser hücrelerinin normal hücrelere göre daha fazla nanopartikülü içerisine almasının nedeni, kanserli hücrelerin normal hücrelere göre daha büyük çekirdek zarlarına sahip olmaları ve dolayısıyla kanser hücrelerinin nanopartiküllerle çok daha fazla etkileşimde bulunmasıdır [246]. Hücreler nanopartikülleri genellikle endositoz yoluyla hücre içine alırlar. Kanser hücrelerinin endositoz mekanizmaları normal hücrelere kıyasla daha aktiftir. Bu durum, artan besin ihtiyacı ve hızlanmış metabolizma ile ilişkilidir [306].

4.13.3. PBAT Nanopartiküllerin T98G Hücreleri Üzerindeki Etkisinin İncelenmesi

Üç günlük *in vitro* çalışmada, boş PBAT nanopartiküllerinin ve GA-PBAT ile GA-ONM-PBAT nanopartiküllerinden salınan GA'nın T98G glioblastoma hücrelerinin proliferasyonu üzerindeki etkileri incelenmiştir. TCPS üzerinde kültüre edilen hücreler kontrol grubu olarak kullanılmıştır. HUVEC'ler, vasküler stabilite, kan dolaşımı ve besin taşınımı için kritik öneme sahip sağlıklı endotelyal hücrelerdir. Sunulan *in vitro* çalışma, şu soruya yanıt vermek üzere tasarlanmıştır: "HUVEC'ler üzerinde toksik etki göstermeden partiküler sistemlerde GA'nın ONM ile kombine kullanımı, T98G hücreleri üzerindeki antiproliferatif ve apoptoz etkileri artırabilir mi?". Bu amaçla, sağlıklı hücreler üzerinde minimum sitotoksisite sağlamak için partikül konsantrasyonlarını seçerken

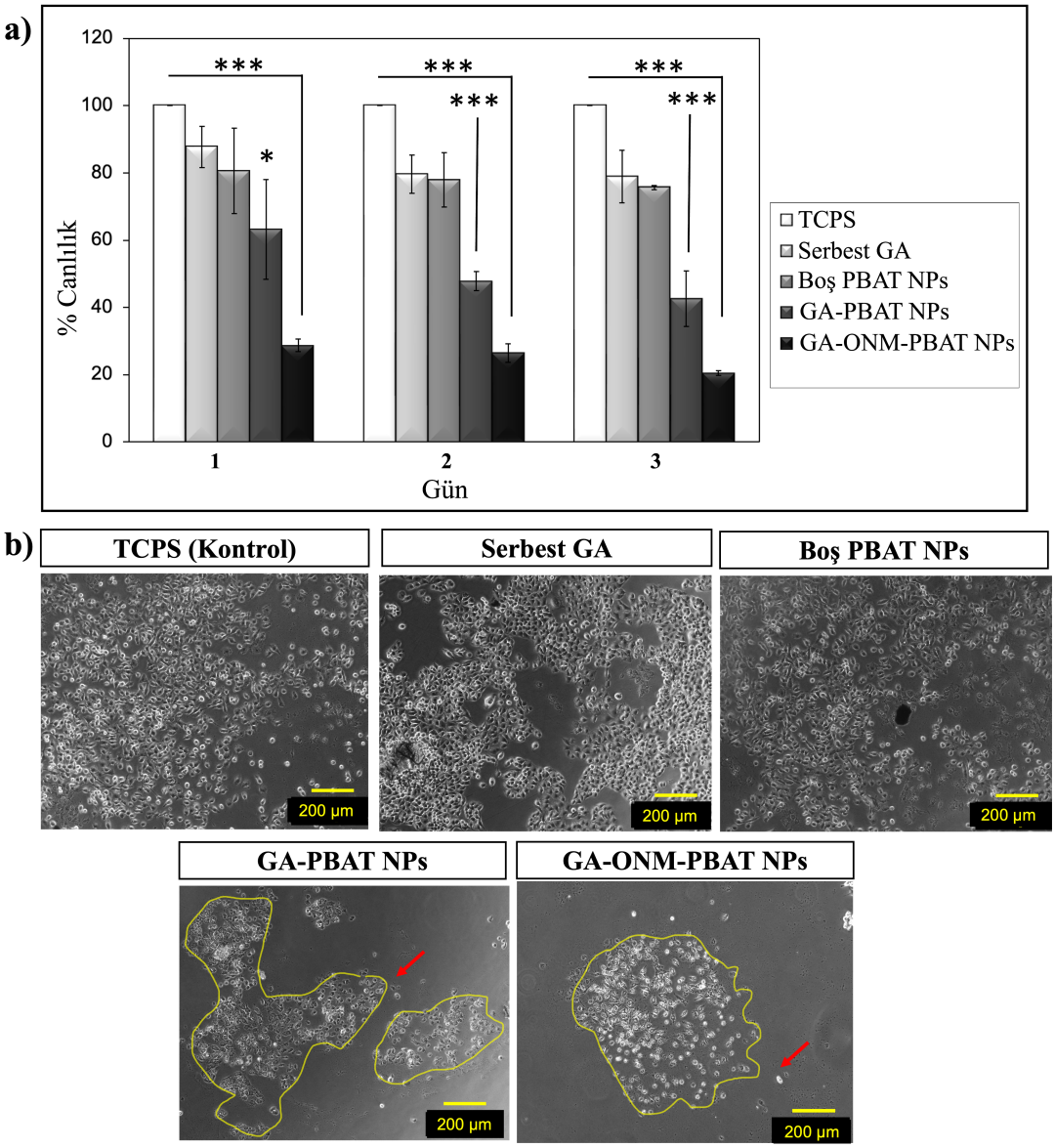
GA'nın HUVEC'lere ait IC_{50} değeri dikkate alınmış ve nanopartikül konsantrasyonu 0,2 mg/mL olarak belirlenmiştir. Polifenol açısından zengin ONM'nin [47] GA'nın terapötik anti-kanser etkinliğini sağlıklı hücreler üzerinde toksik etki oluşturmadan sinerjik olarak artıracağı hipotez edilmiştir.

4.13.3.1. Hücre Canlılığı ve Hücresel Morfoloji

MTT analizine göre, kültürün 1. gününden itibaren, kontrol grubuna kıyasla, GA-PBAT ve GA-ONM-PBAT nanopartikül gruplarındaki hücrelerin canlılık değerlerinde anlamlı derecede bir azalma gözlemlenmiştir (**Şekil 4.55**). Kültürün 1., 2. ve 3. günlerinde, GA-PBAT nanopartikül grubunda hücre canlılığı sırasıyla %63 (*$**p<0,01$*), %47 (*$***p<0,001$*) ve %42 (*$***p<0,001$*) olarak belirlenmiştir. GA-PBAT nanopartikül grubundaki hücrelerin canlılığında kontrol grubuna kıyasla anlamlı bir azalma olmasına rağmen, kültür ortamına salınan mikromolar mertebesindeki GA miktarının hücre canlılığını tamamen inhibe etmek için yeterli olmadığı belirlenmiştir. Kontrol hücrelerine kıyasla, eşdeğer serbest GA grubunda istatistiksel olarak anlamlı bir azalma olmamış, 1., 2. ve 3. günlerde hücre canlılığı sırasıyla %87, %80 ve %78'e düşmüştür (*$p>0,05$*). Nanopartiküller, küçük boyutları nedeniyle hücreler tarafından kolayca alınabilir ve bu da hücre içinde daha yüksek ilaç konsantrasyonlarına yol açar. Bu nedenle, ilaç yüklü nanopartiküller, eşdeğer konsantrasyonlardaki serbest ilaç grubuna kıyasla kanser hücreleri üzerinde daha yüksek sitotoksik etkiler sergilemektedir [214]. Ayrıca, nanopartiküller, hücresel alım mekanizmalarındaki değişiklikler aracılığıyla kanser hücrelerinde ilaç direncini aşarak ilacın antikanser aktivitesini artırma potansiyeline sahiptir. Kültür süresi boyunca en düşük hücre canlılık değerleri GA-ONM-PBAT nanopartikül grubunda gözlenmiş ve kültürün 1., 2. ve 3. günlerinde sırasıyla %28, %26 ve %20 (*$***p<0,001$*) olarak hesaplanmıştır (**Şekil 4.55.a**). Bu durum, kültür ortamına salınan GA ile kaplamada bulunan ONM'nin etkisinden kaynaklanmıştır. Elde edilen bulgular, ONM'nin GA'nın antikanser etkisini artırdığı ve kanser hücrelerinin proliferasyonunu inhibe ettiği yönündeki hipotezimizi desteklemiştir.

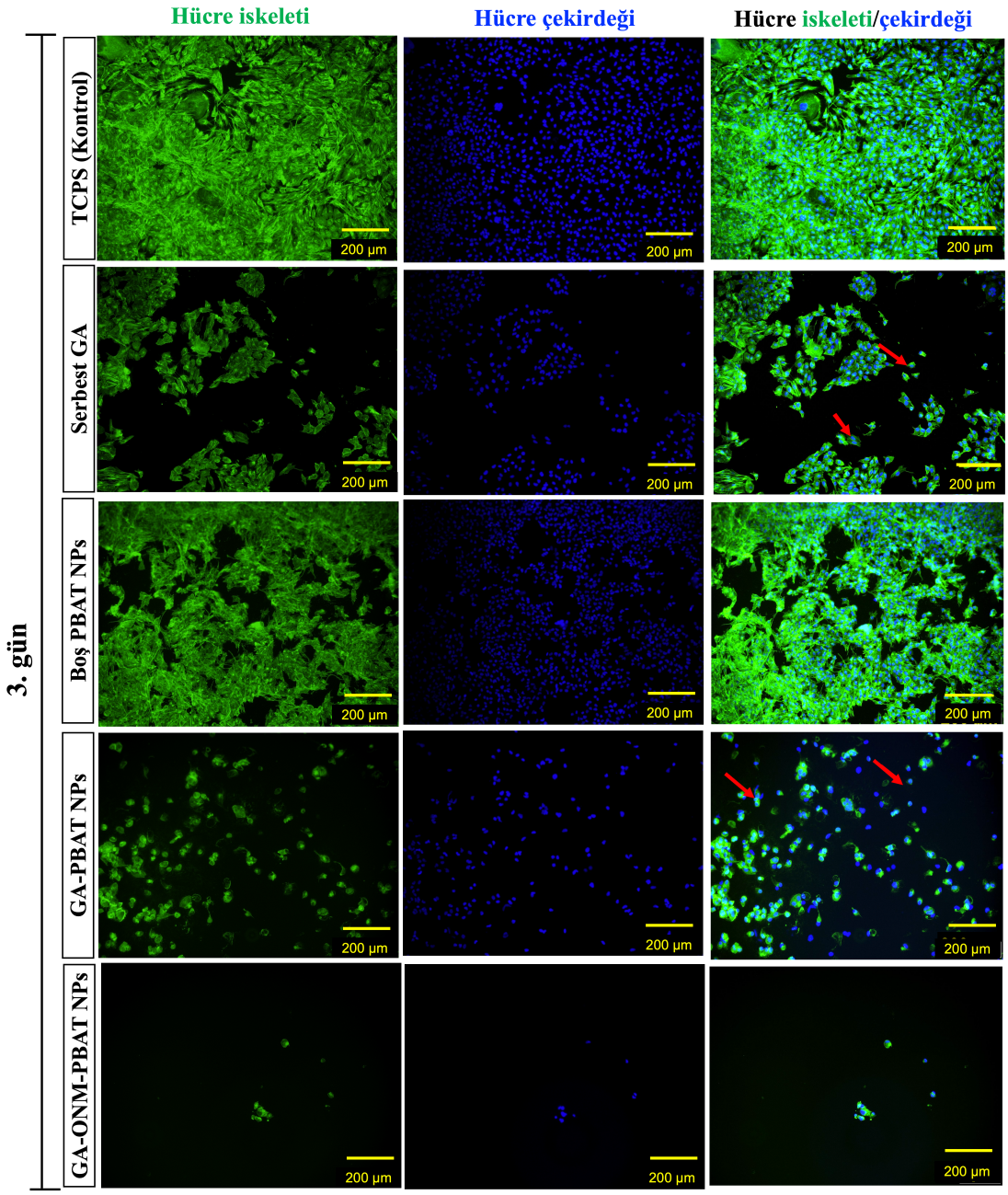
Üç günlük kültür süresinin sonunda T98G hücrelerinin optik mikroskop görüntüleri alınmıştır (**Şekil 4.55.b**). Görüntüler incelendiğinde kontrol grubu olarak TCPS üzerinde proliferasyon gösteren T98G hücreleri, hızlı bir büyüme göstermiş ve kültürün üçüncü gününde TCPS yüzeyinin büyük bir kısmını kaplamıştır. Buna karşılık, GA-ONM-PBAT

nanopartikülleri ile muamele edilen hücreler diğer gruplara kıyasla belirgin şekilde daha düşük hücre yoğunluğu sergilemiş, birçok hücrenin ölü olduğu ve yıkama sonrası yüzeyden ayrıldığı gözlemlenmiştir (**Şekil 4.55.b**).



Şekil 4.55. a) Nanopartiküllerin ve serbest GA'nın T98G hücrelerinin canlılığı üzerindeki etkisini gösteren MTT sonuçları (İstatistiksel olarak anlamlı farklar n=3 *$p<0,05$, **$p<0,01$, ***$p<0,001$; kontrol: TCPS), b) kültürün üçüncü gününde nanopartiküllerin ve serbest GA'nın T98G hücrelerinin canlılığı üzerindeki etkisini gösteren optik mikroskop görüntüleri; Kırmızı oklar yüzeyden kalkmakta olan hücreleri göstermektedir.

Nanopartiküllerin ve serbest GA'nın hücre morfolojisi üzerindeki etkileri, kültürün 3. gününde Alexa Fluor® 488 Phalloidin/DAPI boyaması ile incelenmiştir (**Şekil 4.56**).

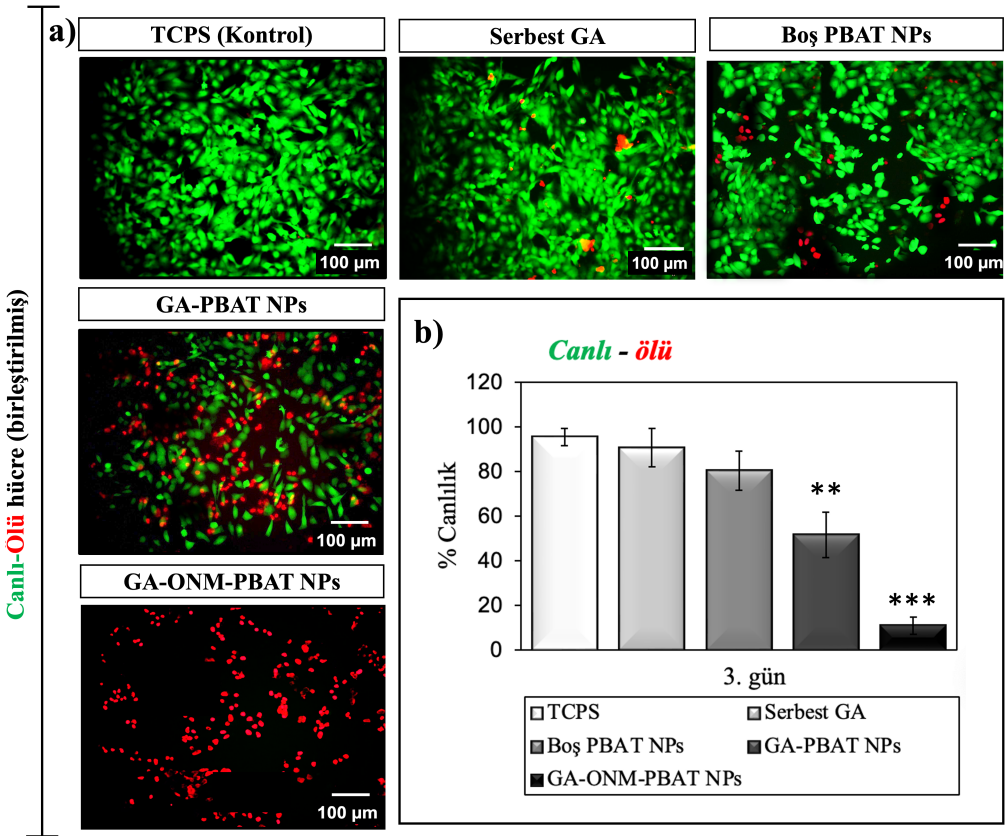


Şekil 4.56. Nanopartiküllerin ve serbest GA'nın T98G hücrelerinin morfolojisi üzerindeki etkisini gösteren Alexa Fluor® 488 Phalloidin/DAPI boyama görüntüleri. Kırmızı oklar parçalanan hücre zarlarını ve çekirdeklerini göstermektedir.

Çalışmalar GA ile muamele edilen hücrelerin komşu hücrelerden ayrılma ve kromatin yoğunlaşmasına bağlı olarak hücre çekirdeğinin küçülmesi ve hücrenin parçalanması gibi morfolojik değişiklikler sergilediğini belirtmiştir [307]. Tez çalışmasında da benzer bir

durum sergilenmiş ve **Şekil 4.56**'da görüldüğü gibi, GA-PBAT NPs grubundaki hücrelerde hücre zarlarının parçalanarak çekirdeklerin kaybolmaya başladığı gözlenmiştir. Bu durum apoptozun belirteci olarak ifade edilebilir. GA-ONM-PBAT NPs ile muamele edilen hücrelerin büyük çoğunluğunun apoptoz yoluyla öldüğü, hayatta kalan hücrelerin ise küçülmüş çekirdek yapıları ve bozulmuş hücre zarları ile ileri düzeyde morfolojik hasar gösterdiği gözlemlenmiştir.

Hücre canlılığını değerlendirmek amacıyla MTT analizine ek olarak, kültürün 3. gününde canlı/ölü boyama gerçekleştirilmiş ve floresan mikroskop görüntüleri **Şekil 4.57.a**'da sunulmuştur. Hücre canlılığının kantitatif analizi, canlı/ölü boyama verileri ve ImageJ yazılımı kullanılarak gerçekleştirilmiş, canlı ve ölü hücrelerin sayısal dağılımı analiz edilmiştir. Elde edilen sonuçlar, MTT analizi ile tutarlı olacak şekilde en düşük hücre canlılığının GA-ONM-PBAT NPs grubunda olmasını doğrulamış *(***p<0,001)* ve bu veriler grafiksel olarak **Şekil 4.57.b**'de sunulmuştur.



Şekil 4.57. Nanopartiküllerin ve serbest GA'nın T98G hücrelerinin canlılığı üzerindeki etkisini gösteren a) canlı/ölü boyama görüntüleri b) % canlılık grafiği. (İstatistiksel olarak anlamlı farklar n =3 **p<0,05*, ***p<0,01*, ****p<0,001*; kontrol: TCPS).

Şekil 4.57 incelendiğinde, GA içeren gruplarda T98G hücre canlılığının, GA içermeyen gruplara kıyasla belirgin şekilde azaldığı görülmektedir. Kontrol grubunda ağırlıklı olarak canlı hücreler (yeşil) tespit edilirken GA-ONM-PBAT NPs grubunda, diğer gruplara kıyasla ölü hücre oranında (kırmızı) belirgin bir artış gözlenmiştir. Ayrıca, ani hücre zarı yıkımı ve kültür ortamında hücre çekirdeklerinin serbest halde bulunması gibi nekroz belirtileri de gözlemlenmiştir.

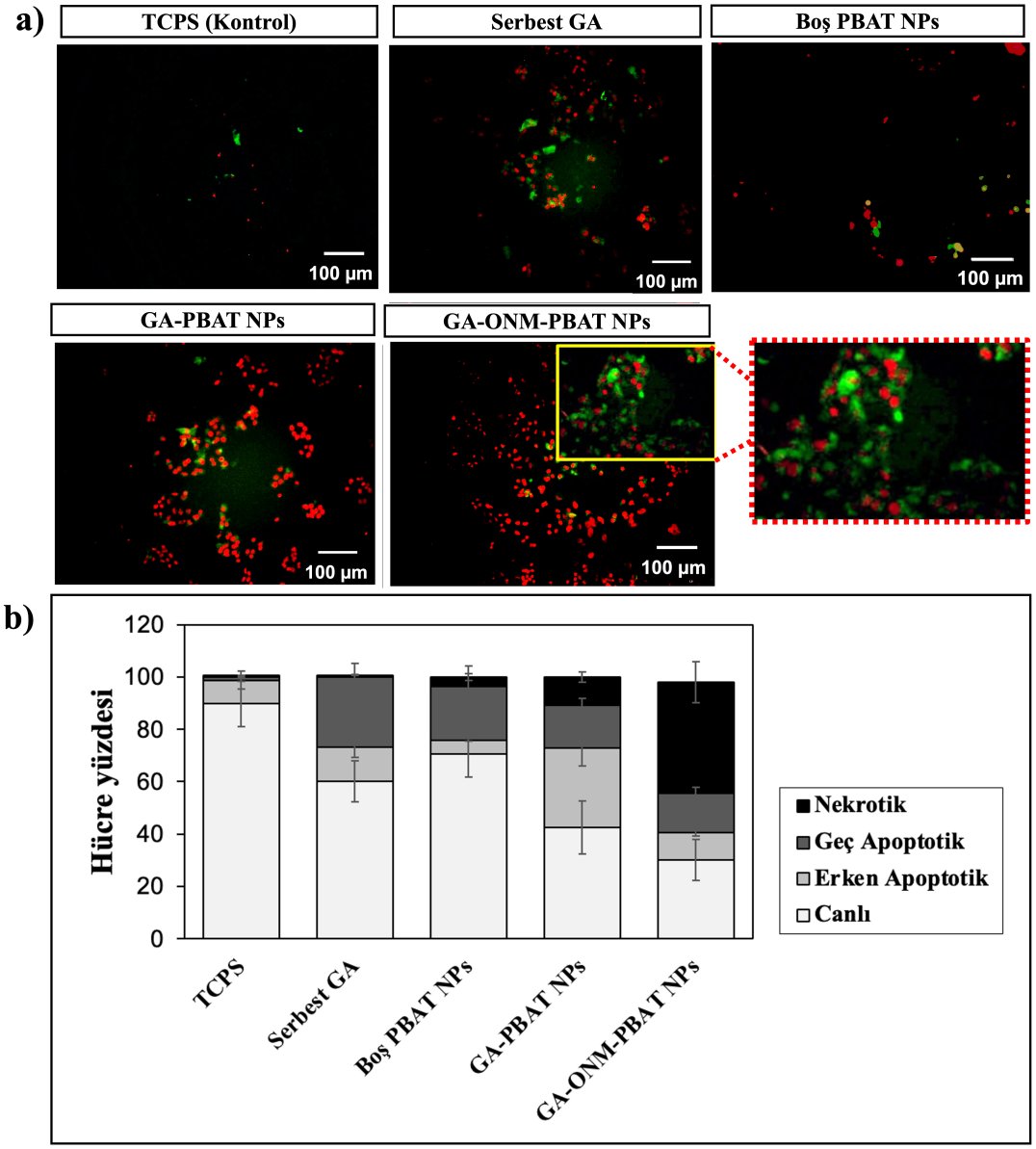
Sonuç olarak elde ettiğimiz bulgular, hipotezimizi doğrulayarak GA-ONM-PBAT NPs'nin T98G glioblastoma hücreleri üzerinde güçlü bir antikanser etki gösterme potansiyeline sahip olduğunu ortaya koymakta ve ONM'nin GA'nın T98G hücreleri üzerindeki sitotoksik etkisini artırmada önemli bir rol oynadığını desteklemektedir.

