

**KEMİK DOKU MÜHENDİSLİĞİNDE MELATONİN- β
SİKLODEKSTRİN İNKLÜZYON KOMPLEKSLERİNİN
ETKİNLİĞİNİN ARAŞTIRILMASI**

**INVESTIGATION OF EFFECTIVENESS OF MELATONIN- β
CYCLODEXTRIN INCLUSION COMPLEXES IN BONE
TISSUE ENGINEERING**

BEDRİYE TOPAL

PROF. DR. MENEMŞE GÜMÜŞDERELİOĞLU

Tez Danışmanı

Hacettepe Üniversitesi

Lisansüstü Eğitim – Öğretim ve Sınav Yönetmeliğinin

KİMYA Mühendisliği Anabilim Dalı İçin Öngördüğü

YÜKSEK LİSANS TEZİ

Olarak hazırlanmıştır.

2015

Bedriye TOPAL'ın hazırladığı “Kemik doku mühendisliğinde melatonin/ β siklodekstrin inklüzyon komplekslerinin etkinliğinin araştırılması” adlı bu çalışma aşağıdaki jüri tarafından KİMYA MÜHENDİSLİĞİ ANABİLİM DALI' nda YÜKSEK LİSANS TEZİ olarak kabul edilmiştir.

Prof. Dr. Zümriye AKSU

Başkan

Prof. Dr. Menemşe GÜMÜŞDERELİOĞLU

Danışman

Doç. Dr Ayşe KARAKEÇİLİ

Üye

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

Prof. Dr. Fatma SEVİN DÜZ
Fen Bilimleri Enstitüsü Müdürü

Biricik Aileme...

ETİK

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

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

beyan ederim.

04/09/2015

Bedriye TOPAL

ÖZET

KEMİK DOKU MÜHENDİSLİĞİNDE MELATONİN- β SİKLODEKSTRİN İNKLÜZYON KOMPLEKSLERİNİN ETKİNLİĞİNİN ARAŞTIRILMASI

Bedriye TOPAL

Yüksek Lisans, Kimya Mühendisliği Bölümü

Tez Danışmanı: Prof. Dr. Menemşe GÜMÜŞDERELİOĞLU

Eylül 2015, 87 sayfa

Bu çalışma, TÜBİTAK 2210-C Öncelikli Alanlara Yönelik Yurt İçi Yüksek Lisans Burs Programı ve Hacettepe Üniversitesi Bilimsel Araştırma Birimi, FBA-2015-5315 numaralı proje kapsamında desteklenerek hazırlanmıştır. Sunulan tez çalışmasının amacı, antikanserojen ve antiproliferatif etkilere sahip melatoninin az olan sudaki çözünürlüğünün hidroksipropil- β -siklodekstrin (HP β CD) molekülleri ile inklüzyon kompleksi oluşturarak artırılması ve üretilen inklüzyon komplekslerinin kitosan doku iskelelerine yüklenmesinin ardından melatoninin *in-vitro* salım etkinliğinin insan kemik kanser hücreleri üzerindeki sitotoksik etkisinin incelenmesidir.

Tez çalışmasının ilk aşamasında, melatonin/HP β CD inklüzyon kompleksleri oda sıcaklığında fiziksel karıştırma yöntemi kullanılarak oluşturulmuştur. Inklüzyon kompleksi oluşumunun dengeye ulaşip ulaşmadığının anlaşılması için farklı sürelerde denemeler yapılmıştır. Higuchi-Connor faz çözünürlük çalışması yapılarak, oluşturulan inklüzyon kompleksinin içerdiği melatonin miktarı ve kararlılık sabitleri belirlenmiştir. Sonuç olarak, oda sıcaklığında fiziksel karıştırma yöntemi ile inklüzyon kompleksi oluşumunun 72 saatte tamamlandığı ve 0.034 M melatonin içerdiği bulunmuştur.

Tez çalışmasının sonraki aşamasında, melatonin/HP β CD inklüzyon komplekslerinin mikrodalga yöntemiyle oluşturulması hedeflenmiştir. Bu yöntemle üretilebilecek en yüksek melatonin içeriğine sahip inklüzyon kompleksinin belirlenmesi için farklı mikrodalga güçleri ve alıkonna süreleri ile çeşitli denemeler yapılmıştır. Higuchi-Connor faz çözünürlük çalışması sonucunda, 0.043 M melatonin içeriğine sahip inklüzyon kompleksinin elde edildiği 900 W,

60°C ve 90s mikrodalga koşulu, optimum mikrodalga koşulu olarak belirlenmiştir. Oda sıcaklığında fiziksel karıştırma ile mikrodalga yöntemleri karşılaştırıldığında, oda koşullarında 3 günde üretilen inklüzyon kompleksinin, mikrodalga koşullarında 90 saniyede oluşturulduğu görülmüştür.

Çalışmanın bir sonraki aşamasında, mikrodalga yöntemiyle üretilen melatonin/HPβCD inklüzyon kompleksi vakum altında kurutularak katı hale getirilmiştir. Bu katı inklüzyon kompleksinin fizikokimyasal özelliklerinin belirlenmesi amacıyla, Fourier dönüşümlü infrared spektroskopisi (FTIR), diferansiyel taramalı kalorimetri (DSC), termogravimetrik analiz (TGA), ¹H ve ¹³C nükleer manyetik rezonans spektroskopisi (¹H ve ¹³C NMR) ve X ışını kırınımı (XRD) analizleri ile karakterizasyon çalışmaları yürütülmüştür. Sonuç olarak, melatonin/HPβCD inklüzyon kompleksinin varlığı kanıtlanmıştır. Ayrıca, melatoninin siklodekstrin boşluğuna yapının geniş kısmından girdiği ve hidrofobik etkileşimlerin komplekste etkili olduğu görülmüştür.