4.13.3.2. Apoptoz Tespiti: Anneksin V-FITC/PI Yöntemi

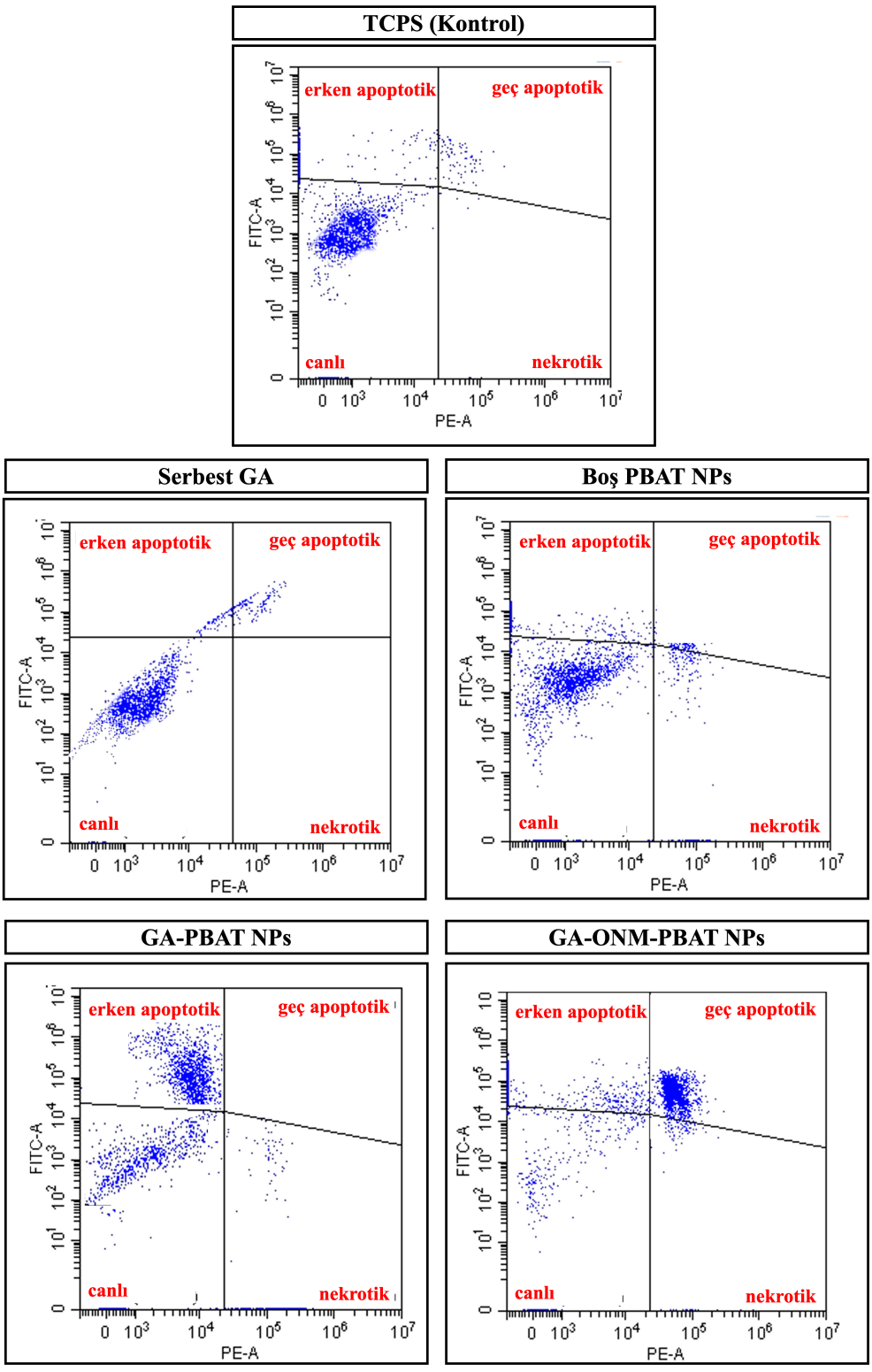
Nanopartiküllerle muamele edilen T98G hücrelerinde apoptoz ve nekroz süreçlerini değerlendirmek amacıyla kültürün 3. gününde, Annexin V-FITC/PI boyama yöntemi kullanılmıştır. **Şekil 4.58.a**'da sunulan sonuçlar, kontrol ve boş PBAT gruplarına kıyasla serbest GA ve GA-PBAT NPs gruplarında apoptoz evresindeki hücrelerin yoğunluğunda bir artış olduğunu göstermektedir. Çalışmanın tasarlanmasında öngörülen hipotezi doğrulayacak şekilde özellikle, GA'nın ONM ile birlikte nanopartikül yapısına dahil edilmesi, geç apoptoz ve nekrotik hücre ölümünde bir artışa yol açmıştır. GA-ONM-PBAT NPs ile muamele edilem grupta, hücre zar bütünlüğünün tamamen bozulması ve yoğun PI boyama (kırmızı) ile belirtilen geç apoptoz ve nekrotik hücre ölümünde belirgin bir artış gözlemlenmiştir.

Canlı, erken apoptoz, geç apoptoz ve nekrotik evrelerdeki hücrelerin kantitatif değerlendirmeleri akış sitometrisi analizi ile gerçekleştirilmiş ve sonuçlar **Şekil 4.58.b'de** grafiksel olarak gösterilmiştir. Ayrıca, T98G hücrelerinin erken apoptoz, geç apoptoz, nekroz ve canlılık durumlarını kuadrantlara ayırarak Annexin V-FITC ve PI arasındaki dağılımı gösteren nokta grafiği de **Şekil 4.59**'da sunulmuştur. Boş PBAT nanopartiküller, T98G hücrelerinde %5,4 erken apoptoz, %20,5 geç apoptoz ve %3,6 nekrotik hücre ölümüne neden olmuştur. Buna karşılık, GA-PBAT nanopartiküller ise %30,4 erken apoptoz, %16,4 geç apoptoz ve %10,7 nekrotik hücre ölümüne yol açmıştır. GA-ONM-

PBAT nanopartiküller ile muamele edilen hücrelerde ise, %10,4 erken apoptoz, %15,1 geç apoptoz ve dikkat çekici bir şekilde %42,4 nekrotik ölüm oranları gözlemlenmiştir.



Şekil 4.58. Kültürün 3. gününde T98G hücrelerine ait a) Annexin V-FITC/PI çift boyama görüntüleri, b) Annexin V-FITC/PI apoptoz tespit kiti ile akım sitometrisi kullanılarak yapılan apoptoz değerlendirmesi (apoptoz sürecinin tüm aşamalarındaki hücrelerin grafiksel temsili).



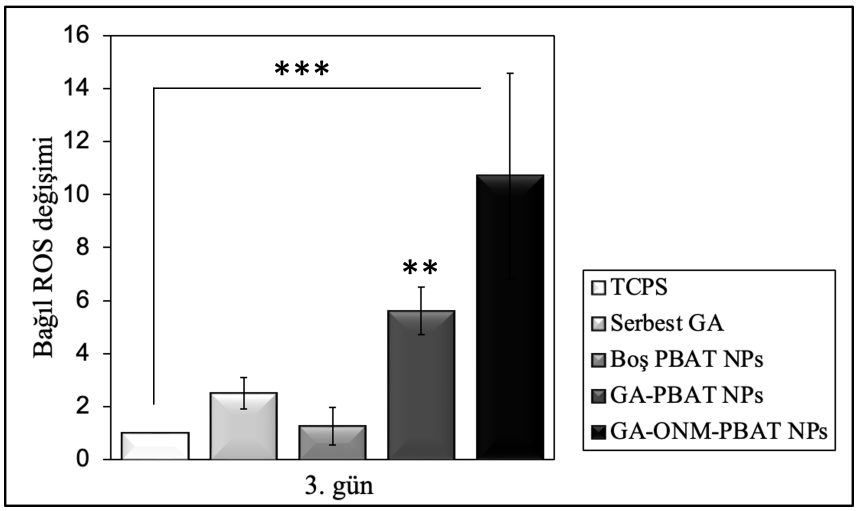
Şekil 4.59. Kültürün 3. gününde T98G hücrelerinin erken apoptoz, geç apoptoz, nekroz ve canlılık durumlarını kuadrantlara ayırarak Annexin V-FITC ve PI arasındaki dağılımı gösteren nokta grafiği.

Hücre ölümü profillerindeki bu farklılıklar, nanopartiküllerin hücresel yapılarla etkileşimi ile ilişkilidir. Gallik asitin oksidatif stres indüksiyonu ve mitokondriyal disfonksiyon gibi mitokondriyal aracılı apoptotik yolları tetikleyerek antikanser etkiler gösterdiği bilinmektedir [35, 308]. GA-PBAT nanopartiküllerde gözlenen erken apoptoz artışı, GA'nın hücre tarafından daha iyi alınması ve kontrollü salımı ile ilişkilidir.

Öte yandan, GA-ONM-PBAT nanopartikülleri ile gözlenen belirgin nekrotik etki, farklı bir etki mekanizmasını işaret etmektedir. ONM kaplamasının Alexa Fluor® 488 Phalloidin/DAPI boyama görüntüleri ile birlikte düşünülüğünde nanopartikül-hücre etkileşimlerini etkileyerek hücre zarının bütünlüğünü bozduğu ve nekrotik hücre ölümüne yol açtığı görülmüştür. Ayrıca, ONM oksidatif stres yanıtını artırarak apoptotik eşiği aşmasına ve kontrollü hücre ölümü yerine nekroza neden olmasına katkıda bulunmuştur.

4.13.3.3. ROS Analizi

Kültürün 3. gününde, nanopartiküllerle muamele edilen T98G hücrelerinde, hücrelerin oksidatif stres yanıtını, hasar düzeyini ve ilaçların/tedavilerin etkisini değerlendirmek amacıyla ROS analizi gerçekleştirilmiştir. ROS analizi sonuçları, GA-PBAT NPs (***p<0,01*) ve GA-ONM-PBAT NPs (****p<0,001*) gruplarında, kontrol grubuna kıyasla ROS aktivitesinin anlamlı şekilde arttığını göstermiştir (**Şekil 4.60**). En belirgin ROS artışı ise GA-ONM-PBAT NPs grubunda gözlemlenmiştir. Oksidatif stres koşullarında, mitokondrilerde üretilen ROS seviyeleri yükselmekte olup, bu durum hücresel strese yol açarak kanser hücrelerinin ölümünü tetikleyebilir. Literatürde GA ve fenolik bileşenlerin ROS, hücre içi Ca^{+2} konsantrasyonu ve mitokondriyal disfonksiyon ile ilişkili olduğu bildirilmiştir [308]. Mitokondriyal disfonksiyon, p53'ün apoptoz indüksiyon kapasitesini artırırken aynı zamanda nekroz sürecini de tetikleyebilir [199]. Bu bilgi ışığında, ONM varlığında GA-ONM-PBAT NPs grubunda gözlemlenen yüksek ROS aktivitesinin, p53 aktivitesini modüle ederek apoptotik yolların nekrotik yollara dönüşümünü indüklediği düşünülmektedir.



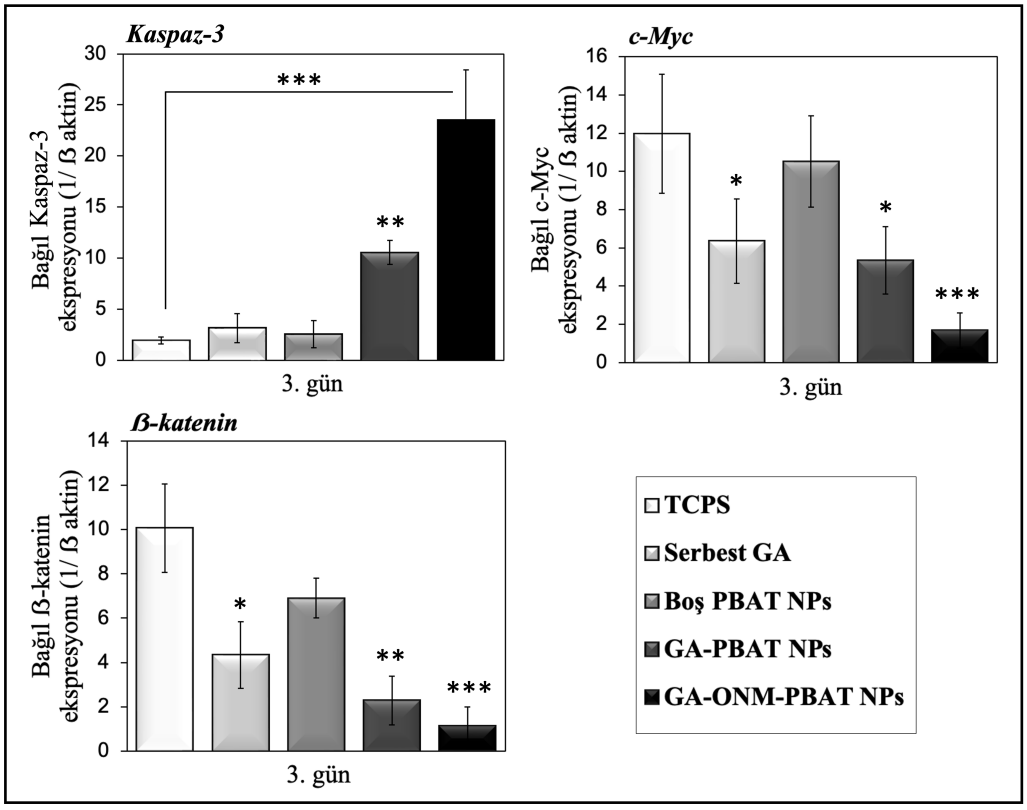
Şekil 4.60. Kültürün 3. gününde T98G hücrelerine ait bağıl ROS değişimi. (İstatistiksel olarak anlamlı farklar n =3 *$p<0,05$, **$p<0,01$, ***$p<0,001$; kontrol: TCPS).

4.13.3.4. Gerçek Zamanlı Polimeraz Zincir Reaksiyonu ile Gen İfadesi Analizi

GA ve ONM varlığında kültüre edilen T98G hücrelerinin gen ekspresyon düzeylerini belirlemek amacıyla, kültürün üçüncü gününde RT-PCR analizi yapılmış ve sonuçlar **Şekil 4.61**'de bağıl gen ifadeleri olarak sunulmuştur. RT-PCR analizi sonuçları, GA-PBAT ve GA-ONM-PBAT nanopartikül muamelesinin hücrelerin c-Myc ve β-katenin ekspresyonunu azalttığını, buna karşılık kaspaz-3 ekspresyonunu anlamlı düzeyde artırdığını göstermektedir. GA-PBAT NPs ile muamele edilen T98G hücrelerinde kaspaz-3 ekspresyonu, kontrol grubuna kıyasla belirgin şekilde daha yüksek bulunmuş olup, bu artış istatistiksel olarak anlamlıdır *(**$p < 0,01$)*. En yüksek kaspaz-3 gen ekspresyonu ise GA-ONM-PBAT NPs grubunda gözlemlenmiş ve kontrol grubuna göre yaklaşık 20 kat artış göstermiştir (***$p < 0,001$). Apoptoz, programlı hücre ölümü mekanizmasının bir formu olup, bu süreçte kaspaz sinyal yolu aktive edilmektedir. Kaspaz-3, apoptoz mekanizmasında kilit rol oynayan ana yıkım proteazlarından biri olarak tanımlanır [309].

Kültür süresince, serbest GA, GA-PBAT ve GA-ONM-PBAT nanopartikülleriyle muamele edilen T98G hücrelerinde c-Myc ve β-katenin ekspresyon seviyeleri azalmıştır. Özellikle, c-Myc ve β-katenin'in en düşük ekspresyon seviyeleri GA-ONM-PBAT nanopartikülleri grubunda gözlemlenmiş (***$p<0,001$), kontrol grubu (TCPS) ile karşılaştırıldığında, bu azalmalar sırasıyla yaklaşık 6 kat ve 7 kat olarak ölçülmüştür. c-

Myc, hem hücre proliferasyonunu hem de apoptozu düzenleyen bir proteindir; β-katenin ise gen transkripsiyonunu ve hücre-hücre adezyonunu etkileyen Wnt sinyal yolunun kilit bileşenidir. Sağlıklı hücrelerde, c-Myc ve β-katenin genellikle düşük seviyelerde ifade edilirken, ileri evre kanserlerde bu proteinlerin aşırı ekspresyonu yaygın olarak gözlemlenmektedir Yapılan tedavi sonrasında ise, kanser hücrelerindeki bu proteinlerin ekspresyon seviyeleri azalma eğilimi sergilemektedir [310].



Şekil 4.61. Kültürün 3. gününde T98G hücrelerine ait bağıl Kaspaz-3, c-Myc ve β-katenin gen ifadeleri. (İstatistiksel anlamlı farklılıklar n = 3, *$p<0,05$, **$p<0,01$, ***$p<0,001$; kontrol: TCPS).

Literatürdeki çalışmalar, GA'nın hücre tipine bağlı olarak çeşitli mekanizmalarla apoptozu indüklediğini göstermektedir [35]. GA, insan glioma hücrelerinde hücre proliferasyonu, invazyon ve hayatta kalma için kritik olan Ras/MAPK (Ras / Mitojen-Aktive Protein Kinaz) ve PI3K/AKT (Fosfoinozitid 3-kinaz / Protein Kinaz B (AKT)) sinyal yollarını baskılamakta; aynı zamanda NF-kB aktivitesini inhibe ederek Bax, P53 ve kaspazların ekspresyonunu artırırken Bcl-2 düzeylerini düşürmektedir [39, 166]. Bu

değişiklikler, kanser hücrelerinde apoptozu tetikleyerek GA'nın terapötik ajan olma potansiyelini ortaya koymaktadır.

Öte yandan, ONM'nin kanser hücreleri üzerindeki etkilerini açıklayan spesifik moleküler mekanizmalar henüz tam olarak aydınlatılamamış olsa da, araştırmalar *Opuntia ficus indica*'dan elde edilen bileşiklerin çeşitli kanser hücre hatlarında sitotoksik etkilere sahip olduğunu vurgulamaktadır [311].

Tez çalışması kapsamında elde edilen RT-PCR sonuçları, ONM ve GA varlığında sentezlenen GA-ONM-PBAT nanopartiküllerinin glioblastoma hücrelerinde c-Myc ve β-katenin ekspresyonunu azaltarak Wnt sinyal yolunu baskıladığını ve kaspaz yolunu aktive ederek hücre proliferasyonunu düşürüp apoptozu indüklediğini göstermektedir. Sonuçlarımıza dayanarak, partiküler sistemler ile glioblastoma tedavisi için GA ve ONM'nin kombine olarak kullanıldığı ONM kaplı ve GA yüklü nanopartiküllerin yalnızca GA yüklü nanopartiküllere kıyasla daha etkili bir tedavi sunduğu söylenebilir.

4.14. PBAT Nanopartikül Yüklü *Sarcotragus foetidus* Sponjin Doku İskelelerinin Üretimi, Karakterizasyonu ve *İn Vitro* Hücre Kültür Çalışmaları

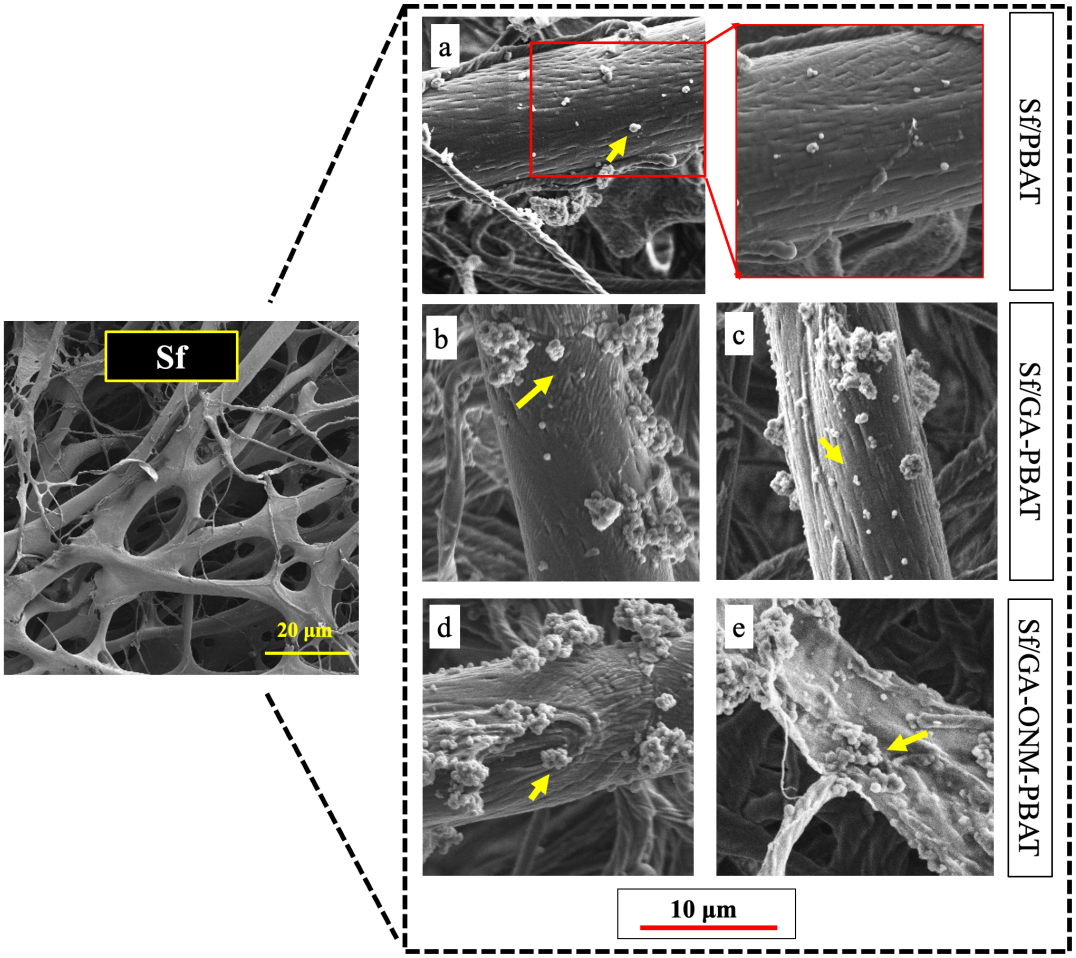
4.14.1. Sponjin Doku İskelelerine PBAT Nanopartiküllerin Yüklenmesi

Bu bölümde kullanılan *Sarcotragus foetidus* sponjin doku iskeleleri, **Bölüm 3.3**'te açıklanan yöntemle üretilmiştir. Karakterizasyon sonuçlarına göre, üç boyutlu yapısını koruyan ve en yüksek hücre canlılığı gösteren Sf/0.5 grubunu temsil eden kaplanmamış Sf sponjin iskelelere nanopartikül yüklemesi yapılmıştır. Boş PBAT, GA-PBAT ve GA-ONM-PBAT nanopartikülleri, saf su içerisinde yüksek hızlı homojenizatör ile dağıtılarak, emdirme yöntemiyle sponjin doku iskelelerine (2 mm yükseklik, 9 mm çap) 1 mg nanopartikül olacak şekilde yüklenmiştir.

4.14.2. Nanopartikül Yüklü Doku İskelelerinin Karakterizasyonu

4.14.2.1. SEM Analizi

Nanopartiküllerin iskele içerisindeki dağılımını incelemek amacıyla, boş PBAT, GA-PBAT ve GA-ONM-PBAT nanopartikül yüklü sponjin iskelelerinden (Sf/PBAT, Sf/GA-PBAT ve Sf/GA-ONM-PBAT) kesitler alınmış, altın-paladyum kaplama sonrası farklı büyütmelerde görüntülenmiştir. Nanopartikül yüklü Sf doku iskelelerine ait SEM görüntüleri **Şekil 4.62**'de sunulmuştur.



Şekil 4.62. Nanopartikül yüklü doku iskelelerine ait SEM görüntüleri a) Sf/PBAT, b,c) Sf/GA-PBAT ve d,e) Sf/GA-ONM-PBAT doku iskeleleri. Sarı oklar doku iskeleleri içerisindeki nanopartikülleri işaret etmektedir.

Şekil 4.62'de sunulan SEM görüntüleri incelendiğinde, nanopartikül yükleme işlemi sonrasında PBAT nanopartiküllerinin Sf iskele yapısına başarıyla entegre olduğu gözlemlenmiştir. Yalnızca boş PBAT nanopartiküllerinin yüklendiği Sf/PBAT iskelelerde,

nanopartiküllerin iskele yüzeyine homojen şekilde dağıldığı belirlenmiştir. Ancak GA-PBAT ve GA-ONM-PBAT nanopartiküllerinin yüklenmesiyle birlikte, iskelelerde nanopartikül aglomerasyonunun arttığı ve bazı bölgelerde partiküllerin bir araya gelerek lokal yoğunluk oluşturduğu görülmüştür. Nanopartiküllerin homojenliğinin Sf/PBAT iskele grubunda daha iyi olmasına karşın, GA ve ONM eklenen gruplarda aglomerasyonun artması, sistemdeki yüzey özelliklerindeki değişimle açıklanabilir. Özellikle GA gibi polifenolik bir molekülün ve ONM gibi polisakkarit yapılı doğal bir kaplamanın nanopartikül yüzeyinde hidrofilik/hidrofobik dengesini değiştirmesi, partiküller arasında çekim kuvvetlerini artırarak aglomerasyona neden olmuş olabilir. Bu durum, nanopartiküllerin iskele yapısında daha düzensiz bir şekilde birikmesine yol açmıştır.

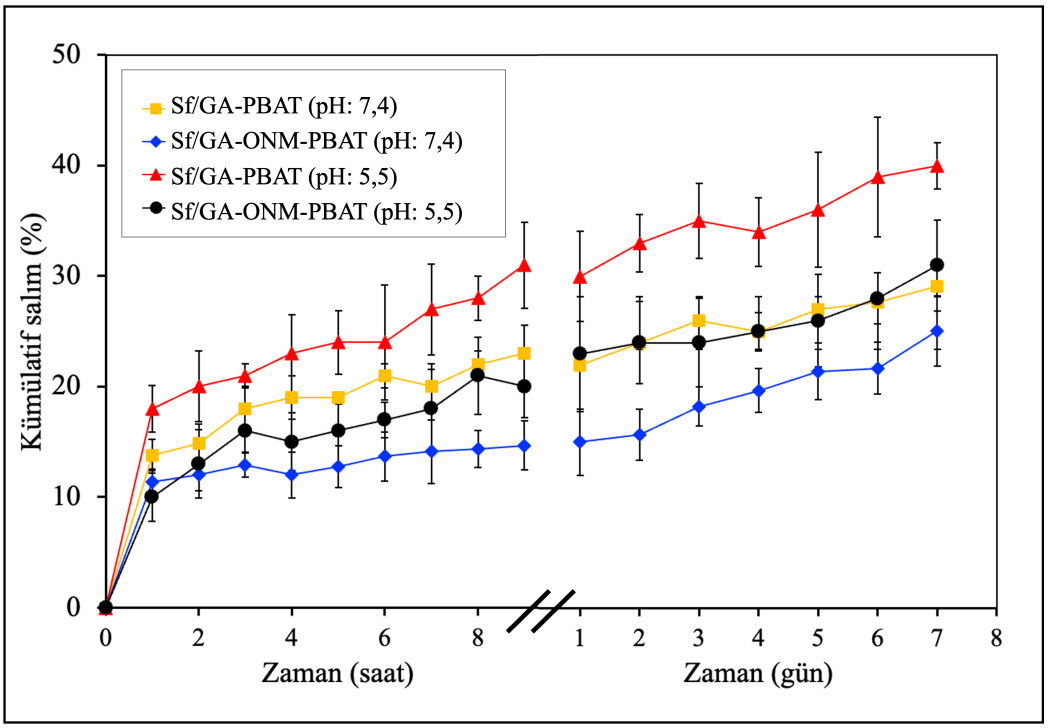
SEM analizleri doğrultusunda, iskelelere daha yüksek miktarda PBAT nanopartikül yüklemesinin mümkün olabileceği düşünülmüş, ancak nanopartiküllerin iskele içerisinde aşırı birikerek aglomerasyon oluşturabileceği ve bunun da gözenek yapısını olumsuz etkileyebileceği öngörüldüğü için yükleme miktarı artırılmamıştır. Bu yaklaşım ile hem iskelelerin üç boyutlu yapısal bütünlüğünün korunması hem de hücresel infiltrasyonu destekleyen açık gözenekli yapıların devamlılığı sağlanmıştır.

4.14.2.2. *İn Vitro* GA Salım Çalışmaları ve Salım Kinetiğinin İncelenmesi

Doku iskelelerinden fizyolojik (pH 7,4) ve asidik (pH 5,5) ortamlarda GA salım kinetiği, 7 gün süren *in vitro* çalışmalarla belirlenmiştir. Analizler üç paralel tekrarla gerçekleştirilmiş ve elde edilen sonuçlar, ortalama ± standart sapma olarak, zamana karşı kümülatif salım yüzdesi şeklinde **Şekil 4.63**'te sunulmuştur. Ayrıca, fizyolojik ve asidik ortamlarda salınan GA miktarları (mikrogram GA / iskele) ise **Çizelge 4.21**'de yer almaktadır.

Her iki doku iskelesinde de (Sf/GA-PBAT ve Sf/GA-ONM-PBAT), GA'nın salım profili, nanopartiküllerdeki salım profiline benzer şekilde, başlangıçta hızlı bir salımı takiben daha yavaş ve sürekli bir salım süreci şeklinde gerçekleşmiştir (**Şekil 4.63**). İlk 24 saat içinde, Sf/GA-PBAT doku iskelelerinden yaklaşık %22 oranında GA salımı gerçekleşirken, Sf/GA-ONM-PBAT iskelelerinde bu oran biraz daha düşük, yaklaşık %15 olarak gözlemlenmiştir (pH 7,4). Asidik pH'ta (pH 5,5) ise GA salımı artarak, Sf/GA-

PBAT doku iskelelerinden yaklaşık %30 ve Sf/GA-ONM-PBAT iskelelerinden yaklaşık %23 oranında gözlenmiştir. Nanopartiküllerde olduğu gibi, ONM kaplaması nanopartikül çapını artırarak ilaç difüzyon yolunu uzatmış ve GA'nın başlangıçtaki hızlı salımını azaltmıştır [246].



Şekil 4.63. Sünger doku iskelelerinden fizyolojik ve asidik ortamlarda kümülatif GA salım grafiği (n=3).

Yedi günün sonunda pH 7,4'te, Sf/GA-PBAT doku iskelelerinden toplam GA salımı yaklaşık %29 olarak, Sf/GA-ONM-PBAT iskelelerinden ise yaklaşık %25 olarak ölçülmüştür. Asidik koşullar altında (pH 5,5) ise bu değerler, sırasıyla %40 ve %31'e yükselerek daha hızlı bir salım profili gözlenmiştir. Bu hızlı salım, yapıdaki ester bağlarının asidik ortamda parçalanmasından ileri gelmektedir [303]. Her iki ortamda da (pH 7,4 ve 5,5), GA-ONM-PBAT nanopartikül içeren doku iskelelerinden salımın, GA-PBAT nanopartikül içeren iskele grubuna göre daha kontrollü ve yavaş gerçekleştiği gözlenmiştir. Bu durum, difüzyon yolunun uzaması ile açıklanmaktadır.

Çizelge 4.21. Fizyolojik ve asidik ortamda sünger doku iskelelerinden toplam salınan GA miktarı (n=3) (µg GA/iskele).

Fizyolojik ortam / **Doku iskelesi**	**1 sa**	**24 sa**	**48 sa**	**72 sa**	**7 gün**
Sf/GA-PBAT	12,4 ± 2,1	19,8 ± 1,2	21,6 ± 3,3	23,4 ± 1,3	26,2 ± 1,2
Sf/GA-ONM-PBAT	10,3 ± 1,0	13,5 ± 2,4	14,1 ± 2,8	16,4 ± 2,1	22,6 ± 1,9
Asidik ortam / **Doku iskelesi**	**1 sa**	**24 sa**	**48 sa**	**72 sa**	**7 gün**
Sf/GA-PBAT	16,2 ± 3,0	27,1 ± 2,8	29,7 ± 2,2	31,5 ± 1,5	36,6 ± 2,6
Sf/GA-ONM-PBAT	11,9 ± 1,9	21,9 ± 3,0	24,8 ± 2,4	29,2 ± 2,1	31,9 ± 3,1

Sf/GA-PBAT ve Sf/GA-ONM-PBAT doku iskelelerinden elde edilen kümülatif GA salım verileri, sıfırıncı derece, birinci derece, Higuchi ve Hixson-Crowell gibi çeşitli ilaç salım modelleri kullanılarak matematiksel olarak analiz edilmiştir. Salım kinetiklerine göre elde edilen grafiklerin doğrusal regresyon katsayıları (R^2) 1'e en yakın olan model, salım kinetiğini en iyi ifade eden model olarak belirlenmiştir. Bu modellerin hız sabitleri ve doğrusal regresyon katsayıları, **Çizelge 4.22**'de özetlenmiştir.

Çizelge 4.22 incelendiğinde, pH 7,4 ve 5,5 koşullarında hem Sf/GA-PBAT hem de Sf/GA-ONM-PBAT doku iskelelerinde en yüksek R^2 değerlerinin Higuchi kinetik modeline ait olduğu görülmüştür. Bu bulgu, her iki doku iskelesinden GA salımının, difüzyon temelli bir mekanizma olan Higuchi modeline uygun olarak gerçekleştiğini göstermektedir.

Çizelge 4.22. Fizyolojik ve asidik ortamda doku iskelelerinin GA salım kinetik modelleri.

Farklı salım kinetiği modellerinden elde edilen kinetik parametreler								
a) Fizyolojik ortam (pH 7,4)								
Doku iskelesi	**Sıfırıncı derece**		**Birinci derece**		**Higuchi**		**Hixson-Crowell**	
	R^2	**k ($\mu g.h^{-1}$)**	**R^2**	**k (h^{-1})**	**R^2**	**k ($\mu g.h^{-1/2}$)**	**R^2**	**k ($h^{-1/3}$)**
Sf/GA-PBAT	0,9083	0,0076	0,8935	0,0108	0,9690	0,1719	0,9540	0,0009
Sf/GA-ONM-PBAT	0,8429	0,0098	0,8242	0,0011	0,9016	0,1938	0,8807	0,0012
b) Asidik ortam (pH 5,5)								
Doku iskelesi	**Sıfırıncı derece**		**Birinci derece**		**Higuchi**		**Hixson-Crowell**	
	R^2	**k ($\mu g.h^{-1}$)**	**R^2**	**k (h^{-1})**	**R^2**	**k ($\mu g.h^{-1/2}$)**	**R^2**	**k ($h^{-1/3}$)**
Sf/GA-PBAT	0,8703	0,0152	0,8176	0,0104	0,9173	0,1345	0,9001	0,0098
Sf/GA-ONM-PBAT	0,8179	0,0109	0,7908	0,0015	0,8989	0,1754	0,8603	0,0111

4.14.3. T98G Hücreleri ile Yürütülen Hücre Kültür Çalışmaları

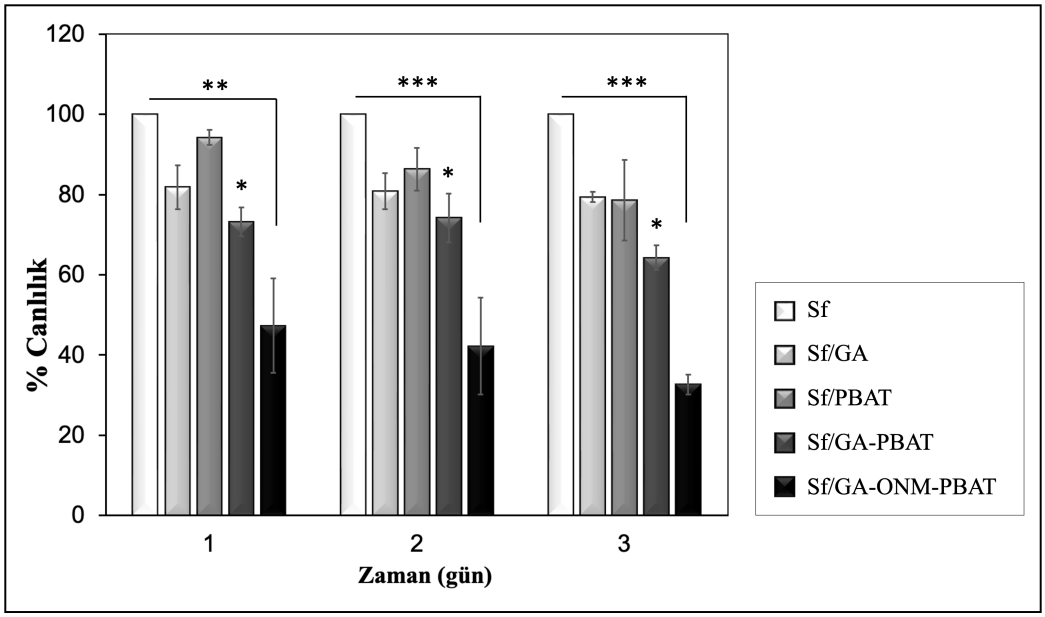
Nanopartikül yüklü doku iskelelerinin T98G glioblastoma hücrelerinin proliferasyonu üzerindeki etkileri üç günlük *in vitro* çalışma ile incelenmiştir. Kontrol grubu olarak ise Sf doku iskelesi üzerinde kültüre edilen hücreler kullanılmıştır. Hücre kültür çalışmalarında 5 farklı doku iskelesi kullanılmıştır. Bu iskeleler şu şekildedir:

1. GA, ONM ve PBAT nanopartikül içermeyen doku iskelesi: Sf
2. Serbest GA yüklü doku iskelesi: Sf/GA
3. Boş PBAT nanopartikül yüklü doku iskelesi: Sf/PBAT
4. GA-PBAT nanopartikül yüklü doku iskelesi: Sf/GA-PBAT
5. GA-ONM-PBAT nanopartikül yüklü doku iskelesi: Sf/GA-ONM-PBAT

4.14.3.1. MTT Analizi

Kültür süresi boyunca her gün gerçekleştirilen mitokondriyal aktivite testleri ile, hücrelerin doku iskeleleri içerisindeki canlılık düzeyleri ile doku iskelelerinden salınan

GA ve ONM'nin hücre canlılığı üzerindeki etkileri değerlendirilmiştir. Elde edilen veriler grafiksel olarak **Şekil 4.64**'te verilmiştir.



Şekil 4.64. T98G hücrelerinin 3 günlük MTT sonuçları. (İstatistiksel olarak anlamlı farklar, n =3 *$p<0,05$, **$p<0,01$, ***$p<0,001$, Sf kontrol grubu iken).

Şekil 4.64'te sunulan MTT analizi sonuçlarına göre, kültürün 1., 2. ve 3. günlerinde, kontrol grubu (Sf) ile karşılaştırıldığında, Sf/GA-PBAT ve Sf/GA-ONM-PBAT doku iskeleleri üzerinde çoğaltılan hücrelerin canlılık oranlarında anlamlı bir azalma gözlemlenmiştir. Özellikle Sf/GA-ONM-PBAT grubunda hücre canlılığı, kültür süresi boyunca diğer gruplara kıyasla en düşük seviyelerde bulunmuştur.

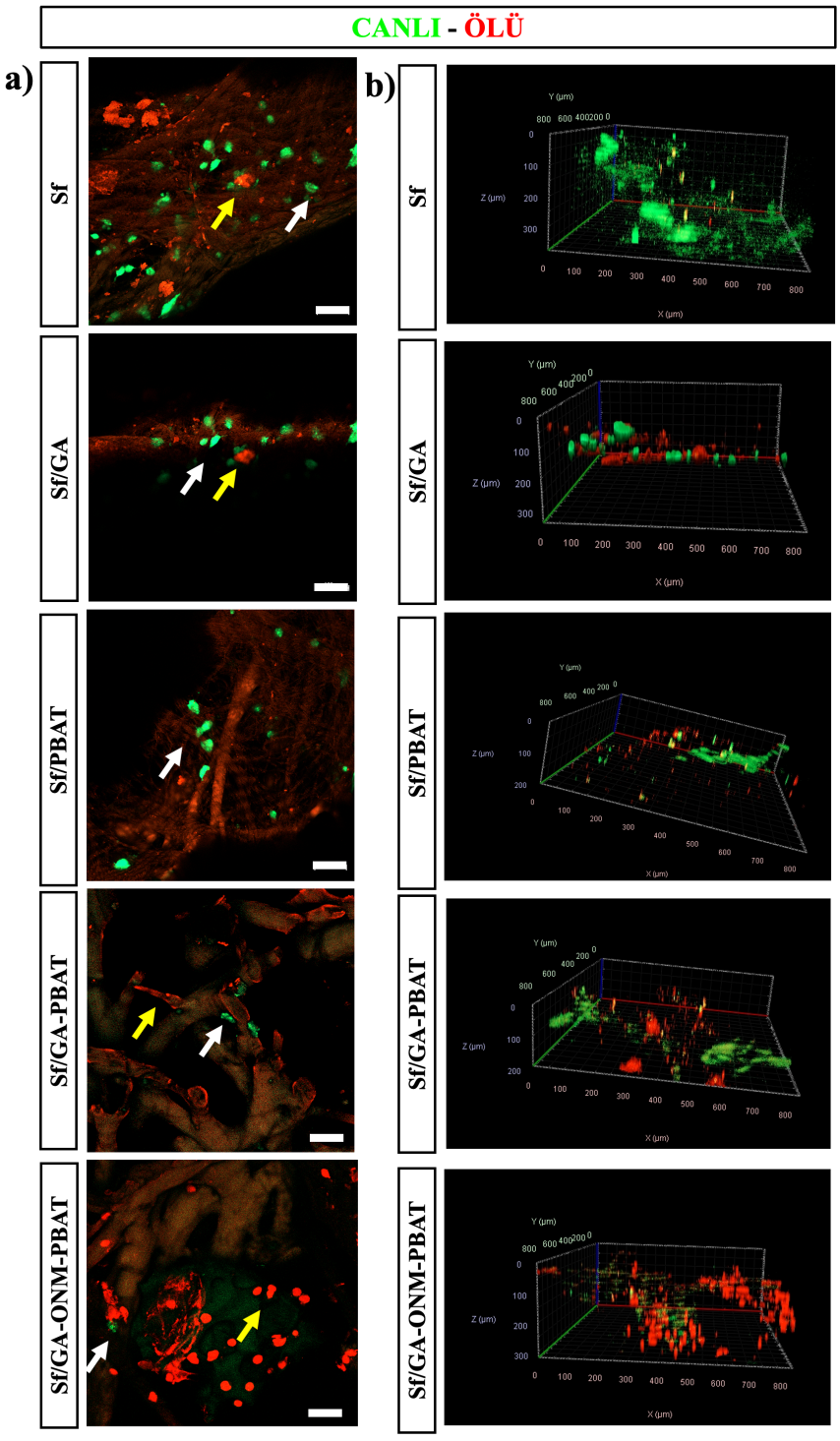
Kültürün 1. gününden itibaren gözlenen bu azalma, GA'nın bilinen antiproliferatif ve sitotoksik etkileri ile açıklanabilir. GA, birçok çalışmada apoptozis indüksiyonu, hücre döngüsünün durdurulması ve reaktif oksijen türlerinin artışı yoluyla kanser hücrelerinde sitotoksisite oluşturduğu bildirilmiştir. Çalışmamızda partikül kaplama materyali olarak kullandığımız ONM'nin, GA'nın kontrollü salımını uzatarak ve hücrelere sürekli bir stres yükleyerek GA'nın etkisini artırdığı görülmektedir. Bu durum, özellikle Sf/GA-ONM-PBAT iskele grubunda gözlenen daha belirgin canlılık azalmasını açıklamaktadır.

Buna karşın, boş PBAT nanopartikülleri yüklenen Sf/PBAT grubunda canlılık değerleri kontrol grubuna daha yakın seyretmiş ve anlamlı bir sitotoksik etki gözlenmemiştir. Bu sonuç, PBAT polimerinin biyouyumlu olduğunu ve boş nanopartiküllerin hücresel canlılık üzerinde toksik bir etki oluşturmadığını desteklemektedir.

4.14.3.2. Konfokal Lazer Taramalı Mikroskop (CLSM) ile Analiz

Hücre canlılığını değerlendirmek amacıyla, kültürün 3. gününde MTT analizine ek olarak canlı/ölü boyama yapılmış ve hücreler 600 μm iskele derinliğine kadar konfokal lazer taramalı mikroskop ile görüntülenmiştir. Elde edilen sonuçlar **Şekil 4.65**'te sunulmuştur. Gallik asit içeren iskele gruplarında, GA içermeyen gruplara kıyasla T98G hücre canlılığında anlamlı bir azalma gözlemlenmiştir. Özellikle, Sf/GA-ONM-PBAT grubunda diğer gruplara göre ölü hücrelerin (kırmızı) belirgin şekilde arttığı, buna karşın Sf/GA-PBAT ve diğer gruplarda daha fazla canlı hücrelerin (yeşil) bulunduğu görülmüştür. Bu sonuçlar, önceki bulgularımızı destekleyerek GA ve ONM'nin sinerjik etkisinin ölü hücre oranını artırdığını açıkça göstermektedir.

Genel olarak, tez çalışmasından elde edilen bulgular, kontrollü salım sistemleri kullanılarak GA'nın etkili bir şekilde hücrelere taşındığını ve biyomühendislik uygulamalarında, özellikle antikanserojen amaçlı sistemlerin geliştirilmesinde nanopartikül/iskele bazlı taşıyıcı sistemlerin etkin bir strateji sunabileceğini göstermektedir. Özellikle ONM kaplı GA yüklü nanopartiküllerle oluşturulan üç boyutlu iskele sistemlerinin, yalnızca GA yüklü nanopartikül içeren yapılara kıyasla glioblastoma tedavisinde daha yüksek bir terapötik etki sağladığı belirlenmiştir. Geliştirilen bu sistemler, GA'nın kontrollü salımı ve ONM'nin katkısı sayesinde kanser hücrelerinin canlılığını daha etkin şekilde azaltarak lokal tedavi uygulamaları için umut vadetmektedir. Ayrıca, elde edilen veriler *Sarcotragus foetidus* süngerinden izole edilen sponjin iskelelerin, yumuşak doku kanseri olan glioblastoma tedavisinde biyouyumluluk ve destekleyici yapı özellikleri açısından uygun bir alternatif olduğunu ortaya koymaktadır.



Şekil 4.65. Doku iskelelerinde kültüre edilen T98G hücrelerinin üçüncü gün canlı-ölü boyama görüntüleri. (Beyaz oklar canlı hücreleri, sarı oklar ise ölü hücreleri göstermekte olup; yapılan analizde canlı hücreler yeşil, ölü hücreler ise kırmızı renkte boyanarak belirlenmiştir).

5. YORUM

Sunulan tez çalışmasında, *Sarcotragus foetidus* süngerinden izole edilen doğal sponjin yapılar, biyomalzeme olarak değerlendirilmiş ve kemik ve yumuşak doku mühendisliği ile lokal kanser tedavisi uygulamaları için çok amaçlı sistemler olarak tasarlanmıştır.