İnküzyon kompleksinin yükleneceği doku iskelesi, ağırlıkça %2'lik kitosan çözeltilerinden dondurarak-kurutma yöntemiyle hazırlanmıştır. Melatonin ve melatonin/HPβCD inklüzyon kompleksleri emdirme yoluyla kitosan doku iskelelerine yüklenmiş ve fosfat tampon çözeltilerinde *in vitro* salım gerçekleştirilmiştir. Sonuç olarak, melatonin ve melatonin/HPβCD inklüzyon kompleksleri iskelelere sırasıyla 1.53±0.21 ve 2.58±0.01 mg yüklendiği ve ortama ilk 5 saatte sırasıyla 1.08 ve 2.16 mg melatoninin salındığı hesaplanmıştır. İnküzyon kompleksi kullanıldığında, salınan melatonin miktarının daha yüksek olduğu sonucuna varılmıştır.

Çalışmanın son aşamasında, melatonin ve melatonin/HPβCD inklüzyon kompleksinin insan osteosarkom kemik kanser hücreleri (MG-63) üzerindeki sitotoksik etkisi incelenmiştir. Hücrelerin canlılığı ve çoğalması MTT (3-[4,5-dimetiltiazol-2-il]-2,5-difeniltetrazolyum bromür) analiziyle ve hücre morfolojileri optik mikroskop görüntüleriyle değerlendirilmiştir. Melatonin ve melatonin/HPβCD inklüzyon kompleksinin hücre döngüsü üzerindeki etkileri akış sitometrisi ile belirlenmiştir. Sonuç olarak; inklüzyon kompleksinin ilk günden itibaren 3 gün boyunca hücreler üzerinde apoptotik etkilere neden olduğu görülmüştür. Akış sitometrisi ile yapılan 24 saatlik çalışma sonucunda, melatonin/HPβCD inklüzyon kompleksinin MG-63 hücrelerinin çoğalmasını G₀/G₁ hücre döngü fazında inhibe ettiği belirlenmiştir.

Sonuç olarak, melatonin/HPβCD inklüzyon kompleksi yüklü kitosan doku iskelelerinin insan osteosarkom hastalığının uzun süreli tedavisinde kullanılabilir bir sistem olduğu düşünülmüştür.

Anahtar kelimeler: Osteosarkom, melatonin, HPβCD, inklüzyon kompleksi, kitosan doku iskelesi, ilaç salımı.

ABSTRACT

INVESTIGATION OF EFFECTIVENESS OF MELATONIN- β CYCLODEXTRIN INCLUSION COMPLEXES IN BONE TISSUE

Bedriye TOPAL

Master of Science, Department of Chemical Engineering Division

Supervisor: Prof. Dr. Menemşe GÜMÜŞDERELİOĞLU

September 2015, 87 pages

This thesis was supported financially within the scope of TÜBİTAK 2210-C Primary Subject Scholarship for National Master Program and FBA-2015-5315 project of Hacettepe University Scientific Research Fund. The aim of the present study is to increase the low aqueous solubility of melatonin which has antiproliferative and anticancerogenic effects by forming inclusion complexes with hydroxypropyl- β -cyclodextrin (HP β CD) molecules and to investigate the cytotoxic effects of melatonin releasing from the chitosan scaffold on human bone cancer cells.

In the first part of the study, the melatonin/HP β CD inclusion complexes were formed by using physical mixture method at room temperature. Experiments were carried out in different exposure times in order to understand whether the inclusion complex formation reached the equilibrium. The melatonin amount within obtained inclusion complex and stability constants were determined by performing Higuchi-Connor's phase solubility study. The inclusion complexes obtained via physical mixture at room temperature were reached the chemical equilibrium at 72 hours and contained 0.034 M of melatonin content.

It was aimed to form melatonin/HP β CD inclusion complexes via microwave treatment. The experiments were made out in different microwave powers and exposure times to produce inclusion complex which has maximum melatonin content. According to the results of Higuchi-Connor's phase solubility diagrams, optimum microwave conditions were specified as 900 W, 60°C and 90 s with 0.043 M melatonin content in inclusion complex. The production of inclusion complexes via physical mixture method was lasted as three days meanwhile it was lasted 90 seconds for microwave method.

In the next part of the study, the melatonin/HP β CD inclusion complex produced at optimum microwave conditions via microwave method was solidified by vacuum drying. In order to

prove the physicochemical properties of the solid melatonin/HP β CD inclusion complexes, the Fourier transform infrared spectroscopy (FTIR), differential scanning calorimetry (DSC), thermogravimetric analysis (TGA), ^1H and ^{13}C nuclear magnetic resonance spectroscopy (^1H and ^{13}C NMR) and X-ray diffraction (XRD) were performed as characterization studies. Consequently, melatonin/HP β CD inclusion complex was proved with the help of these analysis. Also, melatonin was gone into the cyclodextrin's cavity from its wide side and the hydrophobic interactions applied in the inclusion complex.

Scaffold loading with inclusion complex was prepared from the %2 (w/v) chitosan solutions via freeze-drying technique. Melatonin and melatonin/HP β CD inclusion complexes were loaded into the chitosan scaffold via embedding technique and *in vitro* release was performed to the phosphate buffer solution (PBS). Melatonin and melatonin/HP β CD inclusion complexes were loaded respectively 1.53 ± 0.211 and 2.58 ± 0.0064 mg into the scaffolds and for first 5 hours 1.08 and 2.16 mg melatonin were diffused into the PBS medium, respectively. In comparison with melatonin loaded scaffold, inclusion complex loaded scaffold was released more melatonin to the medium.