Çalışmanın ilk aşamasında sünger iskeletlerinden sponjin bazlı doku iskeleleri elde edilmiş, farklı modifikasyonlarla (HAp ve B-HAp kaplama) biyohibrit doku iskeleleri üretilmiştir. Ardından, iskelelerin yapısal, mekanik ve biyolojik özellikleri detaylı bir şekilde karakterize edilmiştir. Çalışma bulguları şu şekilde özetlenebilir:

- İlk olarak, doku iskelelerinin su alım kapasitesi, gözenek boyutu ve gözeneklilik oranları değerlendirilmiş ve iskelelerin yüksek oranda su tutma kapasitesine sahip olduğu belirlenmiştir. HAp ve B-HAp kaplamalarının iskelelerin şişme kapasitesini artırdığı, ancak gözeneklilik oranlarında anlamlı bir düşüşe neden olmadığı gözlemlenmiştir.
- Tüm gruplarda %70'in üzerinde bağlantılı gözeneklilik oranı ile birlikte uygun gözenek açıklıkları olduğu gözlenmiştir. Yapısal bütünlüğü koruyan bu üç boyutlu iskelelerin, hücrelerin penetrasyonunu ve besin/metabolit taşınımını desteklediği sonucuna ulaşılmıştır. Özellikle B-HAp kaplı iskelelerin daha küçük apatitleşmiş kristaller oluşturması sayesinde gözenek açıklıklarının korunabildiği ve böylece hücresel infiltrasyonu daha fazla desteklediği görülmüştür.
- Elementel analizlerde, karbon, oksijen, kalsiyum ve fosforun yanı sıra B-HAp kaplı grupta bor elementinin de başarıyla yapıya tutunduğu doğrulanmıştır.
- Mekanik testler sonucunda, HAp ve B-HAp kaplamalarının iskelelerin elastik modülünü anlamlı şekilde artırdığı ve bu değerin Sf/HAp için yaklaşık 20 kPa, Sf/B-HAp için ise 22 kPa olduğu tespit edilmiştir. Bu mekanik iyileşme, doku mühendisliği uygulamaları için iskelelerin daha uygun hale gelmesini sağlamıştır.
- Hücre kültürü çalışmaları kapsamında, MC3T3-E1 preosteoblast hücreleri kullanılarak iskelelerin biyouyumlulukları ve osteojenik potansiyelleri incelenmiştir. MTT analizleri, sponjin bazlı iskelelerin hücre canlılığını desteklediğini ve özellikle B-HAp kaplı iskelelerde proliferasyonun daha fazla olduğunu ortaya koymuştur. SEM görüntüleri ise hücrelerin iskele gözeneklerine başarılı bir şekilde infiltrasyon

gösterdiğini ve ekstrasellüler matriks üretiminin özellikle kaplı iskelelerde daha belirgin olduğunu desteklemiştir. ALP aktivitesi ve hidroksiprolin miktarı analizleri, osteojenik farklılaşmanın ve matriks sentezinin özellikle kaplamalı iskelelerde zamanla arttığını göstermiştir. RT-PCR analizleri de *Col1a1* ve *Ocn* gen ekspresyonlarının B-HAp kaplı iskelelerde anlamlı şekilde arttığını (yaklaşık 2,5 kat; $p<0,05$) ortaya koyarak, osteojenik farklılaşmayı moleküler düzeyde doğrulamıştır.

- MC3T3-E1 hücrelerinin iskelelerdeki canlılık ve osteojenik farklılaşma potansiyeli histolojik boyamalarla nitel olarak da değerlendirilmiştir. Hematoksilen&eozin boyaması, tüm iskele gruplarında hücrelerin yüzeye tutunduğunu, çoğaldığını ve yapı boyunca organize olduğunu göstermiş; özellikle B-HAp kaplı iskelelerde daha yoğun hücresel yerleşim ve ECM üretimi gözlenmiştir. ALP boyamaları, 21. günde osteojenik farklılaşmanın erken evresinin devam ettiğini ve B-HAp kaplı gruplarda ALP aktivitesinin belirgin şekilde arttığını ortaya koymuştur. Alizarin Red boyaması, tüm gruplarda kalsiyum birikimini gösterirken, en yoğun mineralizasyonun Sf/B-HAp grubunda olduğu belirlenmiştir. Von Kossa boyamasında ise kaplamalı iskelelerde, özellikle B-HAp grubunda, yoğun mineralize alanlar gözlenmiştir. Bu histolojik bulgular, kaplama işlemlerinin hücresel organizasyon, osteoblastik farklılaşma ve matriks mineralizasyonu üzerinde olumlu etkiler yarattığını göstermiş; RT-PCR sonuçlarıyla da uyumlu şekilde, özellikle B-HAp kaplamanın sponjin yapı ile sinerjik etki oluşturarak osteojenik süreci desteklediğini doğrulamıştır.
- Yapılan antibakteriyel analizler sonucunda hem *E. coli* hem de *S. aureus* bakterilerine karşı sponjin bazlı iskelelerin bakteriyostatik etki gösterdiği ve B-HAp kaplamanın antibakteriyel etkinliği artırdığı belirlenmiştir.

Çalışmanın ikinci bölümünde, literatürdeki yöntemlere kıyasla daha kısa sürede ve daha yüksek verimle *Sarcotragus foetidus* süngerinden kolajen izolasyonu gerçekleştirilmiştir. İzole edilen sponjin kaynaklı kolajenin morfolojik, kimyasal ve termal özellikleri detaylı analizlerle değerlendirilmiş; ayrıca bu kolajenin hidrojel formunda doku iskelesi olarak kullanılabilirliği araştırılmıştır. Bu bölüm kapsamında yürütülen çalışmalardan elde edilen temel bulgular şöyledir:

- İzolasyon protokolü kapsamında hipotonik tampon, SDS ile hücresizleştirme ve yüksek tuz içeren çözücüler kullanılmış; asidik çöktürmeye dayalı yöntemle

hazırlanan iki farklı formülasyonun (F1 ve F2) verimi sırasıyla yaklaşık %10 ve %12 olarak belirlenmiştir. Bradford analiziyle F1 ve F2 örneklerinde toplam kolajen miktarları sırasıyla 310 mg/g ve 350 mg/g kuru kütle olarak ölçülmüştür. Hidroksiprolin oranının her iki örnekte de yaklaşık %9 olması, elde edilen kolajenin yüksek saflıkta olduğunu ve yapısal bütünlüğünü koruduğunu göstermektedir. Bu değerler, deniz süngerlerinden elde edilen kolajenlerle ilgili literatürdeki verilerle karşılaştırıldığında oldukça yüksek bulunmuştur.

- SEM ve optik mikroskop analizleri, kolajenin pürüzsüz, lifsiz bir yüzeye sahip olduğunu; ancak izolasyon sürecinde hafif fibril kırıklarının oluştuğunu ortaya koymuştur. Termal analizler (TGA ve DSC), kolajenin iki aşamalı bir bozunma mekanizmasına sahip olduğunu göstermiştir. Yaklaşık 140 °C'de denatürasyon ve 350 °C civarında polipeptid zincirlerinin tamamen parçalanmasına bağlı bozulma gözlenmiştir. XRD analizinde ise sponjin kolajenin aksiyel periyodisite ve lateral paketlenmeye bağlı karakteristik iki zayıf pik verdiği, bunun da yapısında kısmi düzen bulunmakla birlikte genel olarak amorf bir yapı sergilediği belirlenmiştir.
- FTIR analizlerinde, kolajene özgü karakteristik Amid bantlarının varlığı ve triple-helikal yapının korunduğu tespit edilmiştir. SDS-PAGE analizleri ise α, β ve γ zincirlerini göstererek izole edilen kolajenin Tip I kolajen ile uyumlu olduğunu doğrulamıştır. LC-MS analizleri, kolajenin biyolojik stabilitesini ve yapısal özgünlüğünü destekleyen glisin, prolin, hidroksiprolin ile bunların di- ve tripeptit türevlerini içeren karakteristik amino asit profillerini ortaya koymuştur. Bu kapsamlı karakterizasyon çalışmaları, elde edilen kolajenin hem kimyasal hem de yapısal açıdan yüksek kalitede olduğunu ve biyomedikal uygulamalara uygunluk taşıdığını ortaya koymuştur.
- Çalışmanın devamında, izole edilen kolajenin EDC/NHS aracılı çapraz bağlama yöntemiyle hidrojel formuna getirilmesi amaçlanmıştır. Bu süreçte, kolajen konsantrasyonu (5, 10, 20 mg/mL), EDC konsantrasyonu (%1 ve %5 k/h) ve EDC/NHS molar oranları (1:1 ve 5:1) sistematik olarak değerlendirilmiştir. Dört farklı formülasyon arasında yalnızca 20 mg/mL kolajen, %5 (k/h) EDC ve 5:5 EDC/NHS oranıyla hazırlanan H4 formülasyonunun PBS ortamında 24 saatten uzun süre stabil kaldığı belirlenmiştir. H4 hidrojelinin jelleşme süresi 2 saat olarak ölçülmüş; daha yüksek kolajen ve EDC konsantrasyonlarının jel oluşum hızını

artırdığı görülmüştür. Tüm deneyler oda sıcaklığında ve pH 6 koşullarında gerçekleştirilmiştir; bu da amid bağ oluşumu için uygun bir ortam sağlamıştır.

- Hidrojel karakterizasyonu kapsamında yapılan biyobozunurluk analizlerinde, H4 hidrojelinin 7 günlük süre içerisinde yaklaşık %30 oranında kütle kaybına uğradığı ve kontrollü bir bozunma profili sergilediği ortaya konmuştur. Şişme analizleri ise, hidrojelin su ile etkileşime girerek 60. dakikada yaklaşık %280 şişme kapasitesine ulaştığını göstermiştir. Elde edilen bulgular, çapraz bağlanmış bu kolajen hidrojelinin hem kontrollü şişme davranışı hem de yavaş ve kontrollü bozunma özelliği ile yumuşak doku mühendisliği uygulamaları için uygun bir biyomalzeme adayı olduğunu ortaya koymuştur.
- Sonuç olarak bu tez çalışması kapsamında, *Sarcotragus foetidus* süngerinden yüksek verim ve saflıkta kolajen başarıyla izole edilmiş; yapılan karakterizasyon analizleri sonucunda, izole edilen kolajenin Tip I kolajen ile yüksek düzeyde yapısal benzerlik taşıdığı ortaya konmuştur. Devam eden çalışmalarda, çapraz bağlama koşulları optimize edilerek biyouyumlu ve stabil kolajen hidrojeller geliştirilmiş; bu yapıların fizikokimyasal ve biyolojik özellikleri değerlendirildiğinde, özellikle yumuşak doku mühendisliği alanında kullanılabilecek potansiyel biyomalzeme adayları oldukları belirlenmiştir.

Tez çalışmasının son aşamasında ise, GBM tedavisine yönelik olarak GA yüklü PBAT nanopartiküllerin geliştirilmesi, *Opuntia ficus indica* müsilajı ile kaplanması ve bu partiküllerin lokal Sf doku iskele sistemlerine entegre edilmesi hedeflenmiştir. Bu hedef doğrutusunda gerçekleştirilen çalışmalara ait bulgular aşağıda sıralanmıştır:

- Nanopartiküller, emülsiyon/çözücü buharlaştırma yöntemiyle hazırlanmış; partikül boyutu üzerine etkili olan parametreler (polimer konsantrasyonu, emülgatör oranı ve faz oranları) sistematik olarak değerlendirilmiştir. Ön deneylere göre karıştırma hızı (24 000 rpm) ve süresi (10 dk) sabit tutulmuş; polimer konsantrasyonu (% 0,5, 1, 2,5 k/h), DMAB emülgatör oranı (% 0,1 ve 1 k/h) ve yağ/su faz oranı (1:2 ve 1:4) sistematik olarak değiştirilmiştir. Elde edilen partikül çapı 171–570 nm aralığında değişmiş ve daha düşük PBAT oranı daha küçük partiküllerle sonuçlanmıştır.
- Nanopartiküllerin küresel yapıda olduğu, ancak yarı kristalin PBAT'ın karakteristik özelliği nedeniyle yüzeylerinin pürüzlü olduğu SEM görüntüleriyle doğrulanmıştır.

GA yüklü PBAT nanopartiküller için optimizasyon, iki faktörlü (GA/PBAT oranı ve sulu fazdaki GA miktarı) ve iki seviyeli Central Composite Design (CCD) ile yapılmıştır. Çalışmada kullanılan GA/PBAT oranı %5–20, sulu faz GA oranı ise %0,1–0,2 k/h arasında değiştirilmiştir.

- On üç farklı formülasyonun analizinde, partikül çapları 175–308 nm, enkapsülasyon verimi ise %62,3–%89,2 arasında değişmiştir. En yüksek verim, %0,2 k/h oranında sulu faza GA eklendiğinde elde edilmiştir. Bu durum, GA'nın suya difüzyonunun kısıtlanmasıyla açıklanmıştır.
- Optimum koşullarda (kütlece %0,5 PBAT, %0,15 GA su fazı, %5 GA/PBAT), 181 ± 47 nm çapta, %86,9 ± 6,3 verimle GA yüklü nanopartiküller üretilmiştir. Tween-80 (%0,1 ve %0,5 h/h) ilavesiyle partikül boyutları sırasıyla 185 ± 52 nm ve 190 ± 69 nm olarak ölçülmüş, GA enkapsülasyon verimi ise sırasıyla yaklaşık %86 ve %87 olmuştur. Tween-80'in partikül özellikleri üzerinde anlamlı etkisi görülmemiştir. Sonuç olarak, %0,5 Tween-80 içeren formülasyonun partikül boyutunu ve enkapsülasyon verimini koruyarak aglomerasyonu azalttığı ve ileri analizler için uygun olduğu belirlenmiştir.
- ONM kaplama işlemleri için en uygun konsantrasyonun 5 mg/mL olduğu belirlenmiş ve bu kaplamanın her iki pH koşulunda (pH 7,4 ve 5,5) da yüksek stabilite sağladığı gösterilmiştir. Kaplama sırasında kullanılan $CaCl_2$, PBAT'ın karboksil grupları ile iyonik bağlar oluşturarak ONM'nin partikül yüzeyinde daha stabil tutulmasına katkı sağlamıştır.
- Zeta potansiyel analizleri, tüm formülasyonların negatif yüke sahip olduğunu göstermiştir. GA'nın hidroksil grupları ve ONM'nin anyonik karakteri, yüzey yükünün −21,2 mV'den −17,7 mV'ye değişmesine neden olmuştur. Bu değişim, yüzey kaplamasının başarılı olduğunu ve partikül kararlılığının korunduğunu ortaya koymuştur.
- Termal analizlerde, GA-PBAT nanopartiküllerin iki aşamalı bozunma gösterdiği, ONM kaplı formülasyonların ise üç aşamalı bir bozunma profiline sahip olduğu belirlenmiştir. ONM kaplamanın PBAT'ın erime sıcaklığını yaklaşık 5 °C artırdığı ve bu durumun hidrojen bağlarına bağlı etkileşimlerden kaynaklandığı anlaşılmıştır. Ayrıca, ATR-FTIR analizleri bu yapısal etkileşimleri desteklemiştir. Artan artık kütle oranları, GA ve ONM'nin yapıya başarılı şekilde entegre edildiğini göstermektedir.

- Zeta potansiyel analizleri ve SEM görüntülemeleri, hem fizyolojik (pH 7,4) hem de asidik (pH 5,5) koşullarda nanopartiküllerin yüksek yapısal stabiliteye sahip olduğunu ortaya koymuştur. Asidik ortamda yüzey yüklerinin daha az negatif değer göstermesi, yüzeydeki protonlanma ile açıklanmıştır.
- *İn vitro* salım analizleri, fizyolojik (pH 7,4) ve asidik (pH 5,5) koşullarda 7 gün boyunca yürütülmüş; sonuçlar, GA-ONM-PBAT nanopartiküllerinden salımın GA-PBAT nanopartiküllerine kıyasla daha kontrollü gerçekleştiğini ortaya koymuştur. Asidik ortamda, ester bağlarının asit ile hidrolize uğraması nedeniyle salım hızının arttığı belirlenmiştir. Her iki formülasyonda da pH fark etmeksizin salım kinetiği, difüzyon temelli Higuchi modeline uygunluk göstermiştir.
- T98G insan glioblastoma hücreleri üzerinde yapılan sitotoksisite analizleri sonucunda, GA-ONM-PBAT nanopartiküllerinin serbest GA ve yalnızca GA yüklü nanopartiküllere kıyasla daha güçlü antikanser etki gösterdiği belirlenmiştir. IC_{50} değeri yaklaşık 750 µM olarak hesaplanan GA, ONM kaplaması sayesinde apoptotik etkisini artırmış ve bu durum hücre canlılığı testleri ve hücre morfolojisi analizleriyle doğrulanmıştır.
- Ayrıca, moleküler düzeyde yapılan analizlerde GA-ONM-PBAT nanopartiküllerinin T98G hücrelerinde kaspaz-3 ekspresyonunu artırdığı, aynı zamanda c-Myc ve β-katenin gen ekspresyonlarını baskıladığı görülmüştür. Bu sonuçlar, taşıyıcı sistemin apoptozu uyararak Wnt/c-Myc sinyal yolaklarını inhibe ettiğini ve böylece terapötik etkinliği artırdığını göstermektedir.
- Sf iskelelere yüklenen nanopartiküllerin dağılımı, ONM kaplı gruplarda aglomerasyon eğilimi gösterse de, GA'nın salım profili kontrollü şekilde devam etmiş ve salım kinetiği yine Higuchi modeline uygun bulunmuştur.
- Yapılan *in vitro* çalışmalar, ONM kaplı GA-PBAT nanopartikül yüklenmiş Sf iskelelerin yalnızca GA içeren yapılara kıyasla daha yüksek apoptotik etki gösterdiğini ortaya koymuştur. MTT ve konfokal analizler, bu sistemlerin hücre canlılığını belirgin şekilde azalttığını ve apoptotik hücre ölümünü artırdığını doğrulamıştır. Tüm bu bulgular, ONM'nin GA'nın sitotoksik etkisini artırarak sinerjik bir antikanser etkinlik sağladığını ve bu etkinin hem serbest nanopartikül sistemlerinde hem de iskeleye yüklenmiş sistemlerde benzer şekilde gözlendiğini ortaya koymaktadır.

- Sonuç olarak, bu çalışma, GA yüklü ve ONM kaplı PBAT nanopartiküllerle entegre edilmiş Sf iskelelerin, glioblastoma gibi agresif tümörlerin lokal tedavisinde kontrollü salım sağlayan, biyouyumlu ve etkili bir ilaç taşıyıcı sistem sunduğunu göstermiştir.

Elde edilen bulgular, geliştirilen çok işlevli biyomalzeme sisteminin yalnızca hücre proliferasyonunu ve doku yenilenmesini destekleyen yapısal özellikleriyle doku mühendisliği uygulamalarında kullanılmakla kalmayıp, aynı zamanda lokalize ve kontrollü ilaç salımı sayesinde özellikle glioblastoma gibi agresif tümörlerin tedavisinde terapötik etkinliği artıran bir taşıyıcı sistem olarak da önemli bir kullanım potansiyeline sahip olduğunu ortaya koymaktadır.

6. KAYNAKLAR

[1] M.P. Ferraz, An overview on the big players in bone tissue engineering: biomaterials, scaffolds and cells, International Journal of Molecular Sciences, 25 (**2024**) 3836.

[2] L.V. Bauso, V. La Fauci, C. Longo, G. Calabrese, Bone tissue engineering and nanotechnology: a promising combination for bone regeneration, Biology, 13 (**2024)** 237.

[3] A. Garimella, S.B. Ghosh, S. Bandyopadhyay-Ghosh, Biomaterials for bone tissue engineering: achievements to date and future directions, Biomedical Materials, 20 (**2024**) 012001.

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

[5] M. Wang, Y. Xu, L. Cao, L. Xiong, D. Shang, Y. Cong, D. Zhao, X. Wei, J. Li, D. Fu, Mechanical and biological properties of 3D printed bone tissue engineering scaffolds, Frontiers in Bioengineering and Biotechnology, 13 (**2025**) 1545693.

[6] A. Vats, N. Tolley, J. Polak, J. Gough, Scaffolds and biomaterials for tissue engineering: a review of clinical applications, Clinical Otolaryngology & Allied Sciences, 28 (**2003**) 165-172.

[7] Z. Lv, Y. Ji, G. Wen, X. Liang, K. Zhang, W. Zhang, Structure-optimized and microenvironment-inspired nanocomposite biomaterials in bone tissue engineering, Burns & Trauma, 12 (**2024)** tkae036.

[8] M. Selim, H.M. Mousa, G.T. Abdel-Jaber, N.M. Mubarak, A. Barhoum, A. Al-Anazi, A. Abdal-hay, Enhancing 3D Scaffold Performance for Bone Tissue Engineering: A Comprehensive Review of Modification and Functionalization Strategies, Journal of Science: Advanced Materials and Devices, (**2024**) 100806.

[9] M. Khazaei, M. Bozorgi, L. Rezakhani, A. Bozorgi, Fabrication and characterization of nanohydroxyapatite/chitosan/decellularized placenta scaffold for bone tissue engineering applications, International Journal of Biological Macromolecules, 281 (**2024**) 136340.

[10] H. Wang, X. Li, M. Xuan, R. Yang, J. Zhang, J. Chang, Marine biomaterials for sustainable bone regeneration, Giant, (**2024)** 100298.

[11] R.N. Granito, M.R. Custódio, A.C.M. Rennó, Natural marine sponges for bone tissue engineering: The state of art and future perspectives, Journal of Biomedical Materials Research Part B: Applied Biomaterials, 105 (**2017**) 1717-1727.

[12] S.K. Nandi, B. Kundu, A. Mahato, N.L. Thakur, S.N. Joardar, B.B. Mandal, In vitro and in vivo evaluation of the marine sponge skeleton as a bone mimicking biomaterial, Integrative Biology, 7 (**2015)** 250-262.

[13] B. Binnewerg, M. Schubert, A. Voronkina, L. Muzychka, M. Wysokowski, I. Petrenko, M. Djurović, V. Kovalchuk, M. Tsurkan, R. Martinovic, Marine biomaterials: Biomimetic and pharmacological potential of cultivated Aplysina aerophoba marine demosponge, Materials Science and Engineering: C, 109 (**2020**) 110566.

[14] S. Clarke, S. Choi, M. McKechnie, G. Burke, N. Dunne, G. Walker, E. Cunningham, F. Buchanan, Osteogenic cell response to 3-D hydroxyapatite scaffolds developed via replication of natural marine sponges, Journal of Materials Science: Materials in Medicine, 27 (**2016**) 1-11.

[15] C.P. Santos, J.P. Prado, K.R. Fernandes, H.W. Kido, B.P. Dorileo, J.R. Parisi, J.A. Silva, M.A. Cruz, M.R. Custódio, A.C. Rennó, Different species of marine sponges diverge in osteogenic potential when therapeutically applied as natural scaffolds for bone regeneration in rats, Journal of Functional Biomaterials, 14 (**2023**) 122.

[16] M. Pozzolini, E. Tassara, A. Dodero, M. Castellano, S. Vicini, S. Ferrando, S. Aicardi, D. Cavallo, M. Bertolino, I. Petrenko, Potential biomedical applications of collagen filaments derived from the marine demosponges ircinia oros (Schmidt, 1864) and sarcotragus foetidus (Schmidt, 1862), Marine Drugs, 19 (**2021**) 563.

[17] S. Chaudhari, M.S. Kumar, Marine sponges Sarcotragus foetidus, Xestospongia carbonaria and Spongia obscura constituents ameliorate IL-1 β and IL-6 in lipopolysaccharide-induced RAW 264.7 macrophages and carrageenan-induced oedema in rats, Inflammopharmacology, 28 (**2020**) 1091-1119.

[18] J.Y. Exposito, C. Cluzel, R. Garrone, C. Lethias, Evolution of collagens, The Anatomical Record: An Official Publication of the American Association of Anatomists, 268 (**2002**) 302-316.

[19] D. Varamogianni-Mamatsi, M.J. Nunes, V. Marques, T.I. Anastasiou, E. Kagiampaki, E. Vernadou, T. Dailianis, N. Kalogerakis, L.C. Branco, C.M. Rodrigues,

Comparative Chemical Profiling and Antimicrobial/Anticancer Evaluation of Extracts from Farmed versus Wild Agelas oroides and Sarcotragus foetidus Sponges, Marine Drugs, 21 (**2023**) 612.

[20] K. Rezwan, Q. Chen, J.J. Blaker, A.R. Boccaccini, Biodegradable and bioactive porous polymer/inorganic composite scaffolds for bone tissue engineering, Biomaterials, 27 (**2006**) 3413-3431.

[21] I.G. Beşkardeş, T.T. Demirtaş, M.D. Durukan, M. Gümüşderelioğlu, Microwave-assisted fabrication of chitosan–hydroxyapatite superporous hydrogel composites as bone scaffolds, Journal of tissue engineering and regenerative medicine, 9 (**2015**) 1233-1246.

[22] J.R. Parisi, K.R. Fernandes, I.R. Avanzi, B.P. Dorileo, A.d.F. Santana, A. Andrade, P.R. Gabbai-Armelin, C.A. Fortulan, E.d.S. Trichês, R.N. Granito, Incorporation of collagen from marine sponges (spongin) into hydroxyapatite samples: characterization and in vitro biological evaluation, Marine Biotechnology, 21 (**2019**) 30-37.

[23] N. Amiryaghoubi, R.J. Esfahlan, Applications of Hydroxyapatite-Based Polymeric Scaffolds in Bone Tissue Engineering: An Update, Advanced Pharmaceutical Bulletin, (**2024**) -794-806.

[24] G.K. Bayrak, T.T. Demirtaş, M. Gümüşderelioğlu, Microwave-induced biomimetic approach for hydroxyapatite coatings of chitosan scaffolds, Carbohydrate polymers, 157 (**2017**) 803-813.

[25] C.D. Hunt, Dietary boron: progress in establishing essential roles in human physiology, Journal of trace elements in medicine and biology, 26 (**2012**) 157-160.

[26] C. Wu, R. Miron, A. Sculean, S. Kaskel, T. Doert, R. Schulze, Y. Zhang, Proliferation, differentiation and gene expression of osteoblasts in boron-containing associated with dexamethasone deliver from mesoporous bioactive glass scaffolds, Biomaterials, 32 (**2011**) 7068-7078.

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

[28] F. Hanif, K. Muzaffar, K. Perveen, S.M. Malhi, S.U. Simjee, Glioblastoma multiforme: a review of its epidemiology and pathogenesis through clinical presentation and treatment, Asian Pacific journal of cancer prevention: APJCP, 18 (**2017)** 3.

[29] W. Wu, J.L. Klockow, M. Zhang, F. Lafortune, E. Chang, L. Jin, Y. Wu, H.E. Daldrup-Link, Glioblastoma multiforme (GBM): An overview of current therapies and mechanisms of resistance, Pharmacological research, 171 (**2021**) 105780.

[30] Q. Feng, X. Xu, C. Wei, Y. Li, M. Wang, C. Lv, J. Wu, Y. Dai, Y. Han, M.S. Lesniak, The dynamic interactions between nanoparticles and macrophages impact their fate in brain tumors, Small, 17 (**2021**) 2103600.

[31] O. Grauer, M. Jaber, K. Hess, M. Weckesser, W. Schwindt, S. Maring, J. Wölfer, W. Stummer, Combined intracavitary thermotherapy with iron oxide nanoparticles and radiotherapy as local treatment modality in recurrent glioblastoma patients, Journal of neuro-oncology, 141 (**2019**) 83-94.

[32] H. Guerrero-Cázares, S.Y. Tzeng, N.P. Young, A.O. Abutaleb, A. Quiñones-Hinojosa, J.J. Green, Biodegradable polymeric nanoparticles show high efficacy and specificity at DNA delivery to human glioblastoma in vitro and in vivo, ACS nano, 8 (**2014**) 5141-5153.

[33] C. Kutlu, A.S. Çakmak, M. Gümüşderelioğlu, Double-effective chitosan scaffold-PLGA nanoparticle system for brain tumour therapy: in vitro study, Journal of microencapsulation, 31 (**2014**) 700-707.

[34] R. Holghoomi, M.H. Kiani, A. Rahdar, S.M. Hashemi, L.F.R. Ferreira, S. Fathi-karkan, Nanoparticle-delivered gallic acid: A new frontier in cancer therapy, Journal of Drug Delivery Science and Technology, (**2024**) 106129.

[35] B.R. You, S.Z. Kim, S.H. Kim, W.H. Park, Gallic acid-induced lung cancer cell death is accompanied by ROS increase and glutathione depletion, Molecular and cellular biochemistry, 357 (**2011**) 295-303.

[36] S. Madlener, C. Illmer, Z. Horvath, P. Saiko, A. Losert, I. Herbacek, M. Grusch, H.L. Elford, G. Krupitza, A. Bernhaus, Gallic acid inhibits ribonucleotide reductase and cyclooxygenases in human HL-60 promyelocytic leukemia cells, Cancer letters, 245 (**2007**) 156-162.

[37] S. Verma, A. Singh, A. Mishra, Gallic acid: Molecular rival of cancer, Environmental toxicology and pharmacology, 35 (**2013**) 473-485.

[38] S.C. Forester, Y.Y. Choy, A.L. Waterhouse, P.I. Oteiza, The anthocyanin metabolites gallic acid, 3-O-methylgallic acid, and 2, 4, 6-trihydroxybenzaldehyde

decrease human colon cancer cell viability by regulating pro-oncogenic signals, Molecular carcinogenesis, 53 (**2014**) 432-439.

[39] Y. Lu, F. Jiang, H. Jiang, K. Wu, X. Zheng, Y. Cai, M. Katakowski, M. Chopp, S.-S.T. To, Gallic acid suppresses cell viability, proliferation, invasion and angiogenesis in human glioma cells, European journal of pharmacology, 641 (**2010**) 102-107.

[40] D. Singh, M. Singh Maniyari Rawat, A. Semalty, M. Semalty, Gallic acid-phospholipid complex: drug incorporation and physicochemical characterization, Letters in Drug Design & Discovery, 8 (**2011**) 284-291.

[41] R. Venkatesan, T. Dhilipkumar, A. Kiruthika, N. Ali, S.-C. Kim, Green composites for sustainable food packaging: Exploring the influence of lignin-TiO2 nanoparticles on poly (butylene adipate-co-terephthalate), International Journal of Biological Macromolecules, 277 (**2024**) 134511.

[42] R. Venkatesan, P. Sivaprakash, I. Kim, A.M. Tawfeek, S.-C. Kim, Green synthesis of carbon nanoparticle-reinforced nanocomposites with gallic acid as a crosslinking agent on poly (butylene adipate-co-terephthalate): Preparation, characterization, and performances, Industrial Crops and Products, 209 (**2024**) 117949.

[43] U. Witt, T. Einig, M. Yamamoto, I. Kleeberg, W.-D. Deckwer, R.-J. Müller, Biodegradation of aliphatic–aromatic copolyesters: evaluation of the final biodegradability and ecotoxicological impact of degradation intermediates, Chemosphere, 44 (**2001)** 289-299.

[44] T. Gültan, M. Gümüşderelioğlu, Membrane supported poly (butylene adipate-co-terephthalate) nanofibrous matrices as cardiac patch: Effect of basement membrane for the fiber deposition and cellular behavior, Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects, 654 (**2022**) 129977.

[45] A. Arslan, S. Çakmak, A. Cengiz, M. Gümüşderelioğlu, Poly (butylene adipate-co-terephthalate) scaffolds: processing, structural characteristics and cellular responses, Journal of Biomaterials Science, Polymer Edition, 27 (**2016**) 1841-1859.

[46] S. Koç, M. Gümüşderelioğlu, Versatile cell cultivation on injectable poly (butylene adipate-co-terephthalate) microcarriers: Impact of surface properties across different cell types, Journal of Biomedical Materials Research Part B: Applied Biomaterials, 112 (**2024**) e35464.

[47] O. García-Barradas, A. Esteban-Cortina, M.R. Mendoza-Lopez, R.I. Ortiz-Basurto, D.I. Díaz-Ramos, M. Jiménez-Fernández, Chemical modification of Opuntia ficus-indica mucilage: characterization, physicochemical, and functional properties, Polymer Bulletin, 80 (**2023**) 8783-8798.

[48] E.M. Galati, M.T. Monforte, N. Miceli, M. Mondello, M.F. Taviano, M. Galluzzo, M.M. Tripodo, Opuntia ficus indica (L.) Mill. mucilages show cytoprotective effect on gastric mucosa in rat, Phytotherapy Research: An International Journal Devoted to Pharmacological and Toxicological Evaluation of Natural Product Derivatives, 21 (**2007**) 344-346.

[49] G. Liguori, C. Gentile, R. Gaglio, A. Perrone, R. Guarcello, N. Francesca, S. Fretto, P. Inglese, L. Settanni, Effect of addition of Opuntia ficus-indica mucilage on the biological leavening, physical, nutritional, antioxidant and sensory aspects of bread, Journal of Bioscience and Bioengineering, 129 (**2020)** 184-191.

[50] J. Wang, N. Rani, S. Jakhar, R. Redhu, S. Kumar, S. Kumar, S. Kumar, B. Devi, J. Simal-Gandara, B. Shen, Opuntia ficus-indica (L.) Mill.-anticancer properties and phytochemicals: current trends and future perspectives, Frontiers in Plant Science, 14 (**2023**) 1236123.

[51] Y. Ikada, Challenges in tissue engineering, Journal of the Royal Society Interface, 3 (**2006**) 589-601.

[52] S. Toosi, J. Behravan, Osteogenesis and bone remodeling: A focus on growth factors and bioactive peptides, Biofactors, 46 (**2020**) 326-340.

[53] L. Roseti, V. Parisi, M. Petretta, C. Cavallo, G. Desando, I. Bartolotti, B. Grigolo, Scaffolds for bone tissue engineering: state of the art and new perspectives, Materials Science and Engineering: C, 78 (**2017**) 1246-1262.

[54] A.I. Birkhold, H. Razi, R. Weinkamer, G.N. Duda, S. Checa, B.M. Willie, Monitoring in vivo (re) modeling: a computational approach using 4D microCT data to quantify bone surface movements, Bone, 75 (**2015**) 210-221.

[55] H. Pereira, I. Cengiz, F. Maia, F. Bartolomeu, J.M. Oliveira, R. Reis, F.S. Silva, Physicochemical properties and cytocompatibility assessment of non-degradable scaffolds for bone tissue engineering applications, Journal of the Mechanical Behavior of Biomedical Materials, 112 (**2020**) 103997.

[56] F. Shang, Y. Yu, S. Liu, L. Ming, Y. Zhang, Z. Zhou, J. Zhao, Y. Jin, Advancing application of mesenchymal stem cell-based bone tissue regeneration, Bioactive materials, 6 (**2021**) 666-683.

[57] G. Rohman, C. Langueh, S. Ramtani, J.-J. Lataillade, D. Lutomski, K. Senni, S. Changotade, The use of platelet-rich plasma to promote cell recruitment into low-molecular-weight fucoidan-functionalized poly (ester-urea-urethane) scaffolds for soft-tissue engineering, Polymers, 11 (**2019**) 1016.

[58] C.M. Andreasen, J.-M. Delaisse, B.C. van der Eerden, J.P. van Leeuwen, M. Ding, T.L. Andersen, Understanding age-induced cortical porosity in women: is a negative BMU balance in quiescent osteons a major contributor?, Bone, 117 (**2018)** 70-82.

[59] M. Martin, V. Sansalone, D.M. Cooper, M.R. Forwood, P. Pivonka, Mechanobiological osteocyte feedback drives mechanostat regulation of bone in a multiscale computational model, Biomechanics and modeling in mechanobiology, 18 (**2019**) 1475-1496.

[60] X. Chen, Z. Wang, N. Duan, G. Zhu, E.M. Schwarz, C. Xie, Osteoblast–osteoclast interactions, Connective tissue research, 59 (**2018**) 99-107.

[61] Y. Huang, X. Chen, J. Che, Q. Zhan, J. Ji, Y. Fan, Shear Stress Promotes Arterial Endothelium-Oriented Differentiation of Mouse-Induced Pluripotent Stem Cells, Stem Cells International, 2019 (**2019**) 1847098.

[62] G. Schett, Effects of inflammatory and anti-inflammatory cytokines on the bone, European journal of clinical investigation, 41 (**2011**) 1361-1366.

[63] B.M. Manzini, L.M.R. Machado, P.Y. Noritomi, J.V.L. Da Silva, Advances in Bone tissue engineering: A fundamental review, Journal of biosciences, 46 (**2021**) 1-18.

[64] S. Yang, K.-F. Leong, Z. Du, C.-K. Chua, The design of scaffolds for use in tissue engineering. Part I. Traditional factors, Tissue engineering, 7 (**2001**) 679-689.

[65] C.E. Holy, M.S. Shoichet, J.E. Davies, Engineering three-dimensional bone tissue in vitro using biodegradable scaffolds: Investigating initial cell-seeding density and culture period, Journal of Biomedical Materials Research, 51 (**2000**) 376-382.

[66] J. Davies, Mechanisms of endosseous integration, International Journal of Prosthodontics, 11 (**1998**).

[67] T. Albrektsson, C. Johansson, Osteoinduction, osteoconduction and osseointegration, European spine journal, 10 (**2001**) S96-S101.

[68] R.Z. LeGeros, Properties of osteoconductive biomaterials: calcium phosphates, Clinical Orthopaedics and Related Research (1976-2007), 395 (**2002**) 81-98.

[69] C.S. Adams, K. Mansfield, R.L. Perlot, I.M. Shapiro, Matrix regulation of skeletal cell apoptosis: role of calcium and phosphate ions, Journal of Biological Chemistry, 276 (**2001**) 20316-20322.

[70] H. Shin, P.Q. Ruhé, A.G. Mikos, J.A. Jansen, In vivo bone and soft tissue response to injectable, biodegradable oligo (poly (ethylene glycol) fumarate) hydrogels, Biomaterials, 24 (**2003**) 3201-3211.

[71] L. Kostopoulos, T. Karring, Guided bone regeneration in mandibular defects in rats using a bioresorbable polymer, Clinical oral implants research, 5 (**1994**) 66-74.

[72] S.S. Silva, M.B. Oliveira, J. Mano, R. Reis, Bio-inspired Aloe vera sponges for biomedical applications, Carbohydrate polymers, 112 (**2014**) 264-270.

[73] T.H. Silva, J. Moreira-Silva, A.L. Marques, A. Domingues, Y. Bayon, R.L. Reis, Marine origin collagens and its potential applications, Marine drugs, 12 (**2014**) 5881-5901.

[74] D. Sipkema, R. Osinga, W. Schatton, D. Mendola, J. Tramper, R.H. Wijffels, Large-scale production of pharmaceuticals by marine sponges: Sea, cell, or synthesis?, Biotechnology and bioengineering, 90 (**2005**) 201-222.

[75] J.W. Blunt, B.R. Copp, R.A. Keyzers, M.H. Munro, M.R. Prinsep, Marine natural products, Natural Product Reports, 33 (**2016)** 382-431.

[76] S. Xiao, X. Yuan, A.H. Knoll, Eumetazoan fossils in terminal Proterozoic phosphorites?, Proceedings of the National Academy of Sciences, 97 (**2000**) 13684-13689.

[77] J.N. Hooper, R.W. Van Soest, Systema Porifera. A guide to the classification of sponges, Systema Porifera: A guide to the classification of sponges, Springer (**2002**) 1-7.

[78] C. Morrow, P. Cárdenas, Proposal for a revised classification of the Demospongiae (Porifera), Frontiers in zoology, 12 (**2015**) 1-27.

[79] E. Gazave, P. Lapébie, A.V. Ereskovsky, J. Vacelet, E. Renard, P. Cárdenas, C. Borchiellini, No longer Demospongiae: Homoscleromorpha formal nomination as a fourth class of Porifera, Ancient Animals, New Challenges: Developments in Sponge Research, (**2012**) 3-10.

[80] C. Chombard, N. Boury-Esnault, A. Tillier, J. Vacelet, Polyphyly of" sclerosponges"(Porifera, Demospongiae) supported by 28S ribosomal sequences, The Biological Bulletin, 193 (**1997**) 359-367.

[81] Z. Lin, K.L. Solomon, X. Zhang, N.J. Pavlos, T. Abel, C. Willers, K. Dai, J. Xu, Q. Zheng, M. Zheng, In vitro evaluation of natural marine sponge collagen as a scaffold for bone tissue engineering, International journal of biological sciences, 7 (**2011**) 968.

[82] T. Iwatsubo, R. Kishi, T. Miura, T. Ohzono, T. Yamaguchi, Formation of hydroxyapatite skeletal materials from hydrogel matrices via artificial biomineralization, The Journal of Physical Chemistry B, 119 (**2015**) 8793-8799.

[83] S. Heinemann, H. Ehrlich, T. Douglas, C. Heinemann, H. Worch, W. Schatton, T. Hanke, Ultrastructural studies on the collagen of the marine sponge Chondrosia reniformis Nardo, Biomacromolecules, 8 (**2007**) 3452-3457.

[84] D. Green, D. Howard, X. Yang, M. Kelly, R. Oreffo, Natural marine sponge fiber skeleton: a biomimetic scaffold for human osteoprogenitor cell attachment, growth, and differentiation, Tissue engineering, 9 (**2003**) 1159-1166.

[85] R. Pallela, J. Venkatesan, V.R. Janapala, S.K. Kim, Biophysicochemical evaluation of chitosan-hydroxyapatite-marine sponge collagen composite for bone tissue engineering, Journal of Biomedical Materials Research Part A, 100 **(2012**) 486-495.

[86] J.A. Leonetti, H.M. Rambo, R.R. Throndson, Osteotome sinus elevation and implant placement with narrow size bioactive glass, Implant dentistry, 9 (**2000**) 177-182.

[87] E. Martins, H.T. Rapp, J.R. Xavier, G.S. Diogo, R.L. Reis, T.H. Silva, Macro and microstructural characteristics of North Atlantic deep-sea sponges as bioinspired models for tissue engineering scaffolding, Frontiers in Marine Science, 7 (**2021**) 613647.

[88] A.A. Barros, I.M. Aroso, T.H. Silva, J.F. Mano, A.R.C. Duarte, R.L. Reis, Surface modification of silica-based marine sponge bioceramics induce hydroxyapatite formation, Crystal Growth & Design, 14 (**2014**) 4545-4552.

[89] E. Cunningham, N. Dunne, G. Walker, C. Maggs, R. Wilcox, F. Buchanan, Hydroxyapatite bone substitutes developed via replication of natural marine sponges, Journal of Materials Science: Materials in Medicine, 21 (**2010**) 2255-2261.

[90] I. Sethmann, G. Wörheide, Structure and composition of calcareous sponge spicules: a review and comparison to structurally related biominerals, Micron, 39 (**2008**) 209-228.

[91] J.C. Weaver, L.I. Pietrasanta, N. Hedin, B.F. Chmelka, P.K. Hansma, D.E. Morse, Nanostructural features of demosponge biosilica, Journal of Structural Biology, 144 (**2003**) 271-281.

[92] Y. Aluma, M. Ilan, D. Sherman, Comments on a skeleton design paradigm for a demosponge, Journal of Structural Biology, 175 (**2011**) 415-424.

[93] H.C. Schröder, O. Boreiko, A. Krasko, A. Reiber, H. Schwertner, W.E. Müller, Mineralization of SaOS-2 cells on enzymatically (silicatein) modified bioactive osteoblast-stimulating surfaces, Journal of Biomedical Materials Research Part B: Applied Biomaterials, 75 (**2005**) 387-392.

[94] W.E. Müller, A. Boreiko, X. Wang, A. Krasko, W. Geurtsen, M.R. Custódio, T. Winkler, L. Lukić-Bilela, T. Link, H.C. Schröder, Morphogenetic activity of silica and bio-silica on the expression of genes controlling biomineralization using SaOS-2 cells, Calcified tissue international, 81 (**2007**) 382-393.

[95] M. Wiens, X. Wang, H.C. Schröder, U. Kolb, U. Schloßmacher, H. Ushijima, W.E. Müller, The role of biosilica in the osteoprotegerin/RANKL ratio in human osteoblast-like cells, Biomaterials, 31 (**2010**) 7716-7725.

[96] M. Wiens, X. Wang, U. Schloßmacher, I. Lieberwirth, G. Glasser, H. Ushijima, H.C. Schröder, W.E. Müller, Osteogenic potential of biosilica on human osteoblast-like (SaOS-2) cells, Calcified tissue international, 87 (**2010**) 513-524.

[97] H. Schröder, X. Wang, M. Wiens, B. Diehl-Seifert, K. Kropf, U. Schloßmacher, W. Müller, Silicate modulates the cross-talk between osteoblasts (SaOS-2) and osteoclasts (RAW 264.7 cells): Inhibition of osteoclast growth and differentiation, Journal of cellular biochemistry, 113 (**2012)** 3197-3206.

[98] X. Wang, H.C. Schröder, V. Grebenjuk, B. Diehl-Seifert, V. Mailänder, R. Steffen, U. Schloßmacher, W.E. Müller, The marine sponge-derived inorganic polymers, biosilica and polyphosphate, as morphogenetically active matrices/scaffolds for the differentiation

of human multipotent stromal cells: potential application in 3D printing and distraction osteogenesis, Marine Drugs, 12 (**2014**) 1131-1147.

[99] S. Wang, X. Wang, F.G. Draenert, O. Albert, H.C. Schröder, V. Mailänder, G. Mitov, W.E. Müller, Bioactive and biodegradable silica biomaterial for bone regeneration, Bone, 67 (**2014**) 292-304.

[100] C. Pavloudi, M. Christodoulou, M. Mavidis, Macrofaunal assemblages associated with the sponge Sarcotragus foetidus Schmidt, 1862 (Porifera: Demospongiae) at the coasts of Cyprus and Greece, Biodiversity Data Journal, (**2016)** e8210.

[101] E. Dinçtürk, F. Öndes, L. Leria, M. Maldonado, Mass mortality of the keratose sponge Sarcotragus foetidus in the Aegean Sea (Eastern Mediterranean) correlates with proliferation of Vibrio bacteria in the tissues, Frontiers in Microbiology, 14 (**2023**) 1272733.

[102] F. Celik, M. Camas, A.S. Camas, H.B. Ozalp, Uranium (VI) biosorption on marine sponge, Sarcotragus foetidus (Schmidt, 1862) and its statistical investigation using central composite design, Turkish Journal of Fisheries and Aquatic Sciences, 16 (**2016)** 899-911.

[103] B. Beig, U. Liaqat, M.F.K. Niazi, I. Douna, M. Zahoor, M.B.K. Niazi, Current challenges and innovative developments in hydroxyapatite-based coatings on metallic materials for bone implantation: A review, Coatings, 10 (**2020**) 1249.

[104] X. Zheng, Y. Ye, Z. Jiang, Z. Ying, S. Ji, W. Chen, B. Wang, B. Dou, Enhanced transformation of phosphorus (P) in sewage sludge to hydroxyapatite via hydrothermal carbonization and calcium-based additive, Science of the total environment, 738 (**2020**) 139786.

[105] F.H. Nielsen, S.L. Meacham, Growing evidence for human health benefits of boron, Journal of Evidence-Based Complementary & Alternative Medicine, 16 (**2011**) 169-180.

[106] N. Sedighi-Pirsaraei, A. Tamimi, F. Sadeghi Khamaneh, S. Dadras-Jeddi, N. Javaheri, Boron in wound healing: a comprehensive investigation of its diverse mechanisms, Frontiers in Bioengineering and Biotechnology, 12 (**2024**) 1475584.

[107] X. Ying, S. Cheng, W. Wang, Z. Lin, Q. Chen, W. Zhang, D. Kou, Y. Shen, X. Cheng, F.A. Rompis, Effect of boron on osteogenic differentiation of human bone marrow stromal cells, Biological trace element research, 144 (**2011**) 306-315.

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

[109] M. Calis, T.T. Demirtas, A. Vatansever, G. Irmak, A.H. Sakarya, P. Atilla, F. Ozgur, M. Gumusderelioglu, A biomimetic alternative to synthetic hydroxyapatite:"boron-containing bone-like hydroxyapatite" precipitated from simulated body fluid, Annals of plastic surgery, 79 (**2017**) 304-311.