In the last part of the study, cytotoxic effects of melatonin and melatonin/HP β CD inclusion complexes were investigated on the human osteosarcoma bone cancer cells (MG-63). The cell viability and proliferation were evaluated by MTT (3-[4,5-dimethylthiazoyl-2-yl]-2,5-diphenyltetrazolium bromide) assay and the morphological examination was evaluated with optical microscope images. The effects of melatonin and melatonin/HP β CD inclusion complexes on cell cycle were determined by flow cytometer analysis. Consequently, the inclusion complexes had apoptotic effect on tumor cells during 3 days. Besides, melatonin/HP β CD inclusion complexes were inhibited the MG-63 cell proliferation at G₀/G₁ cell cycle phase.

In conclusion, melatonin/HP β CD inclusion complex loaded chitosan scaffolds could be considered as an alternative system for the human osteosarcoma therapy.

Keywords: Osteosarcoma, melatonin, HP β CD, inclusion complexes, chitosan scaffold, drug release.

TEŞEKKÜR

Tez çalışmalarımın yönlendirilmesi, yürütülmesi ve sonuçlandırılması için engin bilgi ve tecrübeleriyle bana yol gösteren, maddi ve manevi olarak desteğini hiçbir zaman esirgemeyen, iş disiplini ve ahlaki değerlere verdiği önemin yanı sıra bir bilim insanı olarak hayatım boyunca örnek alacağım çok değerli hocam **Prof. Dr. Menemşe Gümüşderelioğlu**’na, bu süreçte hep yanımda olduğu ve sağladığı olanaklar için sonsuz saygı ve teşekkürlerimi sunarım.

Tez çalışmam boyunca 2210-C Öncelikli Alanlara Yönelik Yurt İçi Yüksek Lisans Burs Programı kapsamında maddi destek sağlayan **TÜBİTAK Bilim İnsanı Destekleme Daire Başkanlığı**’na teşekkürlerimi sunarım.

Tez çalışmalarımın yürütülmesinde emeği geçen, bilgi ve tecrübelerini benden esirgemeyen, her derdim ve sıkıntıda yanımda olduğunu bildiğim, güler yüzlü, değerli çalışma arkadaşım **Arş. Gör. Damla Çetin Altındal**’a,

Berber çalışmaktan ve sohbet etmekten büyük keyif aldığım sevgili laboratuvar arkadaşlarım **Arş. Gör. Merve Çapkın Yurtsever**’e, **Anıl Sera Çakmak**’a, **Arş. Gör. Soner Çakmak**’a, **Arş. Gör. Işıl Gerçek Beşkardeş**’e, **Özge Ekin Tunçay**’a, **Gökçe Kaynak**’a ve **Murat Şimşek**’e,

Laboratuvarda çalışmaya başladığı ilk günden itibaren yanlarında olmaktan büyük keyif aldığım, kahkaha kaynaklarım, hayatı paylaştığı, molalarımın vazgeçilmezleri, çok sevdiğim arkadaşlarım **Derya Kalelioğlu**’na, **Meryem Sümeyye Akdemir**’e, **Elif Sunal**’a, **İnci R. Şıxaliyeva**’ya, **Tuğçe Gültan**’a, **Ebru Tamahkar**’a, **Gülseren Irmak**’a ve **Şeyma Bektaş**’a,

Lisansta başlayan dostluğumuzun yüksek lisansta pekiştiği, hayatımın her döneminde yanımda olan, samimiyeti, tatlılığı ve yardımseverliği ile insanın içini ısıtan sevgili dostum **Aysu Arslan**’a,

Bana Ankara’yı sevdiren, yüksek lisansta beri hiç yalnız bırakmayan, desteğini ve sevgisini her zaman hissettiğim sevgili dostum **Merve Kutucu**’ya,

Üniversite serüvenim sürecinde gözümü her kapadığımda, kendimi güvende hissetmemi sağlayan ve haklarını hiçbir zaman ödeyemeyeceğim çok değerli Sipahi ailesine, hayat kurtarıcılarım **Tansu halama**, **Tevfik enişteme**, **Duygu**’ya ve **Fırat**’a,

Beni gözünden bile sakınan, hayatımı anlamlı kılan, neşe kaynağım, canımın içi, biricik **Annem**’e; hayata bakışı ve tecrübesiyle her zaman yol gösterici olan, fikirlerine hayranlık duyduğum canım **Babam**’a; kalbimin en derinindeki olmazsa olmazlarım, bir tanecik kardeşlerim **Ece Nur**’a ve **Mine**’ye;

En içten sevgi ve teşekkürlerimi sunarım.

İÇİNDEKİLER

ÖZET.....	i
ABSTRACT	ivii
TEŞEKKÜR	vi
SİMGELER VE KISALTMALAR.....	xiv
1. GİRİŞ	1
2. GENEL BİLGİLER.....	4
2.1. Tümör Oluşumu ve Mekanizması	4
2.2. Osteosarkom.....	6
2.2.1. Klinik tedavi yöntemleri.....	8
2.3. Melatonin	9
2.3.1. Melatoninin kanser üzerindeki etkileri ve etki etme yolları.....	12
2.4. Hidrofobik Ajanların Sudaki Çözünürlüklerini Arttırma Yöntemleri.....	13
2.4.1. Parçacık boyutunu küçültme	13
2.4.2. Katı dağılımı.....	13
2.4.3. Nanosüspansiyon.....	14
2.4.4. Kriyojenik teknikler	14
2.5. Siklodekstrinler	14
2.6. İnküzyon Kompleksleri.....	17
2.6.1. İnküzyon komplekslerinin üretim yöntemleri.....	19
2.6.2. İnküzyon komplekslerinin karakterizasyon teknikleri	20
2.6.2.1. Higuchi-Connor faz çözünürlük çalışması	21
2.6.3. İnküzyon komplekslerinin kullanım alanları.....	23
2.6.4. İnküzyon komplekslerinin ilaç sektöründe kullanılması.....	24
2.7. Mikrodalga Enerjisi	25
3. DENEYSEL ÇALIŞMALAR	28
3.1. Kullanılan Kimyasallar ve Cihazlar	30
3.2. Melatonin/ HPβCD İnküzyon Kompleksinin Üretim Yöntemleri	30
3.2.1. Melatonin tayini ve kalibrasyonu grafiğinin oluşturulması	31
3.2.2. Higuchi-Connor faz çözünürlük diyagramının eldesi	31
3.2.3. Melatonin/HPβCD inklüzyon komplekslerinin mikrodalga yöntemi ile elde edilmesi ve optimum koşullarının belirlenmesi.....	32

3.2.4. Melatonin/ HP β CD inklüzyon komplekslerinin oda koşullarında fiziksel karıştırma yöntemi ile elde edilmesi.....	32
3.2.5. Melatonin/HP β CD inklüzyon komplekslerinin kurutulması.....	33
3.3. Melatonin/HP β CD İnküzyon Komplekslerinin Karakterizasyonu	33
3.3.1. Fourier dönüşümlü infrared spektroskopisi (FTIR) analizi.....	33
3.3.2. Diferansiyel taramalı kalorimetri (DSC) analizi	33
3.3.3. Termogravimetrik (TGA) analiz	33
3.3.4. X ışını kırınımı (XRD) analizi	33
3.3.5. ^1H ve ^{13}C nükleer manyetik rezonans spektroskopisi (NMR) analizi.....	33
3.3.6. Kompleks oluşturma veriminin hesaplanması	34
3.4. Melatonin/HP β CD İnküzyon Kompleksi İçeren ve İçermeyen (Boş) Kitosan Doku İskelelerinin Sentez ve Karakterizasyonu	34
3.4.1. Boş kitosan doku iskelelerinin sentezi	34
3.4.2. Melatonin ve melatonin/HP β CD inklüzyon komplekslerinin kitosan doku iskelelerine yüklenmesi ve yüklü iskelelerin karakterizasyonu.....	34
3.4.2.1. Yükleme yönteminin seçimi.....	34
3.4.2.2. Doku iskelelerinin kurutma yönteminin belirlenmesi.....	35
3.4.2.3. SEM ile görüntüleme	35
3.4.2.4. XRD analizi.....	35
3.4.3. Melatonin ve melatonin/HP β CD inklüzyon komplekslerinin kitosan doku iskelelerine yükleme miktarının hesaplanması	35
3.4.4. <i>İn vitro</i> Melatonin Salım Çalışması	36
3.5. Hücre Kültür Çalışmaları	36
3.5.1. Hücre kültür koşulları.....	36
3.5.1.1. MTT analizi.....	37
3.5.1.2. İvert mikroskop ile görüntüleme	37
3.5.1.3. Akış sitometride hücre döngüsünün belirlenmesi	37
3.5.1.4. İstatistiksel analiz	38
4. SONUÇLAR VE TARTIŞMA.....	39
4.1. Melatonin/HP β CD İnküzyon Komplekslerinin Hazırlanması	39
4.1.1. Melatonin/ HP β CD inklüzyon komplekslerinin oda sıcaklığında fiziksel karıştırma yöntemi ile elde edilmesi.....	40
4.1.2. Melatonin/HP β CD inklüzyon komplekslerinin mikrodalga yöntemi ile elde edilmesi ve optimum koşulların belirlenmesi.....	42

4.1.3. Melatonin/HP β CD inklüzyon kompleksi üretim verimi	45
4.2. Melatonin/HP β CD İnküzyon Komplekslerinin Karakterizasyonları	45
4.2.1. Fourier dönüşümlü infrared spektroskopi (FTIR) analizi	45
4.2.2. Diferansiyel taramalı kalorimetrik analiz (DSC) ve termogravimetrik analiz (TGA) ...	47
4.2.3. X-Işını kırınım (XRD) analizi	49
4.2.4. ¹ H nükleer manyetik rezonans spektroskopisi (¹ H NMR).....	51
4.2.5. ¹³ C nükleer manyetik rezonans spektroskopisi (¹³ C NMR)	53
4.3. Melatonin/HP β CD İnküzyon Kompleksinin Kitosan Doku İskelelerine Yükleme Çalışması	56
4.3.1. Melatonin ve melatonin/HP β CD inklüzyon komplekslerinin kitosan doku iskelesine yükleme yönteminin seçilmesi	56
4.3.2. Yüklü iskelelerin kurutma tekniğinin seçimi	56
4.3.3. Yüklü kitosan doku iskelelerinin taramalı elektron mikroskobu (SEM) ile karakterizasyonu.....	58
4.3.4. Yüklü kitosan doku iskelelerinin XRD ile karakterizasyonu	59
4.4. Melatonin ve Melatonin/HP β CD İnküzyon Kompleksinin Kitosan Doku İskelelerine Yükleme Miktarının Belirlenmesi ve <i>İn vitro</i> Salım Çalışması.....	60
4.4.1. Kitosan doku iskelesi başına düşen melatonin ve melatonin/HP β CD inklüzyon kompleksi miktarının belirlenmesi	60
4.5.2. <i>İn vitro</i> salım çalışması	60
4.5. Hücre Kültür Çalışmaları	63
4.5.1. MTT analizi.....	63
4.5.2. Invert mikroskop ile analiz.....	65
4.5.3. Akış sitometrisi ile hücre döngü analizi	67
5. GENEL SONUÇLAR	69
6. KAYNAKLAR.....	71
7. EKLER	82
ÖZGEÇMİŞ	87