[110] T. Gültan, M.Ç. Yurtsever, M. Gümüşderelioğlu, NaOH-etched/boron-doped nanohydroxyapatite-coated PEEK implants enhance the proliferation and differentiation of osteogenic cells, Biomedical Materials, 15 (**2020**) 035019.

[111] A. Arslan, S. Çakmak, M. Gümüşderelioğlu, Enhanced osteogenic activity with boron-doped nanohydroxyapatite-loaded poly (butylene adipate-co-terephthalate) fibrous 3D matrix, Artificial cells, nanomedicine, and biotechnology, 46 (**2018**) 790-799.

[112] Q. Kang, W. Wang, S. Wu, G. Hu, B-doped nano-hydroxyapatite facilitates proliferation and differentiation of osteoblasts, Journal of Orthopaedic Surgery and Research, 20 (**2025**) 62.

[113] S. Chen, H. Fan, Y. Pei, K. Zhang, F. Zhang, Q. Hu, E. Jin, S. Li, MAPK Signaling Pathway Plays Different Regulatory Roles in the Effects of Boric Acid on Proliferation, Apoptosis, and Immune Function of Splenic Lymphocytes in Rats, Biological Trace Element Research, 202 (**2024)** 2688-2701.

[114] X. Li, Y. Yang, Y. Fan, Q. Feng, F.z. Cui, F. Watari, Biocomposites reinforced by fibers or tubes as scaffolds for tissue engineering or regenerative medicine, Journal of Biomedical Materials Research Part A: An Official Journal of The Society for Biomaterials, The Japanese Society for Biomaterials, and The Australian Society for Biomaterials and the Korean Society for Biomaterials, 102 (**2014**) 1580-1594.

[115] P. Bauer-Kreisel, A. Goepferich, T. Blunk, Cell-delivery therapeutics for adipose tissue regeneration, Advanced drug delivery reviews, 62 (**2010**) 798-813.

[116] H. Xu, S. Cai, A. Sellers, Y. Yang, Intrinsically water-stable electrospun three-dimensional ultrafine fibrous soy protein scaffolds for soft tissue engineering using adipose derived mesenchymal stem cells, RSC Advances, 4 (**2014**) 15451-15457.

[117] X. Li, W. Liu, L. Sun, K.E. Aifantis, B. Yu, Y. Fan, Q. Feng, F. Cui, F. Watari, Effects of physicochemical properties of nanomaterials on their toxicity, Journal of biomedical materials research Part A, 103 (**2015**) 2499-2507.

[118] B. Pei, W. Wang, Y. Fan, X. Wang, F. Watari, X. Li, Fiber-reinforced scaffolds in soft tissue engineering, Regenerative biomaterials, 4 (**2017**) 257-268.

[119] E. Biazar, Application of polymeric nanofibers in soft tissues regeneration, Polymers for Advanced Technologies, 27 (**2016**) 1404-1412.

[120] J. Zhu, J. Li, B. Wang, W.J. Zhang, G. Zhou, Y. Cao, W. Liu, The regulation of phenotype of cultured tenocytes by microgrooved surface structure, Biomaterials, 31 (**2010**) 6952-6958.

[121] R. De Santis, F. Sarracino, F. Mollica, P.A. Netti, L. Ambrosio, L. Nicolais, Continuous fibre reinforced polymers as connective tissue replacement, Composites Science and Technology, 64 (**2004**) 861-871.

[122] D. Fassini, A.R.C. Duarte, R.L. Reis, T.H. Silva, Bioinspiring Chondrosia reniformis (Nardo, 1847) collagen-based hydrogel: a new extraction method to obtain a sticky and self-healing collagenous material, Marine Drugs, 15 (**2017**) 380.

[123] C. Fletcher, J.A. Bridge, P.C.W. Hogendoorn, F. Mertens, WHO classification of tumours of soft tissue and bone: WHO classification of tumours, vol. 5, World Health Organization (**2013**).

[124] L. Barnes, Pathology and genetics of head and neck tumours, IARC (**2005)**.

[125] R. Grimer, I. Judson, D. Peake, B. Seddon, Guidelines for the management of soft tissue sarcomas, Sarcoma, 2010 (**2010**) 506182.

[126] M.L. Goodenberger, R.B. Jenkins, Genetics of adult glioma, Cancer genetics, 205 (**2012**) 613-621.

[127] D.N. Louis, H. Ohgaki, O.D. Wiestler, W.K. Cavenee, P.C. Burger, A. Jouvet, B.W. Scheithauer, P. Kleihues, The 2007 WHO classification of tumours of the central nervous system, Acta neuropathologica, 114 (**2007**) 97-109.

[128] A. Gutkin, Z.R. Cohen, D. Peer, Harnessing nanomedicine for therapeutic intervention in glioblastoma, Expert Opinion on Drug Delivery, 13 (**2016)** 1573-1582.

[129] A. Omuro, L.M. DeAngelis, Glioblastoma and other malignant gliomas: a clinical review, Jama, 310 (**2013**) 1842-1850.

[130] Y. Wang, T. Jiang, Understanding high grade glioma: molecular mechanism, therapy and comprehensive management, Cancer letters, 331 (**2013**) 139-146.

[131] Y.-Y. Xu, P. Gao, Y. Sun, Y.-R. Duan, Development of targeted therapies in treatment of glioblastoma, Cancer biology & medicine, 12 (**2015**) 223-237.

[132] O. Gallego, Nonsurgical treatment of recurrent glioblastoma, Current oncology, 22 **(2015**) 273-281.

[133] P.P. Wang, J. Frazier, H. Brem, Local drug delivery to the brain, Advanced drug delivery reviews, 54 (**2002**) 987-1013.

[134] F.G. Barker, S.M. Chang, P.H. Gutin, M.K. Malec, M.W. McDermott, M.D. Prados, C.B. Wilson, Survival and functional status after resection of recurrent glioblastoma multiforme, Neurosurgery, 42 (**1998**) 709-720.

[135] D.S. Mohan, J.H. Suh, J.L. Phan, P.A. Kupelian, B.H. Cohen, G.H. Barnett, Outcome in elderly patients undergoing definitive surgery and radiation therapy for supratentorial glioblastoma multiforme at a tertiary care institution, International Journal of Radiation Oncology Biology Physics, 42 (**1998**) 981-987.

[136] L. Nam, C. Coll, L. Erthal, C. De la Torre, D. Serrano, R. Martínez-Máñez, M. Santos-Martínez, E. Ruiz-Hernández, Drug delivery nanosystems for the localized treatment of glioblastoma multiforme, Materials, 11 (**2018)** 779.

[137] L.T. Rodgers, J.L. Villano, A.M. Hartz, B. Bauer, Glioblastoma Standard of Care: Effects on Tumor Evolution and Reverse Translation in Preclinical Models, Cancers, 16 (**2024**) 2638.

[138] R. Alyautdin, I. Khalin, M.I. Nafeeza, M.H. Haron, D. Kuznetsov, Nanoscale drug delivery systems and the blood–brain barrier, International journal of nanomedicine, (**2014**) 795-811.

[139] W.Y. Liu, Z.B. Wang, L.C. Zhang, X. Wei, L. Li, Tight junction in blood-brain barrier: an overview of structure, regulation, and regulator substances, CNS neuroscience & therapeutics, 18 (**2012**) 609-615.

[140] P.T. Ronaldson, T.P. Davis, Targeting blood–brain barrier changes during inflammatory pain: an opportunity for optimizing CNS drug delivery, Therapeutic delivery, 2 (**2011**) 1015-1041.

[141] R.W. Chakroun, P. Zhang, R. Lin, P. Schiapparelli, A. Quinones-Hinojosa, H. Cui, Nanotherapeutic systems for local treatment of brain tumors, Wiley Interdisciplinary Reviews: Nanomedicine and Nanobiotechnology, 10 (**2018**) e1479.

[142] R. De Souza, P. Zahedi, C.J. Allen, M. Piquette-Miller, Polymeric drug delivery systems for localized cancer chemotherapy, Drug delivery, 17 (**2010)** 365-375.

[143] J.B. Wolinsky, Y.L. Colson, M.W. Grinstaff, Local drug delivery strategies for cancer treatment: gels, nanoparticles, polymeric films, rods, and wafers, Journal of controlled release, 159 (**2012**) 14-26.

[144] S. Ohba, Y. Hirose, Current and future drug treatments for glioblastomas, Current Medicinal Chemistry, 23 (**2016**) 4309-4316.

[145] S. Yamamuro, M. Takahashi, K. Satomi, N. Sasaki, T. Kobayashi, E. Uchida, D. Kawauchi, T. Nakano, T. Fujii, Y. Narita, Lomustine and nimustine exert efficient antitumor effects against glioblastoma models with acquired temozolomide resistance, Cancer science, 112 (**2021**) 4736-4747.

[146] M. Ashrafizadeh, A. Zarrabi, S. Mirzaei, F. Hashemi, S. Samarghandian, A. Zabolian, K. Hushmandi, H.L. Ang, G. Sethi, A.P. Kumar, Gallic acid for cancer therapy: Molecular mechanisms and boosting efficacy by nanoscopical delivery, Food and Chemical Toxicology, 157 (**2021**) 112576.

[147] S. Khatoon, A. Aroosh, A. Islam, S. Kalsoom, F. Ahmad, S. Hameed, S.W. Abbasi, M. Yasinzai, M.M. Naseer, Novel coumarin-isatin hybrids as potent antileishmanial agents: Synthesis, in silico and in vitro evaluations, Bioorganic Chemistry, 110 (**2021**) 104816.

[148] A. Haroyan, V. Mukuchyan, N. Mkrtchyan, N. Minasyan, S. Gasparyan, A. Sargsyan, M. Narimanyan, A. Hovhannisyan, Efficacy and safety of curcumin and its combination with boswellic acid in osteoarthritis: a comparative, randomized, double-blind, placebo-controlled study, BMC complementary and alternative medicine, 18 (**2018**) 1-16.

[149] G. Galati, P.J. O'brien, Potential toxicity of flavonoids and other dietary phenolics: significance for their chemopreventive and anticancer properties, Free radical biology and medicine, 37 (**2004**) 287-303.

[150] Z. Xiang, H. Guan, X. Zhao, Q. Xie, Z. Xie, F. Cai, R. Dang, M. Li, C. Wang, Dietary gallic acid as an antioxidant: A review of its food industry applications, health benefits, bioavailability, nano-delivery systems, and drug interactions, Food Research International, 180 (**2024**) 114068.

[151] A.d.C.S. Alves, R.M. Mainardes, N.M. Khalil, Nanoencapsulation of gallic acid and evaluation of its cytotoxicity and antioxidant activity, Materials Science and Engineering: C, 60 (**2016**) 126-134.

[152] M. Azarmi, H. Maleki, N. Nikkam, H. Malekinejad, Novel neurolisteriosis therapy using SPION as a drivable nanocarrier in gallic acid delivery to CNS, Journal of Controlled Release, 353 **(2023**) 507-517.

[153] L.K. Kurabetta, S.P. Masti, M.N. Gunaki, A.A. Hunashyal, M.P. Eelager, R.B. Chougale, N.P. Dalbanjan, S.P. Kumar, A synergistic influence of gallic acid/ZnO NPs to strengthen the multifunctional properties of methylcellulose: a conservative approach for tomato preservation, International Journal of Biological Macromolecules, 277 (**2024)** 134191.

[154] F.H.A. Fernandes, H.R.N. Salgado, Gallic acid: review of the methods of determination and quantification, Critical reviews in analytical chemistry, 46 (**2016**) 257-265.

[155] B. Badhani, N. Sharma, R. Kakkar, Gallic acid: A versatile antioxidant with promising therapeutic and industrial applications, Rsc Advances, 5 (**2015**) 27540-27557.

[156] Z. Riaz, S. Baddi, F. Gao, C.-L. Feng, Gallic acid-doped multifunctional hybrid hydrogel for antioxidant and antibacterial studies, European Polymer Journal, 206 (**2024**) 112778.

[157] Y. Huang, S.J. Richardson, C.S. Brennan, S. Kasapis, Mechanistic insights into α-amylase inhibition, binding affinity and structural changes upon interaction with gallic acid, Food Hydrocolloids, 148 (**2024**) 109467.

[158] Y.P. Devi, A. Uma, M.L. Narasu, C. Kalyani, Anticancer activity of gallic acid on cancer cell lines, HCT-15 and MDA MB 231, Int. J. Res. Appl. Nat. Soc. Sci, 2 (**2014**) 269-272.

[159] M. Kaur, B. Velmurugan, S. Rajamanickam, R. Agarwal, C. Agarwal, Gallic acid, an active constituent of grape seed extract, exhibits anti-proliferative, pro-apoptotic and anti-tumorigenic effects against prostate carcinoma xenograft growth in nude mice, Pharmaceutical research, 26 (**2009**) 2133-2140.

[160] R. Veluri, R.P. Singh, Z. Liu, J.A. Thompson, R. Agarwal, C. Agarwal, Fractionation of grape seed extract and identification of gallic acid as one of the major active constituents causing growth inhibition and apoptotic death of DU145 human prostate carcinoma cells, Carcinogenesis, 27 (**2006**) 1445-1453.

[161] A. Sathiyaseelan, X. Zhang, M.-H. Wang, Biosynthesis of gallic acid fabricated tellurium nanoparticles (GA-Te NPs) for enhanced antibacterial, antioxidant, and cytotoxicity applications, Environmental Research, 240 (**2024**) 117461.

[162] A. Jafari, M. Tabarsa, H. Naderi-Manesh, H.A. Gavlighi, S. You, Z. Vaezi, Glucosamine Hydrochloride and Glucosamine-Gallic Acid Nanoparticles for the Treatment of Osteoarthritis: Synthesis, Antioxidant, and Anti-Inflammatory, Journal of Food Biochemistry, (**2024**) 3272099.

[163] S. Shruthi, K.D. Mumbrekar, B.S. Rao, B.K. Shenoy, Gallic acid: a polyphenolic compound potentiates the therapeutic efficacy of cisplatin in human breast cancer cells, Toxicology Research, 12 (**2023**) 544-550.

[164] Z. He, X. Liu, F. Wu, S. Wu, G.O.N. Rankin, I. Martinez, Y. Rojanasakul, Y.C. Chen, Gallic acid induces S and G2 phase arrest and apoptosis in human ovarian cancer cells in vitro, Applied Sciences, 11 (**2021**) 3807.

[165] H.-H. Ho, C.-S. Chang, W.-C. Ho, S.-Y. Liao, C.-H. Wu, C.-J. Wang, Anti-metastasis effects of gallic acid on gastric cancer cells involves inhibition of NF-κB activity and downregulation of PI3K/AKT/small GTPase signals, Food and Chemical Toxicology, 48 (**2010**) 2508-2516.

[166] S. Lin, H.-Z. Qin, Z.-Y. Li, H. Zhu, L. Long, L.-B. Xu, Gallic acid suppresses the progression of triple-negative breast cancer HCC1806 cells via modulating

PI3K/AKT/EGFR and MAPK signaling pathways, Frontiers in Pharmacology, 13 (**2022**) 1049117.

[167] D. Dorniani, B. Saifullah, F. Barahuie, P. Arulselvan, M.Z.B. Hussein, S. Fakurazi, L.J. Twyman, Graphene oxide-gallic acid nanodelivery system for cancer therapy, Nanoscale research letters, 11 (**2016**) 1-9.

[168] R. Rosman, B. Saifullah, S. Maniam, D. Dorniani, M.Z. Hussein, S. Fakurazi, Improved anticancer effect of magnetite nanocomposite formulation of gallic acid (Fe3O4-PEG-GA) against lung, breast and colon cancer cells, Nanomaterials, 8 (**2018**) 83.

[169] M.F. Aldawsari, F.K. Alkholifi, A.I. Foudah, M.H. Alqarni, A. Alam, M.A. Salkini, S.H. Sweilam, Gallic-acid-loaded PLGA nanoparticles: a promising transdermal drug delivery system with antioxidant and antimicrobial agents, Pharmaceuticals, 16 (**2023**) 1090.

[170] H. Huang, Y. Hou, L. Chen, W. He, X. Wang, D. Zhang, J. Hu, Multifunctional gallic acid self-assembled hydrogel for alleviation of ethanol-induced acute gastric injury, International Journal of Pharmaceutics, 645 (**2023**) 123372.

[171] M. Martí, V. Martínez, N. Carreras, C. Alonso, M.J. Lis, J.L. Parra, L. Coderch, Textiles with gallic acid microspheres: in vitro release characteristics, Journal of microencapsulation, 31 (**2014**) 535-541.

[172] M. Martí, V. Martínez, M.J. Lis, J. Valldeperas, A. de la Maza, J.L. Parra, L. Coderch, Gallic acid vehiculized through liposomes or mixed micelles in biofunctional textiles, The Journal of The Textile Institute, 105 **(2014)** 175-186.

[173] J. Yi, H. Huang, Z. Wen, Y. Fan, Fabrication of chitosan-gallic acid conjugate for improvement of physicochemical stability of β-carotene nanoemulsion: Impact of Mw of chitosan, Food Chemistry, 362 (**2021**) 130218.

[174] G.R. Teodoro, A.V.L. Gontijo, A.C. Borges, M.H. Tanaka, G.d.M.G. Lima, M.J. Salvador, C.Y. Koga-Ito, Gallic acid/hydroxypropyl-β-cyclodextrin complex: Improving solubility for application on in vitro/in vivo Candida albicans biofilms, PLoS One, 12 (**2017**) e0181199.

[175] G. Yurtdaş-Kırımlıoğlu, Ş. Görgülü, Surface modification of PLGA nanoparticles with chitosan or Eudragit® RS 100: Characterization, prolonged release, cytotoxicity,

and enhanced antimicrobial activity, Journal of Drug Delivery Science and Technology, 61 (**2021**) 102145.

[176] A.G.S. Celep, A. Demirkaya, E.K. Solak, Antioxidant and anticancer activities of gallic acid loaded sodium alginate microspheres on colon cancer, Current Applied Physics, 40 (**2022**) 30-42.

[177] A. El-Houssiny, N. Kamel, A. Soliman, S. Abd El-Messieh, K. Abd-El-Nour, Preparation and characterisation of gallic acid loaded carboxymethyl chitosan nanoparticles as drug delivery system for cancer treatment, Advances in Natural Sciences: Nanoscience and Nanotechnology, 13 (**2022**) 025002.

[178] P. Patil, S. Killedar, Formulation and characterization of gallic acid and quercetin chitosan nanoparticles for sustained release in treating colorectal cancer, Journal of Drug Delivery Science and Technology, 63 (**2021**) 102523.

[179] Z. Jing, M. Li, H. Wang, Z. Yang, S. Zhou, J. Ma, E. Meng, H. Zhang, W. Liang, W. Hu, Gallic acid-gold nanoparticles enhance radiation-induced cell death of human glioma U251 cells, IUBMB life, 73 (**2021**) 398-407.

[180] Y. Chen, Z. Zhang, Z. Chen, S. Jiang, A. Reheman, Y. Ouyang, B. Yu, Q. Chen, D. Wei, Iron gallic acid biomimetic nanoparticles for targeted magnetic resonance imaging, Plos one, 19 (**2024)** e0306142.

[181] L. Peltonen, M. Singhal, J. Hirvonen, Principles of nanosized drug delivery systems, Nanoengineered Biomaterials for Advanced Drug Delivery, (2020) 3-25.

[182] V. Nagati, S. Tenugu, A.K. Pasupulati, Stability of therapeutic nano-drugs during storage and transportation as well as after ingestion in the human body, Advances in nanotechnology-based drug delivery systems, (**2022**) 83-102.

[183] A. Lucke, J. Teßmar, E. Schnell, G. Schmeer, A. Göpferich, Biodegradable poly (D, L-lactic acid)-poly (ethylene glycol)-monomethyl ether diblock copolymers: structures and surface properties relevant to their use as biomaterials, Biomaterials, 21 (**2000**) 2361-2370.

[184] U. Witt, R.-J. Müller, W.-D. Deckwer, New biodegradable polyester-copolymers from commodity chemicals with favorable use properties, Journal of environmental polymer degradation, 3 (**1995**) 215-223.

[185] I. Kleeberg, C. Hetz, R.M. Kroppenstedt, R.-J. Müller, W.-D. Deckwer, Biodegradation of aliphatic-aromatic copolyesters by Thermomonospora fusca and other thermophilic compost isolates, Applied and environmental microbiology, 64 (**1998**) 1731-1735.

[186] S.R. Nayebare, R. Karthikraj, K. Kannan, Analysis of terephthalate metabolites in human urine by high-performance liquid chromatography-tandem mass spectrometry (HPLC-MS/MS), Journal of Chromatography B, 1092 (**2018**) 473-479.

[187] B.V. Rodrigues, A.S. Silva, G.F. Melo, L.M. Vasconscellos, F.R. Marciano, A.O. Lobo, Influence of low contents of superhydrophilic MWCNT on the properties and cell viability of electrospun poly (butylene adipate-co-terephthalate) fibers, Materials Science and Engineering: C, 59 (**2016**) 782-791.

[188] W.A.R. Neto, A.C.C. de Paula, T.M. Martins, A.M. Goes, L. Averous, G. Schlatter, R.E.S. Bretas, Poly (butylene adipate-co-terephthalate)/hydroxyapatite composite structures for bone tissue recovery, Polymer Degradation and Stability, 120 (**2015)** 61-69.

[189] L.M.R. Vasconcellos, G.F. Santana-Melo, E. Silva, V.F. Pereira, J.C.R. Araújo, A.D.R. Silva, A.S. Furtado, C.d.M.V. Elias, B.C. Viana, F.R. Marciano, Electrospun poly (butylene-adipate-co-terephthalate)/nano-hydroxyapatite/graphene nanoribbon scaffolds improved the in vivo osteogenesis of the neoformed bone, Journal of Functional Biomaterials, 12 (**2021**) 11.

[190] H.G. Zanella, A.R.S. Rossin, J.C. Hardt, A.G. Rosenberger, J.C. Wiggers, J. Caetano, D.C. Dragunski, Electrospinning pbat (poly (butylene-adipate-co-terephthalate))/pcl (poly (ε-caprolactone) blend containing propolis for the preparation of a smart wound dressing, Química Nova, 44 (**2021**) 1245-1251.

[191] C.T. Brunner, E.T. Baran, E.D. Pinho, R.L. Reis, N.M. Neves, Performance of biodegradable microcapsules of poly (butylene succinate), poly (butylene succinate-co-adipate) and poly (butylene terephthalate-co-adipate) as drug encapsulation systems, Colloids and Surfaces B: Biointerfaces, 84 (**2011**) 498-507.

[192] A.E. Koshak, M.M. Algandaby, M.I. Mujallid, A.B. Abdel-Naim, N.A. Alhakamy, U.A. Fahmy, A. Alfarsi, S.M. Badr-Eldin, T. Neamatallah, M.Z. Nasrullah, Wound

healing activity of Opuntia ficus-indica fixed oil formulated in a self-nanoemulsifying formulation, International Journal of Nanomedicine, (**2021**) 3889-3905.

[193] A. Valentino, R. Conte, D. Bousta, H. Bekkari, A. Di Salle, A. Calarco, G. Peluso, Extracellular Vesicles Derived from Opuntia ficus-indica Fruit (OFI-EVs) Speed Up the Normal Wound Healing Processes by Modulating Cellular Responses, International Journal of Molecular Sciences, 25 (**2024**) 7103.

[194] E.Y. Abbas, M.I. Ezzat, H.M. El Hefnawy, E. Abdel-Sattar, An overview and update on the chemical composition and potential health benefits of Opuntia ficus-indica (L.) Miller, Journal of Food Biochemistry, 46 (**2022**) e14310.

[195] P. Veeramani kandan, E. Dhineshkumar, R. Karthikeyan, C. Anbuselvan, I. Maqbool, G. Kanimozhi, B. Arul Prakasam, N. Rajendra Prasad, Isolation and characterization of opuntiol from Opuntia ficus indica (L. Mill) and its antiproliferative effect in KB oral carcinoma cells, Natural Product Research, 35 (**2021**) 3146-3150.