ŞEKİLLER

Şekil 2.1. Sağlıklı bir hücrenin hücre döngü evreleri (G0, G1, S, M ve G2) ve bazı kontrol noktaları.....	5
Şekil 2.2. Yetişkin uzun kemiklerin yapısı ve bölümleri.	7
Şekil 2.3. Epifiz bezinde melatoninin metabolik yolağı	10
Şekil 2.4. Melatoninin serbest radikalleri uzaklaştırma mekanizması	11
Şekil 2.5. α -, β - ve γ - siklodekstrinlerin kimyasal yapılarının karşılaştırılması.....	15
Şekil 2.6. Siklodekstrin molekülünün inklüzyon kompleksi oluşumunun şematik gösterimi .	18
Şekil 2.7. Inklüzyon kompleks tipi (a) (1:1) ve (b) (1:2); (c, d) bağıl boyutların kompleks oluşumuna etkisi.....	18
Şekil 2.8. Higuchi- Connor faz çözünürlük grafiğı	23
Şekil 2.9. Mikrodalganın çeşitli malzemelerle etkileşimi: (a) elektriksel olarak iletken, (b) yalıtkan, (c) mikrodalgayı soğuran malzemeler ve (d) mikrodalgayı soğuran çözeltiyi içeren malzemeler	26
Şekil 2.10. (a) Mikrodalga ve (b) geleneksel ısıtma mekanizmalarının karşılaştırılması	27
Şekil 3.1. Tez çalışmasının akış çalışması.	29
Şekil 3.2. Melatonin konsantrasyonunun belirlenmesinde kullanılan kalibrasyon grafiğı (Dalga boyu: 279 nm).	31
Şekil 4.1. Oda koşullarında fiziksel karıştırma yöntemi ile oluşturulan inklüzyon komplekslerine ait faz çözünürlük diyagramları: (a) 24 saat ve (b) 72 saat.....	41
Şekil 4.2. Farklı mikrodalga koşullarında elde edilen melatonin/HP β CD inklüzyon komplekslerinin faz çözünürlük diyagramları: (a) 150 W, 90 s; (b) 600 W, 90 s; (c) 900 W, 90s; (d) 900 W, 45 s; (e) 900 W, 180 s ve (f) 150 W, 180 s.....	43
Şekil 4.3. Melatonin/HP β CD inklüzyon kompleksi ve inklüzyon kompleksi bileşenlerine ait FTIR spektrumları: (a) melatonin, (b) HP β CD, (c) melatonin/HP β CD inklüzyon kompleksi ve (d) melatonin/HP β CD fiziksel karışımı.....	46
Şekil 4.4. DSC termogramları: (a) melatonin, (b) HP β CD, (c) melatonin/HP β CD inklüzyon kompleksi ve (d) melatonin/HP β CD fiziksel karışımı.	47
Şekil 4.5. Termogravimetrik analiz sonuçları: (a) melatonin, (b) HP β CD, (c) melatonin ve HP β CD inklüzyon kompleksi ve (d) melatonin/HP β CD fiziksel karışımı.	48
Şekil 4.6. XRD sonuçları: (a) melatonin, (b) HP β CD, (c) melatonin/HP β CD fiziksel karışım ve (d) melatonin/HP β CD inklüzyon kompleksi.....	50

Şekil 4.7. HPβCD'ne ait H atomlarının numaralandırılması.	52
Şekil 4.8. Melatonin molekülünde bulunan karbon atomlarının numaralandırılması.....	54
Şekil 4.9. HPβCD molekülünde yer alan karbon atomlarının numaralandırılması.....	54
Şekil 4.10. Vakumda kurutulmuş çözücü yüklü kitosan doku iskelelerinin ağırlık kayıplarını gösteren grafik.....	56
Şekil 4.11. Liyofilizatörde kurutulmuş yüklü kitosan doku iskelelerinin ağırlık kayıplarını gösteren grafik.....	57
Şekil 4.12. Vakumda kurutulmuş (a) etanol, (b) su ve (c) %50 (v/v) etanol çözeltisi emdirilen ve dondurarak-kurutulmuş (d) etanol, (e) su ve (f) %50 (v/v) etanol çözeltisi emdirilen kitosan doku iskelelerinin görüntüleri.	57
Şekil 4.13. Kitosan doku iskelelerinin x 250 büyütmedeki SEM görüntüleri: (a) boş kitosan doku iskelesi, (b) vakumda kurutulmuş inklüzyon kompleksi yüklü kitosan doku iskelesi ve (c) dondurarak-kurutulmuş inklüzyon kompleksi yüklü kitosan doku iskelesi.	58
Şekil 4.14. Dondurarak-kurutulmuş melatonin/HPβCD inklüzyon kompleksi yüklü kitosan doku iskelesinin SEM görüntüleri: (a) x 1,000, (b) x 3,000 ve (c) x 10,000.	58
Şekil 4.15. (a) Boş ve (b) melatonin/HPβCD inklüzyon kompleksi yüklü kitosan doku iskelelerinin XRD grafikleri.....	59
Şekil 4.16. Melatonin/HPβCD inklüzyon kompleksi yüklü kitosan doku iskelelerinden salınan iskele başına düşen melatonin miktarca kümülatif salım değerleri.....	61
Şekil 4.17. Melatonin/HPβCD inklüzyon kompleksi yüklü kitosan doku iskelelerinden salınan melatonin yüzde kümülatif salım değerleri.	61
Şekil 4.18. Melatonin yüklü kitosan doku iskelesinden salınan iskele başına düşen melatonin miktarca kümülatif salım değerleri.....	62
Şekil 4.19. Melatonin yüklü kitosan doku iskelesinden salınan iskele başına düşen melatonin yüzde kümülatif salım değerleri.	62
Şekil 4.20. TCPS, boş kitosan, melatonin/HPβCD kompleks yüklü ve melatonin yüklü kitosan doku iskeleleri ile doğrudan etkileşen MG-63 hücrelerinin MTT sonuçlarını gösteren grafik. (İstatistiksel olarak anlam farklılığı, TCPS kontrol grubu iken, * p<0.05, ** p<0.01, *** p<0.001; boş kitosan doku iskelesi kontrol grubu iken; # p<0.05, ## p< 0.01, ### p<0.001)	64
Şekil 4.21. Boş ve yüklü kitosan doku iskeleleri ile etkileştirilen MG-63 hücrelerine ait optik mikroskop görüntüleri: TCPS grubu: (a) 1.gün, 20X; (b) 2.gün, 20X; (c) 3. gün, 20X; boş kitosan doku iskelesi grubu: (d) 1. gün, 20X, (e) 2.gün, 20X; (f) 3. gün, 20X; inklüzyon kompleksi yüklü kitosan doku iskelesi grubu: (g) 1. gün, 20X; (h) 2.gün, 20X; (i) 3. gün, 20X;	

melatonin yüklü kitosan doku iskelesi grubu: (j) 1. gün,20X; (k) 2. gün, 10X ve (l) 3. gün, 20X.	66
Şekil 4.22. Boş kitosan, melatonin/HPβCD kompleks yüklü ve melatonin yüklü kitosan doku iskeleleri ile doğrudan etkileşen MG-63 hücrelerinin hücre döngü analizi sonuçlarını gösteren grafik. (İstatistiksel olarak anlam farklılığı, boş kitosan doku iskelesi kontrol grubu iken, * p<0.05, ** p<0.01, *** p<0.001; boş kitosan kontrol grubu iken; # p<0.05, ## p< 0.01, ### p<0.001)	68
Şekil 7.1. Melatonin/HPβCD inklüzyon kompleksi oluşturma veriminin hesaplanmasında kullanılan UV kalibrasyon grafiği.....	82
Şekil 7.2. Melatoninin etanol içerisindeki miktarının belirlenmesi için kullanılan kalibrasyon grafiği.	83
Şekil 7.3. <i>In vitro</i> salım çalışmasında salınan melatonin miktarının belirlenmesinde kullanılan kalibrasyon grafiği.....	84

ÇİZELGELER

Çizelge 2.1. Temel ve modifiye edilmiş siklodekstrinler ve karakteristik özellikleri.....	16
Çizelge 2.2. Siklodekstrin içeren ticari ilaçlar	25
Çizelge 3.1. Melatonin/HP β CD inklüzyon kompleksi oluşturulması için kullanılan mikrodalga koşulları.....	32
Çizelge 4.1. Oda sıcaklığında fiziksel karıştırma yöntemi ile oluşturulan melatonin/HP β CD inklüzyon komplekslerinin özellikleri.....	41
Çizelge 4.2. Farklı mikrodalga koşullarında oluşturulan melatonin/HP β CD inklüzyon komplekslerinin özellikleri.....	44
Çizelge 4.3. HP β CD'nin ve melatoninin kimyasal kayma değerleri	52
Çizelge 4.4. HP β CD ve melatoninin ¹³ C NMR kimyasal kayma değerleri.	55
Çizelge 4.5. Farklı çözeltilerdeki melatonin ve melatonin/HP β CD inklüzyon komplekslerinin kitosan doku iskelelerine yüklenme miktarları.	60
Çizelge 4.6. Hücre döngü analizi sonucu elde edilen fazlara göre yüzde hücre sayı dağılımı.	67

SİMGELER VE KISALTMALAR

Simgeler

α	Alfa
β	Beta
γ	Gama
μ	Mikro

Kısaltmalar

CD	Siklodekstrin Molekülü
DNA	Deoksiribonükleik Asit
DMEM	Dulbecco's Modified Eagle Medium
DSC	Diferansiyel Taramalı Kalorimetri
HP β CD	Hidroksipropil-beta-siklodekstrin
HP γ CD	Hidroksipropil- γ -siklodekstrin
FBS	Fetal Sığır Serumı
FTIR	Fourier Dönüşümlü Kızılötesi Spektroskopisi
L	Misafir Molekülü
Me β CD	Metillenmiş- β -siklodekstrin
MTT	3-[4,5-dimetilazol-2-il]-difenilterazolyum bromür

NMR	Nükleer Manyetik Rezonans Spektroskopisi
PBS	Fosfat Tampon Çözeltisi
Poli(HEMA)	Polihidroksietil-metakrilat
SBECD	Sülfobütileter- β -siklodekstrin
SEM	Taramalı Elektron Mikroskobu
TGA	Termogravimetrik Analiz
TCPS	Hücre Kültür Kabı
WHO	Dünya Sağlık Örgütü
XRD	X-Işını Kırınımı
α -CD	α -Siklodekstrin
β -CD	β -Siklodekstrin
γ -CD	γ -Siklodekstrin

1.GİRİŞ

Osteosarkom; kemiklerde başlayan, çoğunlukla kemiklere ve akciğerlere saldırgan bir şekilde yayılan, çocukluk ve ergenlik çağındaki bireylerde en sık görülen kötü huylu insan kemik tümör tipidir [1]. DNA üzerindeki bazı genlerde meydana gelen mutasyonlar sonucu ortaya çıkan Li-Fraumeni ve retinblastoma gibi çeşitli kalıtsal hastalıklarla osteosarkom hastalığı arasında bir bağlantının olduğu rapor edilmiştir. Osteosarkom tümörlerinin oluşma nedeni kesin olarak bilinmemekle birlikte hastalığın oluşumuna neden olan risk faktörleri ergenlik gelişim parlaması, yaş, cinsiyet, genetik ve çevresel faktörler olarak sıralanabilir [2].