[196] M. Antunes-Ricardo, A. Hernández-Reyes, A.C. Uscanga-Palomeque, C. Rodríguez-Padilla, A.C. Martínez-Torres, J.A. Gutiérrez-Uribe, Isorhamnetin glycoside isolated from Opuntia ficus-indica (L.) MilI induces apoptosis in human colon cancer cells through mitochondrial damage, Chemico-Biological Interactions, 310 (**2019**) 108734.

[197] M. Antunes-Ricardo, J.A. Mendiola, T. García-Cayuela, E. Ibañez, J.A. Gutiérrez-Uribe, M.P. Cano, D. Guajardo-Flores, Enzyme-assisted supercritical fluid extraction of antioxidant isorhamnetin conjugates from Opuntia ficus-indica (L.) Mill, The Journal of Supercritical Fluids, 158 (**2020**) 104713.

[198] M. Allegra, P. De Cicco, G. Ercolano, A. Attanzio, R. Busà, G. Cirino, L. Tesoriere, M.A. Livrea, A. Ianaro, Indicaxanthin from Opuntia Ficus Indica (L. Mill) impairs melanoma cell proliferation, invasiveness, and tumor progression, Phytomedicine, 50 (**2018**) 19-24.

[199] M. Allegra, A. D'Anneo, A. Frazzitta, I. Restivo, M.A. Livrea, A. Attanzio, L. Tesoriere, The phytochemical indicaxanthin synergistically enhances cisplatin-induced apoptosis in Hela cells via oxidative stress-dependent P53/P21waf1 axis, Biomolecules, 10 (**2020**) 994.

[200] S.A. Ghumman, S. Bashir, S. Noreen, A.M. Khan, M.Z. Malik, Taro-corms mucilage-alginate microspheres for the sustained release of pregabalin: In vitro & in vivo evaluation, International Journal of Biological Macromolecules, 139 (**2019**) 1191-1202.

[201] H. Berrabah, K. Taïbi, L. Ait Abderrahim, M. Boussaid, Phytochemical composition and antioxidant properties of prickly pear (Opuntia ficus-indica L.) flowers from the Algerian germplasm, Journal of Food Measurement and Characterization, 13 (**2019**) 1166-1174.

[202] C. Bastiancich, P. Danhier, V. Préat, F. Danhier, Anticancer drug-loaded hydrogels as drug delivery systems for the local treatment of glioblastoma, Journal of Controlled Release, 243 **(2016**) 29-42.

[203] A. Bregy, A.H. Shah, M.V. Diaz, H.E. Pierce, P.L. Ames, D. Diaz, R.J. Komotar, The role of Gliadel wafers in the treatment of high-grade gliomas, Expert review of anticancer therapy, 13 (**2013**) 1453-1461.

[204] K.E. Wallner, J.H. Galicich, G. Krol, E. Arbit, M.G. Malkin, Patterns of failure following treatment for glioblastoma multiforme and anaplastic astrocytoma, International Journal of Radiation Oncology Biology Physics, 16 (**1989**) 1405-1409.

[205] M. Alghamdi, M. Gumbleton, B. Newland, Local delivery to malignant brain tumors: Potential biomaterial-based therapeutic/adjuvant strategies, Biomaterials science, 9 (**2021**) 6037-6051.

[206] C. Bastiancich, J. Bianco, K. Vanvarenberg, B. Ucakar, N. Joudiou, B. Gallez, G. Bastiat, F. Lagarce, V. Préat, F. Danhier, Injectable nanomedicine hydrogel for local chemotherapy of glioblastoma after surgical resection, Journal of controlled release, 264 (**2017**) 45-54.

[207] S.H. Ranganath, C.-H. Wang, Biodegradable microfiber implants delivering paclitaxel for post-surgical chemotherapy against malignant glioma, Biomaterials, 29 (**2008**) 2996-3003.

[208] T. Fourniols, L.D. Randolph, A. Staub, K. Vanvarenberg, J.G. Leprince, V. Préat, A. des Rieux, F. Danhier, Temozolomide-loaded photopolymerizable PEG-DMA-based hydrogel for the treatment of glioblastoma, Journal of Controlled Release, 210 (**2015**) 95-104.

[209] M. Zhao, F. Danhier, C. Bastiancich, N. Joudiou, L.P. Ganipineni, N. Tsakiris, B. Gallez, A. Des Rieux, A. Jankovski, J. Bianco, Post-resection treatment of glioblastoma with an injectable nanomedicine-loaded photopolymerizable hydrogel induces long-term survival, International journal of pharmaceutics, 548 (**2018**) 522-529.

[210] O. Benny, L.G. Menon, G. Ariel, E. Goren, S.-K. Kim, C. Stewman, P.M. Black, R.S. Carroll, M. Machluf, Local delivery of poly lactic-co-glycolic acid microspheres containing imatinib mesylate inhibits intracranial xenograft glioma growth, Clinical Cancer Research, 15 (**2009**) 1222-1231.

[211] J. Dong, G. Zhou, D. Tang, Y. Chen, B. Cui, X. Dai, J. Zhang, Q. Lan, Q. Huang, Local delivery of slow-releasing temozolomide microspheres inhibits intracranial xenograft glioma growth, Journal of cancer research and clinical oncology, 138 (**2012**) 2079-2084.

[212] C. Manaspon, N. Nasongkla, K. Chaimongkolnukul, P. Nittayacharn, K. Vejjasilpa, K. Kengkoom, A. Boongird, S. Hongeng, Injectable SN-38-loaded polymeric depots for cancer chemotherapy of glioblastoma multiforme, Pharmaceutical research, 33 (**2016**) 2891-2903.

[213] H.-L. Xu, K.-L. Mao, C.-T. Lu, Z.-L. Fan, J.-J. Yang, J. Xu, P.-P. Chen, D.-L. ZhuGe, B.-X. Shen, B.-H. Jin, An injectable acellular matrix scaffold with absorbable permeable nanoparticles improves the therapeutic effects of docetaxel on glioblastoma, Biomaterials, 107 (**2016**) 44-60.

[214] D.Ç. Altındal, Therapeutic potential of boron-based nanoparticles for enhanced glioblastoma treatment, Journal of Drug Delivery Science and Technology, 99 (**2024**) 105936.

[215] D.F. Emerich, S. Winn, P. Snodgrass, D. LaFreniere, M. Agostino, T. Wiens, H. Xiong, R.T. Bartus, Injectable chemotherapeutic microspheres and glioma II: enhanced survival following implantation into deep inoperable tumors, Pharmaceutical research, 17 (**2000**) 776-781.

[216] A. Kumari, S.K. Yadav, S.C. Yadav, Biodegradable polymeric nanoparticles based drug delivery systems, Colloids and surfaces B: biointerfaces, 75 (**2010**) 1-18.

[217] M. Orunoğlu, A. Kaffashi, S.B. Pehlivan, S. Şahin, F. Söylemezoğlu, K.K. Oğuz, M. Mut, Effects of curcumin-loaded PLGA nanoparticles on the RG2 rat glioma model, Materials Science and Engineering: C, 78 (**2017**) 32-38.

[218] H. Ehrlich, M. Ilan, M. Maldonado, G. Muricy, G. Bavestrello, Z. Kljajic, J. Carballo, S. Schiaparelli, A. Ereskovsky, P. Schupp, Three-dimensional chitin-based scaffolds from Verongida sponges (Demospongiae: Porifera). Part I. Isolation and identification of chitin, International Journal of Biological Macromolecules, 47 (**2010**) 132-140.

[219] B. Mavis, T.T. Demirtaş, M. Gümüşderelioğlu, G. Gündüz, Ü. Çolak, Synthesis, characterization and osteoblastic activity of polycaprolactone nanofibers coated with biomimetic calcium phosphate, Acta biomaterialia, 5 (**2009)** 3098-3111.

[220] D.D. Cissell, J.M. Link, J.C. Hu, K.A. Athanasiou, A modified hydroxyproline assay based on hydrochloric acid in Ehrlich's solution accurately measures tissue collagen content, Tissue Engineering Part C: Methods, 23 (**2017**) 243-250.

[221] M. Ul-Islam, T. Khan, W.A. Khattak, J.K. Park, Bacterial cellulose-MMTs nanoreinforced composite films: novel wound dressing material with antibacterial properties, Cellulose, 20 (**2013**) 589-596.

[222] S.A. Holowachuk, M.F. Bal'a, R.K. Buddington, A kinetic microplate method for quantifying the antibacterial properties of biological fluids, Journal of microbiological methods, 55 (**2003**) 441-446.

[223] J. Gross, Z. Sokal, M. Rougvie, Structural and chemical studies on the connective tissue of marine sponges, Journal of Histochemistry & Cytochemistry, 4 (**1956**) 227-246.

[224] B. Diehl-Seifert, B. Kurelec, R.K. Zahn, A. Dorn, B. JeriČevic, G. Uhlenbruck, W.E. Müller, Attachment of sponge cells to collagen substrata: effect of a collagen assembly factor, Journal of Cell Science, 79 (**1985**) 271-285.

[225] D. Swatschek, W. Schatton, J. Kellermann, W.E. Müller, J. Kreuter, Marine sponge collagen: isolation, characterization and effects on the skin parameters surface-pH, moisture and sebum, European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics, 53 (**2002**) 107-113.

[226] M. Pozzolini, F. Bruzzone, V. Berilli, F. Mussino, C. Cerrano, U. Benatti, M. Giovine, Molecular characterization of a nonfibrillar collagen from the marine sponge

Chondrosia reniformis Nardo 1847 and positive effects of soluble silicates on its expression, Marine biotechnology, 14 (**2012**) 281-293.

[227] C. Di Benedetto, A. Barbaglio, T. Martinello, V. Alongi, D. Fassini, E. Cullorà, M. Patruno, F. Bonasoro, M.A. Barbosa, M.D. Candia Carnevali, Production, characterization and biocompatibility of marine collagen matrices from an alternative and sustainable source: the sea urchin Paracentrotus lividus, Marine Drugs, 12 (**2014**) 4912-4933.

[228] L. UK, Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T_4, Nature, 256 (**1975**) 495-497.

[229] Q.-Y. Han, T. Koyama, S. Watabe, Y. Nagashima, S. Ishizaki, Isolation and characterization of collagen and collagen peptides with hyaluronidase inhibition activity derived from the skin of marlin (Istiophoridae), Molecules, 28 (**2023**) 889.

[230] Y. Kumazawa, Y. Taga, K. Iwai, Y.-i. Koyama, A rapid and simple LC-MS method using collagen marker peptides for identification of the animal source of leather, Journal of agricultural and food chemistry, 64 (**2016**) 6051-6057.

[231] E.O. Osidak, E.P. Kalabusheva, E.V. Alpeeva, S.I. Belousov, S.V. Krasheninnikov, T.E. Grigoriev, S.P. Domogatsky, E.A. Vorotelyak, E.S. Chermnykh, Concentrated collagen hydrogels: A new approach for developing artificial tissues, Materialia, 20 (**2021**) 101217.

[232] D. Salthouse, P.D. Goulding, S.L. Reay, E.L. Jackson, C. Xu, R. Ahmed, A. Mearns-Spragg, K. Novakovic, C.M. Hilkens, A.M. Ferreira, Amine-reactive crosslinking enhances type 0 collagen hydrogel properties for regenerative medicine, Frontiers in Bioengineering and Biotechnology, 12 (**2024**) 1391728.

[233] M.Z. Treviño-Garza, S. García, N. Heredia, M.G. Alanís-Guzmán, K. Arévalo-Niño, Layer-by-layer edible coatings based on mucilages, pullulan and chitosan and its effect on quality and preservation of fresh-cut pineapple (Ananas comosus), Postharvest Biology and Technology, 128 (**2017**) 63-75.

[234] E. Brunner, H. Ehrlich, P. Schupp, R. Hedrich, S. Hunoldt, M. Kammer, S. Machill, S. Paasch, V. Bazhenov, D. Kurek, Chitin-based scaffolds are an integral part of the skeleton of the marine demosponge Ianthella basta, Journal of structural biology, 168 (**2009**) 539-547.

[235] T. Jesionowski, M. Norman, S. Żółtowska-Aksamitowska, I. Petrenko, Y. Joseph, H. Ehrlich, Marine spongin: Naturally prefabricated 3D scaffold-based biomaterial, Marine drugs, 16 (**2018**) 88.

[236] D.W. Hutmacher, J.T. Schantz, C.X.F. Lam, K.C. Tan, T.C. Lim, State of the art and future directions of scaffold-based bone engineering from a biomaterials perspective, Journal of tissue engineering and regenerative medicine, 1 (**2007**) 245-260.

[237] N.V. Bulina, S.V. Makarova, S.G. Baev, A.A. Matvienko, K.B. Gerasimov, O.A. Logutenko, V.S. Bystrov, A study of thermal stability of hydroxyapatite, Minerals, 11 (**2021**) 1310.

[238] M. Meyer, K. Trommer, Soft collagen-gelatine sponges by convection drying, Brazilian Archives of Biology and Technology, 58 (**2014**) 109-117.

[239] H.H. Bayraktar, E.F. Morgan, G.L. Niebur, G.E. Morris, E.K. Wong, T.M. Keaveny, Comparison of the elastic and yield properties of human femoral trabecular and cortical bone tissue, Journal of biomechanics, 37 (**2004**) 27-35.

[240] G.M. Cunniffe, G.R. Dickson, S. Partap, K.T. Stanton, F.J. O'Brien, Development and characterisation of a collagen nano-hydroxyapatite composite scaffold for bone tissue engineering, Journal of Materials Science: Materials in Medicine, 21 (**2010**) 2293-2298.

[241] W. Thein-Han, R. Misra, Biomimetic chitosan–nanohydroxyapatite composite scaffolds for bone tissue engineering, Acta biomaterialia, 5 (**2009**) 1182-1197.

[242] H. Jodati, Z. Evis, A. Tezcaner, A.Z. Alshemary, A. Motameni, 3D porous bioceramic based boron-doped hydroxyapatite/baghdadite composite scaffolds for bone tissue engineering, Journal of the Mechanical Behavior of Biomedical Materials, 140 (**2023**) 105722.

[243] F. Mukasheva, L. Adilova, A. Dyussenbinov, B. Yernaimanova, M. Abilev, D. Akilbekova, Optimizing scaffold pore size for tissue engineering: insights across various tissue types, Frontiers in Bioengineering and Biotechnology, 12 (**2024)** 1444986.

[244] Q.L. Loh, C. Choong, Three-dimensional scaffolds for tissue engineering applications: role of porosity and pore size, Tissue Engineering Part B: Reviews, 19 (**2013**).

[245] W.-C. Lee, A.R. Guntur, F. Long, C.J. Rosen, Energy metabolism of the osteoblast: implications for osteoporosis, Endocrine reviews, 38 (**2017**) 255-266.

[246] D.Ç. Altındal, M. Gümüşderelioğlu, Melatonin releasing PLGA micro/nanoparticles and their effect on osteosarcoma cells, Journal of microencapsulation, 33 (**2016**) 53-63.

[247] M. Rondanelli, M.A. Faliva, G. Peroni, V. Infantino, C. Gasparri, G. Iannello, S. Perna, A. Riva, G. Petrangolini, A. Tartara, Pivotal role of boron supplementation on bone health: A narrative review, Journal of Trace Elements in Medicine and Biology, 62 (**2020**) 126577.

[248] L.-A. Tziveleka, E. Ioannou, D. Tsiourvas, P. Berillis, E. Foufa, V. Roussis, Collagen from the marine sponges Axinella cannabina and Suberites carnosus: Isolation and morphological, biochemical, and biophysical characterization, Marine drugs, 15 (**2017**) 152.

[249] M.M. Kim, E. Mendis, N. Rajapakse, S.H. Lee, S.K. Kim, Effect of spongin derived from Hymeniacidon sinapium on bone mineralization, Journal of Biomedical Materials Research Part B: Applied Biomaterials: An Official Journal of The Society for Biomaterials, The Japanese Society for Biomaterials, and The Australian Society for Biomaterials and the Korean Society for Biomaterials, 90 (**2009**) 540-546.

[250] J. de Araújo Silva, A.F.S.B. da Silva, A.S. Alqualo, B. Viegas, A.C.M. Rennó, R.N. Granito, Cell interactions and osteogenic differentiation on marine sponge-derived scaffolds: a systematic review, Biofunctional Materials, (**2023**).

[251] S. Skariyachan, A.B. Acharya, S. Subramaniyan, S. Babu, S. Kulkarni, R. Narayanappa, Secondary metabolites extracted from marine sponge associated Comamonas testosteroni and Citrobacter freundii as potential antimicrobials against MDR pathogens and hypothetical leads for VP40 matrix protein of Ebola virus: An in vitro and in silico investigation, Journal of Biomolecular Structure and Dynamics, 34 (**2016**) 1865-1883.

[252] D. Varijakzhan, J.-Y. Loh, W.-S. Yap, K. Yusoff, R. Seboussi, S.-H.E. Lim, K.-S. Lai, C.-M. Chong, Bioactive compounds from marine sponges: Fundamentals and applications, Marine drugs, 19 (**2021**) 246.

[253] H. Chen, C.-H. Yan, Y.-F. Zhan, L.-T. Geng, L.-L. Zhu, L.-C. Gong, J. Wang, Boron derivatives accelerate biofilm formation of recombinant Escherichia coli via increasing quorum sensing system autoinducer-2 activity, International Journal of Molecular Sciences, 23 (**2022**) 8059.

[254] R. Pallela, S. Bojja, V.R. Janapala, Biochemical and biophysical characterization of collagens of marine sponge, Ircinia fusca (Porifera: Demospongiae: Irciniidae), International journal of biological macromolecules, 49 (**2011**) 85-92.

[255] G. Sabarees, S. Vishvaja, S. Raghuraman, V. Velmurugan, V. Alagarsamy, V. Raja Solomon, G. Padmini Tamilarasi, Collagen-based nanofibers: revolutionizing therapeutics for impaired wound healing, International Journal of Polymeric Materials and Polymeric Biomaterials, (**2024**) 1-29.

[256] K.H. Sizeland, K.A. Hofman, I.C. Hallett, D.E. Martin, J. Potgieter, N.M. Kirby, A. Hawley, S.T. Mudie, T.M. Ryan, R.G. Haverkamp, Nanostructure of electrospun collagen: do electrospun collagen fibers form native structures?, Materialia, 3 (**2018**) 90-96.

[257] S.Y. Bak, S.W. Lee, C.H. Choi, H.W. Kim, Assessment of the influence of acetic acid residue on type I collagen during isolation and characterization, Materials, 11 (**2018**) 2518.

[258] S. Lohrasbi, E. Mirzaei, A. Karimizade, S. Takallu, A. Rezaei, Collagen/cellulose nanofiber hydrogel scaffold: physical, mechanical and cell biocompatibility properties, Cellulose, 27 (**2020**) 927-940.

[259] J.V. Rao, R. Pallela, G. Prakash, Prospects of marine sponge collagen and its applications in cosmetology, Marine cosmeceuticals: trends and prospects, 20 (**2011**) 77-103.

[260] A. Ghosh, A.J. Grosvenor, J.M. Dyer, Marine Spongia collagens: Protein characterization and evaluation of hydrogel films, Journal of Applied Polymer Science, 136 (**2019**) 47996.

[261] A.A. Abbas, K.A. Shakir, M.K. Walsh, Functional properties of collagen extracted from catfish (Silurus triostegus) waste, Foods, 11 (**2022**) 633.

[262] E. Martins, G.S. Diogo, R. Pires, R.L. Reis, T.H. Silva, 3D biocomposites comprising marine collagen and silica-based materials inspired on the composition of

marine sponge skeletons envisaging bone tissue regeneration, Marine Drugs, 20 (**2022**) 718.

[263] H. Ehrlich, I. Miksik, M.V. Tsurkan, P. Simon, F. Porzucek, J.D. Rybka, M. Mankowska, R. Galli, C. Viehweger, E. Brendler, Discovery of mammalian collagens I and III within ancient poriferan biopolymer spongin, Nature Communications, 16 (**2025)** 2515.

[264] M.D. Shoulders, R.T. Raines, Collagen structure and stability, Annual review of biochemistry, 78 **(2009**) 929-958.

[265] K.K. Fujii, Y. Taga, Y.K. Takagi, R. Masuda, S. Hattori, T. Koide, The thermal stability of the collagen triple helix is tuned according to the environmental temperature, International journal of molecular sciences, 23 (**2022**) 2040.

[266] J. Engel, H.P. Bächinger, Structure, stability and folding of the collagen triple helix, Collagen: primer in structure, processing and assembly, (**2005**) 7-33.

[267] J.P. Widdowson, A.J. Picton, V. Vince, C.J. Wright, A. Mearns-Spragg, In vivo comparison of jellyfish and bovine collagen sponges as prototype medical devices, Journal of Biomedical Materials Research Part B: Applied Biomaterials, 106 (**2018**) 1524-1533.

[268] I. Flaig, M. Radenković, S. Najman, A. Pröhl, O. Jung, M. Barbeck, In vivo analysis of the biocompatibility and immune response of jellyfish collagen scaffolds and its suitability for bone regeneration, International Journal of Molecular Sciences, 21 (**2020**) 4518.

[269] Z. Ahmed, L.C. Powell, N. Matin, A. Mearns-Spragg, C.A. Thornton, I.M. Khan, L.W. Francis, Jellyfish collagen: A biocompatible collagen source for 3D scaffold fabrication and enhanced chondrogenicity, Marine drugs, 19 (**2021**) 405.

[270] A.R. Thoreson, R. Hiwatari, K.-N. An, P.C. Amadio, C. Zhao, The effect of 1-ethyl-3-(3-dimethylaminopropyl) carbodiimide suture coating on tendon repair strength and cell viability in a canine model, The Journal of hand surgery, 40 (**2015)** 1986-1991.

[271] A. Sionkowska, K. Kulka-Kamińska, P. Brudzyńska, K. Lewandowska, Ł. Piwowarski, The influence of various crosslinking conditions of EDC/NHS on the properties of fish collagen film, Marine Drugs, 22 (**2024**) 194.

[272] R. Gossmann, K. Langer, D. Mulac, New perspective in the formulation and characterization of didodecyldimethylammonium bromide (DMAB) stabilized poly (lactic-co-glycolic acid)(PLGA) nanoparticles, Plos one, 10 (**2015**) e0127532.

[273] R.M. Mainardes, R.C. Evangelista, PLGA nanoparticles containing praziquantel: effect of formulation variables on size distribution, International journal of pharmaceutics, 290 **(2005)** 137-144.

[274] D. Quintanar-Guerrero, H. Fessi, E. Allémann, E. Doelker, Influence of stabilizing agents and preparative variables on the formation of poly (D, L-lactic acid) nanoparticles by an emulsification-diffusion technique, International Journal of Pharmaceutics, 143 (**1996**) 133-141.

[275] M. Shilo, A. Sharon, K. Baranes, M. Motiei, J.-P.M. Lellouche, R. Popovtzer, The effect of nanoparticle size on the probability to cross the blood-brain barrier: an in-vitro endothelial cell model, Journal of nanobiotechnology, 13 (**2015**) 1-7.

[276] H. Kargarzadeh, A. Galeski, A. Pawlak, PBAT green composites: Effects of kraft lignin particles on the morphological, thermal, crystalline, macro and micromechanical properties, Polymer, 203 (**2020**) 122748.

[277] C. Fonseca, S. Simoes, R. Gaspar, Paclitaxel-loaded PLGA nanoparticles: preparation, physicochemical characterization and in vitro anti-tumoral activity, Journal of controlled release, 83 (**2002**) 273-286.

[278] H. Jarrar, D.Ç. Altındal, M. Gümüşderelioğlu, Scaffold-based osteogenic dual delivery system with melatonin and BMP-2 releasing PLGA microparticles, International Journal of Pharmaceutics, 600 (**2021**) 120489.