Osteosarkom tedavisinin temel amacı, sekonder tümör oluşumunun engellenerek uzun süreli iyileşme sağlamaktır. Bu amaçla; cerrahi operasyon ve kemoterapi gibi çeşitli tedavi yöntemleri bir arada kullanılmaktadır. Tümörün tipi, yeri ve kapsamına bağlı olarak yapılan cerrahi operasyonun amacı, yeterli boyutlardaki lezyonun tek parça halinde çıkarılmasıdır. Operasyon sonrasında oluşabilecek metastazı engelleyebilmek amacı ile kimyasal tedavi (kemoterapi) uygulanmaktadır [3]. Ancak, kemoterapide kullanılan antikanser ilaçların kısa ve uzun vadede meydana gelen yan etkileri klinik uygulamalarda karşılaşılan en önemli sorunlardan biridir. Bu sorunun giderilebilmesi için moleküler ve hücresel temelli alternatif tedavi yöntemleri araştırılmaktadır. Ayrıca kullanılan ilaçların hedef bölgeye istenilen doz ve sürede etki etmesi bu ilaçların yan etkilerini en aza indirme konusunda oldukça önem arz etmektedir. Ameliyat ile kemikten lokal olarak çıkartılan tümör yerini boşluğa bırakmaktadır. Bu boşluğa hem mekanik destek sağlamak, hem de oluşabilecek malin tümör hücrelerinin çoğalmasını engellemek adına, doğrudan hedef dokuda işlev görecektir salım sistemleri geliştirilmelidir. Bu sistemlerin geliştirilebilmesi için toksik etki yaratmayan, içerisine ilaç yüklenebilecek kadar gözenekli, biyouyumlu ve üretimi kolay malzemelerden yararlanılmalıdır.

Yapılan klinik çalışmalar, osteosarkom hücreleri oluşmaya başladığında melatonin üretiminin azaldığına işaret etmektedir. Tüm canlılarda bulunan ve insanlarda epifiz bezinden salgılanan melatonin biyolojik saati düzenleme, kemik oluşumu ve diğer hormonların salgılanmasını düzenleme gibi birçok önemli fizyolojik işleve sahip indolamin yapısında bir hormondur. Melatonin seviyesinde görülen bu azalma giderildiği takdirde osteosarkom hücrelerinin gelişimi ve yayılımının engellenebileceği ön görülmüştür ve yüksek miktarlardaki melatoninin insan osteosarkom hücrelerinin çoğalmasını engellediği kanıtlanmıştır [4].

Melatoninin birçok kanser türüne de olumlu bir biçimde etki ettiği kanıtlanmıştır [5, 6]. Bu hormonun kanser hastalığını doğrudan ve dolaylı olarak koruyucu, iyileştirici veya metastazı engelleyici yönde etkilediği bilinmektedir. Ancak, lipofilik yapısından dolayı sudaki çözünürlüğünün düşük olması, melatoninin bu olumlu özelliklerinin kullanımını sınırlandırmaktadır. Bu sorunun giderilebilmesi için sunulan tez çalışmasında biyoyoumluluğu, hedef organa doğrudan uygulanabilirliği ve üretim kolaylığı gibi avantajları nedeniyle siklodekstrinler ile melatoninin inklüzyon kompleksi oluşturulması düşünülmüştür.

Siklodekstrinler, birbirlerine α (1-4) bağı ile bağlanmış 6 (α), 7 (β), 8 (γ) veya daha fazla glikopiranoz birimlerinden oluşan halkalı oligosakkaritlerdir ve nişastanın *glucanotransferase* enzimi ile parçalanma reaksiyonu sonucu üretilmektedirler. Temel siklodekstrinler olarak da bilinen kristal formdaki α , β ve γ siklodekstrinlerin molekülleri arasındaki kuvvetli bağlar nedeniyle sudaki çözünürlükleri benzer sakkaritlere göre oldukça düşüktür. Ayrıca β siklodekstrinlerin ikincil hidroksil grupları arasında hidrojen bağları oluşması sonucu, kendilerini çevreleyen su molekülleri ile hidrojen bağı oluşumunu azaltmaları, sudaki çözünürlüklerinin düşük olmasına neden olmaktadır. Sınırlı suda çözünürlüğe sahip olmaları nedeniyle doğal siklodekstrinlerin birçok türevi sentezlenmiştir. Bu türevlerden biri de β siklodekstrinin sekonder hidroksil grupları üzerinden gerçekleşen ve hidroksipropil yapıları ile yer değiştirme reaksiyonu sonucu elde edilen hidroksipropil- β -siklodekstrindir (HP β CD). Yapılan toksikolojik çalışmalarda yüksek suda çözünürlüğe sahip olan HP β CD'nin intravenöz ve oral uygulama sonucunda insan vücudunda iyi tolere edilebildiği görülmüştür [7]. Siklodekstrinler, glikozidik oksijenler ve metil protonları nedeniyle apolar bir boşluğa, birincil ve ikincil hidroksillerin varlığı nedeniyle polar bir dış yüzeye sahiptir [7]. Bu nedenle birçok hidrofobik molekülle "inklüzyon kompleksi" denilen yapılar oluşturabilmektedir. Siklodekstrin molekülünün içerisindeki boşluğun bir molekül ile tamamen ya da kısmen doldurulmasıyla oluşan yapılar "inklüzyon kompleksleri" adı verilmektedir [8]. Oluşturulan inklüzyon kompleksleri içerdikleri hidrofobik moleküllerin fiziksel, kimyasal ve biyolojik özelliklerini arttırmaktadır. Literatürde melatoninin siklodekstrinler ile inklüzyon kompleksi oluşturmasına yönelik çeşitli çalışmalar mevcuttur. Bu çalışmalarda fiziksel karıştırma, yoğurma ve dondurarak-kurutma gibi yöntemler kullanılarak melatonin/siklodekstrin inklüzyon kompleksleri oluşturulmuştur [9, 10].