[279] S. Mao, Y. Shi, L. Li, J. Xu, A. Schaper, T. Kissel, Effects of process and formulation parameters on characteristics and internal morphology of poly (d, l-lactide-co-glycolide) microspheres formed by the solvent evaporation method, European journal of pharmaceutics and biopharmaceutics, 68 (**2008)** 214-223.

[280] C.G. da Rosa, C.D. Borges, R.C. Zambiazi, M.R. Nunes, E.V. Benvenutti, S.R. da Luz, R.F. D'Avila, J.K. Rutz, Microencapsulation of gallic acid in chitosan, β-cyclodextrin and xanthan, Industrial crops and products, 46 (**2013**) 138-146.

[281] S. Shrivastava, B. Gidwani, A. Gupta, C.D. Kaur, Preparation and characterization of microspheres containing Gallic acid, Advance Pharmaceutical Journal, 1 (**2016**) 95-100.

[282] T. Mahboob, M. Nawaz, M. de Lourdes Pereira, T. Tian-Chye, C. Samudi, S.D. Sekaran, C. Wiart, V. Nissapatorn, PLGA nanoparticles loaded with Gallic acid-a constituent of Leea indica against Acanthamoeba triangularis, Scientific reports, 10 **(2020**) 8954.

[283] P. Trivedi, A. Verma, N. Garud, Preparation and characterization of aceclofenac microspheres, Asian Journal of Pharmaceutics, 2 (**2008**).

[284] C. Nagda, N. Chotai, S. Patel, Preparation and in vitro evaluation of bioadhesive microparticulate system, International Journal of Pharmaceutical Sciences and Nanotechnology, 1 (**2008**) 257-266.

[285] R.J. Whitehurst, Emulsifiers in food technology, Wiley Online Library (**2004**).

[286] M.A. Attia Shafie, H. Mohammed Fayek, Formulation and evaluation of betamethasone sodium phosphate loaded nanoparticles for ophthalmic delivery, J Clin Exp Ophthalmol, 4 (**2013**) 2.

[287] A. Allafchian, S.A.H. Jalali, F. Hosseini, M. Massoud, Ocimum basilicum mucilage as a new green polymer support for silver in magnetic nanocomposites: production and characterization, Journal of environmental chemical engineering, 5 (**2017**) 5912-5920.

[288] D. Read, P. Gregory, Surface tension and viscosity of axenic maize and lupin root mucilages, The New Phytologist, 137 (**1997)** 623-628.

[289] Y. Nabar, J.M. Raquez, P. Dubois, R. Narayan, Production of starch foams by twin-screw extrusion: Effect of maleated poly (butylene adipate-co-terephthalate) as a compatibilizer, Biomacromolecules, 6 (**2005**) 807-817.

[290] Y. Chen, X.-L. Zheng, D.-L. Fang, Y. Yang, J.-K. Zhang, H.-L. Li, B. Xu, Y. Lei, K. Ren, X.-R. Song, Dual agent loaded PLGA nanoparticles enhanced antitumor activity in a multidrug-resistant breast tumor xenograft model, International journal of molecular sciences, 15 (**2014**) 2761-2772.

[291] D.L. Cooper, S. Harirforoosh, Effect of formulation variables on preparation of celecoxib loaded polylactide-co-glycolide nanoparticles, PLoS One, 9 (**2014**) e113558.

[292] S. Honary, F. Zahir, Effect of zeta potential on the properties of nano-drug delivery systems-a review (Part 1), Tropical journal of pharmaceutical research, 12 (**2013**) 255-264.

[293] Y. Aktaş, M. Yemisci, K. Andrieux, R.N. Gürsoy, M.J. Alonso, E. Fernandez-Megia, R. Novoa-Carballal, E. Quiñoá, R. Riguera, M.F. Sargon, Development and brain delivery of chitosan− PEG nanoparticles functionalized with the monoclonal antibody OX26, Bioconjugate chemistry, 16 **(2005**) 1503-1511.

[294] C. Quinzio, C. Ayunta, M. Alancay, B.L. de Mishima, L. Iturriaga, Physicochemical and rheological properties of mucilage extracted from Opuntia ficus indica (L. Miller). Comparative study with guar gum and xanthan gum, Journal of Food Measurement and Characterization, 12 (**2018**) 459-470.

[295] Y.-X. Weng, Y.-J. Jin, Q.-Y. Meng, L. Wang, M. Zhang, Y.-Z. Wang, Biodegradation behavior of poly (butylene adipate-co-terephthalate)(PBAT), poly (lactic acid)(PLA), and their blend under soil conditions, Polymer Testing, 32 (**2013**) 918-926.

[296] L. Tavares, N. Ito, M. Salvadori, D. Dos Santos, D. Rosa, PBAT/kraft lignin blend in flexible laminated food packaging: Peeling resistance and thermal degradability, Polymer Testing, 67 **(2018**) 169-176.

[297] J. Li, S.Y. Kim, X. Chen, H.J. Park, Calcium-alginate beads loaded with gallic acid: Preparation and characterization, LWT-Food science and technology, 68 (**2016**) 667-673.

[298] C. Tsioptsias, I. Tsivintzelis, Insights on thermodynamic thermal properties and infrared spectroscopic band assignments of gallic acid, Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis, 221 (**2022**) 115065.

[299] S. Singh, S.B. Bothara, Physico-chemical and structural characterization of mucilage isolated from seeds of Diospyros melonoxylon Roxb, Brazilian Journal of Pharmaceutical Sciences, 50 (**2014**) 713-725.

[300] A.K. Nayak, D. Pal, S. Das, Calcium pectinate-fenugreek seed mucilage mucoadhesive beads for controlled delivery of metformin HCl, Carbohydrate polymers, 96 (**2013**) 349-357.

[301] I. Volf, I. Ignat, M. Neamtu, V. Popa, Thermal stability, antioxidant activity, and photo-oxidation of natural polyphenols, Chemical papers, 68 (**2014**) 121-129.

[302] C. Bonnenfant, N. Gontard, C. Aouf, Biobased and biodegradable polymers in a circular economy context: Understanding quercetin and gallic acid impacts on PHBV thermal properties, Polymer Degradation and Stability, 201 (**2022)** 109975.

[303] U. Sonchaeng, J. Promsorn, N. Bumbudsanpharoke, V. Chonhenchob, S.S. Sablani, N. Harnkarnsujarit, Polyesters incorporating gallic acid as oxygen scavenger in biodegradable packaging, Polymers, 14 (**2022**) 5296.

[304] L. Medina-Torres, E. García-Cruz, F. Calderas, R.G. Laredo, G. Sánchez-Olivares, J. Gallegos-Infante, N. Rocha-Guzmán, J. Rodríguez-Ramírez, Microencapsulation by spray drying of gallic acid with nopal mucilage (Opuntia ficus indica), LWT-Food Science and Technology, 50 (**2013**) 642-650.

[305] A. Paolini, V. Curti, F. Pasi, G. Mazzini, R. Nano, E. Capelli, Gallic acid exerts a protective or an anti-proliferative effect on glioma T98G cells via dose-dependent epigenetic regulation mediated by miRNAs, International journal of oncology, 46 (**2015**) 1491-1497.

[306] E.T. Chan, C. Kural, Targeting endocytosis to sensitize cancer cells to programmed cell death, Biochemical Society Transactions, 52 (**2024**) 1703-1713.

[307] G. Pistritto, D. Trisciuoglio, C. Ceci, A. Garufi, G. D'Orazi, Apoptosis as anticancer mechanism: function and dysfunction of its modulators and targeted therapeutic strategies, Aging, 8 (**2016**) 603.

[308] A. Saraste, K. Pulkki, Morphologic and biochemical hallmarks of apoptosis, Cardiovascular research, 45 (**2000**) 528-537.

[309] G. Irmak, M.G. Öztürk, M. Gümüşderelioğlu, Salinomycin encapsulated PLGA nanoparticles eliminate osteosarcoma cells via inducing/inhibiting multiple signaling pathways: Comparison with free salinomycin, Journal of Drug Delivery Science and Technology, 58 (**2020**) 101834.

[310] A.L. Hsieh, Z.E. Walton, B.J. Altman, Z.E. Stine, C.V. Dang, MYC and metabolism on the path to cancer, Seminars in cell & developmental biology, (**2015**) 11-21.

[311] M. Antunes-Ricardo, B.E. Moreno-García, J.A. Gutiérrez-Uribe, D. Aráiz-Hernández, M.M. Alvarez, S.O. Serna-Saldivar, Induction of apoptosis in colon cancer

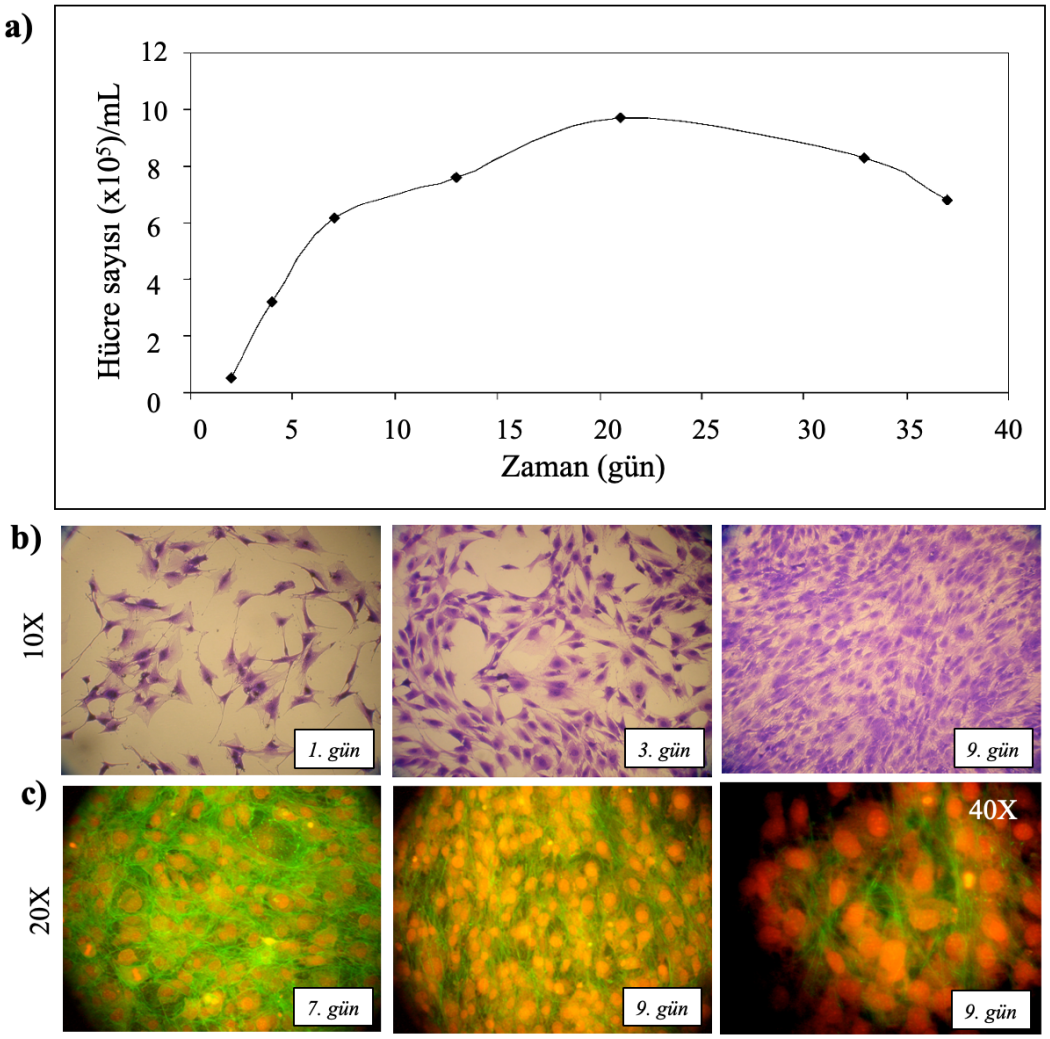
cells treated with isorhamnetin glycosides from Opuntia ficus-indica pads, Plant Foods for Human Nutrition, 69 (**2014**) 331-336.

[312] A. Sezin, Biyomimetik Apatit Kaplı ve Heparin Fonksiyonalitesine Sahip Kitosan Doku İskelelerinde Kondrosit ve Osteoblast Aktivitelerinin İncelenmesi, Yüksek Lisans Tezi, Hacettepe Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü, Ankara, **2008**.

[313] C. Kutlu, Beyin Tümörlerinin Tedavisi İçin Çift Etkili Doku İskelesi-Nanopartikül Sistemlerinin Geliştirilmesi, Yüksek Lisans Tezi, Hacettepe Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü, Ankara, **2011**.

EKLER

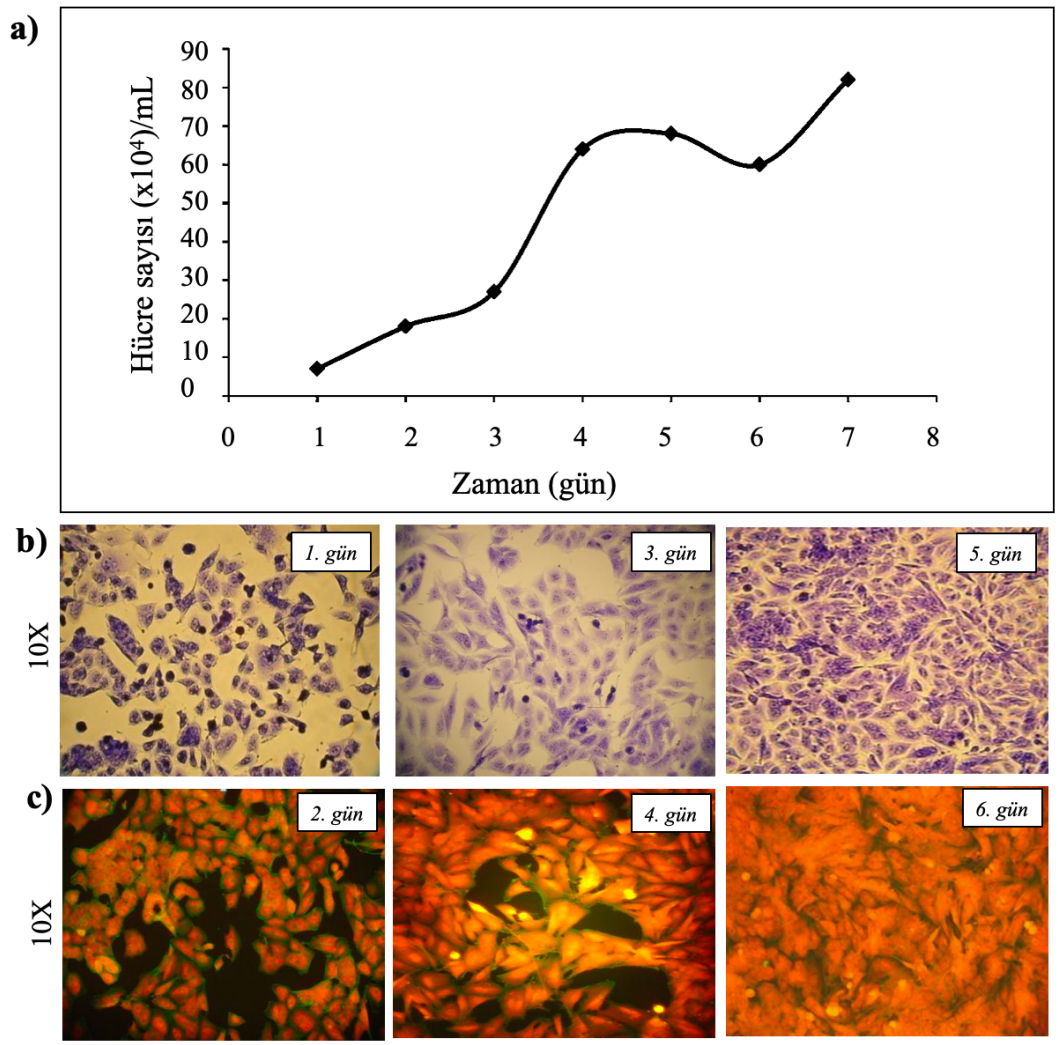
EK 1 – Tez Çalışmasında Kullanılan Hücrelerin Karakterizasyonu



Şekil E1.1. MC3T3-E1 hücrelerinin a) hemasitometrik hücre sayımı ile elde edilen üreme grafiği, farklı günlerdeki b) Kristal viyole boyama görüntüleri, c) Alexa Fluor ®488 ve PI ile yapılan ikili floresan boyama görüntüleri (kırmızı renk ile hücre çekirdekleri yeşil renk ile hücre iskeleti boyanmıştır) ([312]'den değiştirilerek).

Özgül üreme hızı: 0,019 sa^{-1} [312].

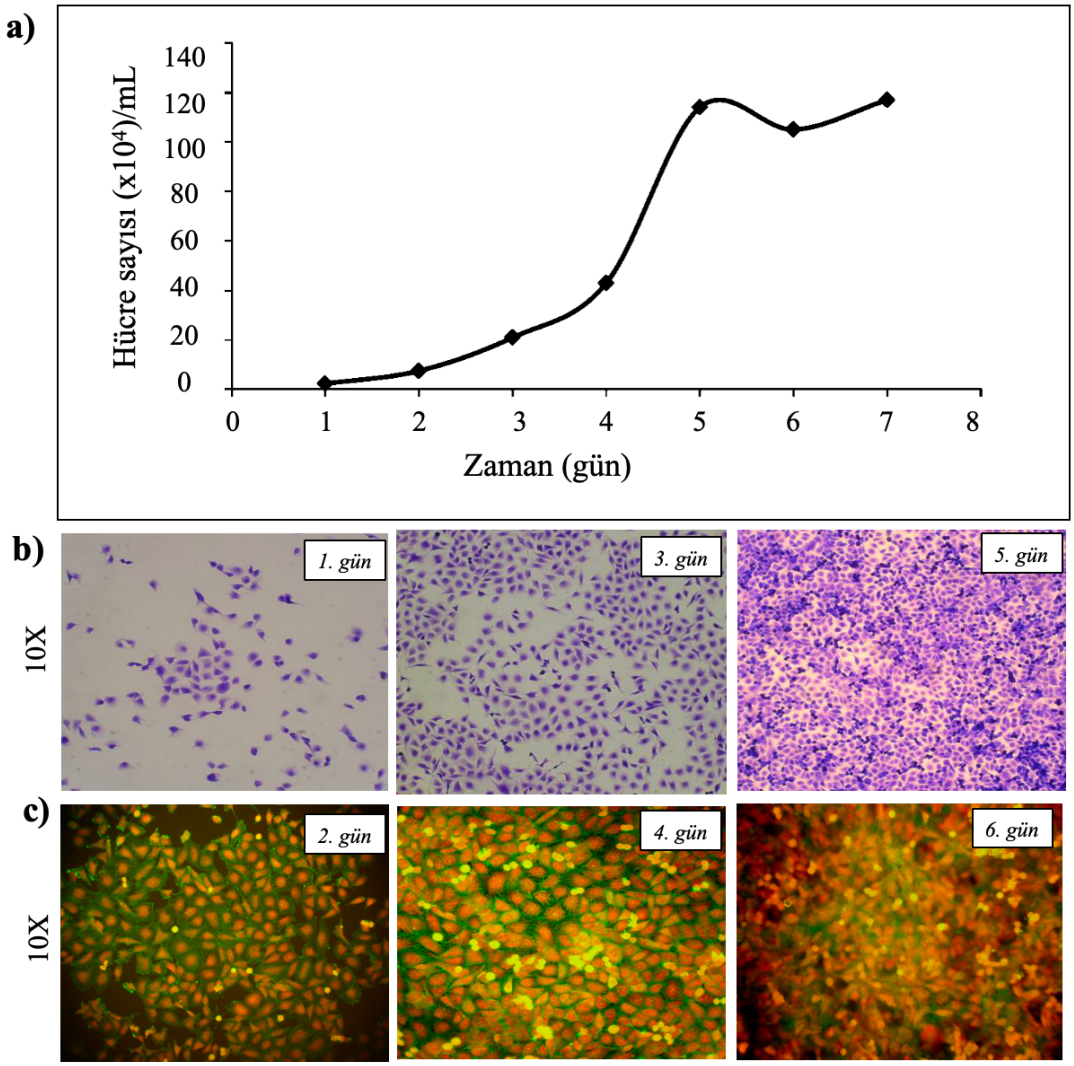
İkilenme süresi: 36 sa [312].



Şekil E1.2. T98G hücrelerinin a) hemasitometrik hücre sayımı ile elde edilen üreme grafiği, farklı günlerdeki b) Kristal viyole boyama görüntüleri, c) Alexa Fluor ®488 ve PI ile yapılan ikili floresan boyama görüntüleri (kırmızı renk ile hücre çekirdekleri yeşil renk ile hücre iskeleti boyanmıştır) ([313]'ten değiştirilerek).

Özgül üreme hızı: 0,0159 sa^{-1} [313].

İkilenme süresi: 43,39 sa [313].



Şekil E1.3. HUVEC'lerin a) hemasitometrik hücre sayımı ile elde edilen üreme grafiği, farklı günlerdeki b) Kristal viyole boyama görüntüleri, c) Alexa Fluor ®488 ve PI ile yapılan ikili floresan boyama görüntüleri (kırmızı renk ile hücre çekirdekleri yeşil renk ile hücre iskeleti boyanmıştır) ([313]'den değiştirilerek).

Özgül üreme hızı: 0,0279 sa^{-1} [313].

İkilenme süresi: 24,73 sa [313].

EK 2 – Tezden Türetilmiş Yayınlar

Yayın 1: *Yayınlandı*

Başlık: Nopal Mucilage-Encapsulated Poly (Butylene Adipate-co-Terephthalate) Nanoparticles for Efficient Gallic Acid Delivery in Glioblastoma Cells.

Dergi: Journal of Drug Delivery Science and Technology

Etki faktörü: 4,9

Yayın yılı: 2025

Künye: Çakır, D., & Gümüşderelioğlu, M. (2025). Nopal Mucilage-Encapsulated Poly (Butylene Adipate-co-Terephthalate) Nanoparticles for Efficient Gallic Acid Delivery in Glioblastoma Cells. Journal of Drug Delivery Science and Technology, 107025.

Yayın 2: *Değerlendirmede*

Başlık: Comprehensive *In Vitro* and *In Vivo* Assessment of Spongin/Hydroxyapatite Biohybrid Scaffolds for Bone Regeneration

Dergi: Biomaterials Advances

Etki faktörü: 5,5

Yayın yılı: 2025 (Tahmini)

Künye: Çakır, D., Erkut, T. S., Irmak, Y, Çalış, M., Yavaş, E., Çaylı, S. & Gümüşderelioğlu, M. Comprehensive *In Vitro* and *In Vivo* Assessment of Spongin/Hydroxyapatite Biohybrid Scaffolds for Bone Regeneration. Biomaterials Advances.

EK 3 – Tezden Üretilmiş Projeler

Proje 1:

Hacettepe Üniversitesi Bilimsel Araştırmalar Birimi – Hızlı Destek Projesi

Proje No: FHD-2024-21229

Proje Adı: Gallik Asitin Opuntia Nopal Müsilajı Kaplı Poli(bütilenadipat-ko-tereftalat) Nanopartiküllerden Salımı ve Glioblastoma Hücreleri Üzerindeki Etkisi

Yürütücü: Prof. Dr. Menemşe Gümüşderelioğlu

Araştırmacılar: Arş. Gör. Demet Çakır

Proje 2:

Hacettepe Üniversitesi Bilimsel Araştırmalar Birimi - Doktora tez projesi

Proje No: FDK-2020-18871

Proje Adı: *Sarcotragus foetidus* Süngerinin Sert ve Yumuşak Doku Mühendisliği Uygulamaları için Fabrikasyonu ve *İn-vitro* Karakterizasyonu

Yürütücü: Prof. Dr. Menemşe Gümüşderelioğlu

Araştırmacılar: Arş. Gör. Demet Çakır