Sunulan tez çalışmasında sudaki yüksek çözünürlüğü ve toksik olmayan yapısından dolayı HP β CD kullanılarak melatonin ile inklüzyon komplekslerinin oluşturulması düşünülmüştür.

Kompleks oluşturulmasında kısa sürede ve yüksek verimde üretime olanak sağlaması nedeniyle “mikrodalga yöntemi” tercih edilmiştir. Ayrıca, tez çalışmasında melatonin ve melatonin/HP β CD inklüzyon komplekslerinin insan osteosarkom hücrelerine dolaylı olarak etki edecek bir taşıyıcı sistem geliştirilmesi hedeflenmiştir. Bu taşıyıcı sistemin osteosarkom tedavisinde uygulanan cerrahi işlemin ardından kemikte oluşan boşluğa yerleştirilerek bu bölgeye hem mekanik destek sağlaması, hem de olası tümör hücrelerinin metastazını engellenmesi amaçlanmaktadır. Bu amaca yönelik olarak melatonin, melatonin/HP β CD inklüzyon kompleksi ve kitosan doku iskelesi taşıyıcı sistem bileşenleri olarak seçilmiştir. Melatonin/HP β CD inklüzyon kompleksi mikrodalga teknolojisi aracılığıyla üretilmiştir. Oluşturulan kompleks Higuchi-Connor faz çözünürlük çalışması, Fourier dönüşümlü infrared spektroskopisi (FTIR), diferansiyel taramalı kalorimetri (DSC), termogravimetrik analiz (TGA), X ışını kırınımı (XRD) ve nükleer magnetik rezonans spektroskopisi (NMR) gibi çeşitli enstrümental analizlerle karakterize edilmiştir. Üretilen melatonin/HP β CD inklüzyon kompleksleri kitosan doku iskelelerine emdirme yöntemi ile yüklenmiş ve *in vitro* salım çalışması gerçekleştirilerek melatoninin salım kinetiği hakkında bilgi edinilmiştir. Ardından, melatonin ve melatonin/HP β CD inklüzyon kompleksi içeren ve içermeyen kitosan doku iskelelerinin osteosarkom hücreleri üzerindeki doğrudan etkisini incelemek için insan osteosarkom hücre hattı (MG-63) ile çalışılmış ve yukarıda belirtilen yapıların (boş kitosan doku iskelesi, melatonin/HP β CD inklüzyon kompleks yüklü kitosan doku iskelesi ve melatonin yüklü kitosan doku iskelesi) bu hücreler üzerindeki etkileri MTT (3-(4,5-dimethylthiazoyl-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide), optik mikroskop ve hücre döngü analizi ile belirlenmiştir.

İlgili literatürde melatonin/HP β CD inklüzyon kompleksinin mikrodalga yöntemi kullanılarak üretildiği başka bir çalışmaya rastlanılmamıştır. Ayrıca inklüzyon kompleksinin taşıyıcı sistem yardımı ile salımının gerçekleştirildiği başka bir çalışmayla da karşılaşılmamıştır. Melatoninin yüksek dozlarda hedef bölgeye bir anda ve hızlı bir şekilde etki ederek metastazı engelleyebilmesi uzun süreli osteosarkom tedavisinde oldukça önemli bir adımdır. Sunulan tez çalışması açıklanan bu noktalarıyla özgün bir çalışmadır.

2. GENEL BİLGİLER

Bu bölümde, yapılan tez çalışmasının temelini oluşturan konularla ilgili literatür bilgisi 5 ana başlıkta toplanmıştır. Öncelikle tümör oluşumundan ve mekanizmasından bahsedilmiş, osteosarkom hastalığı hakkında bilgi verilmiştir. Ardından, melatoninin kimyasal, fiziksel ve fonksiyonel özellikleri özetlenmiş; etki ettiği kanser türlerinin yanı sıra kansere karşı etki etme yolları da açıklanmıştır. Bir sonraki bölümde ise, hidrofobik ilaçların sudaki çözünürlüklerini arttırma yöntemleri hakkında bilgi verilmiştir. Siklodekstrin moleküllerinin çeşitleri, özellikleri ve oluşturdukları inklüzyon komplekslerinin önemi, çeşitli ilaçlarla yapılan çalışmaları, üretim ve karakterizasyon yöntemleri, uygulandığı alanlar ve ilaç taşıyıcı olarak kullanımı detaylı bir biçimde izah edilmiştir. Son olarak mikrodalga enerjisinin çeşitli prosesler üzerindeki etkisinden bahsedilmiştir.

2.1. Tümör Oluşumu ve Mekanizması

Kanser; hücre çoğalması ve ölümü arasındaki dengenin bozulması sonucu görülen anormal hücre birikimidir. Bu dengenin bozulma nedeni, hücrenin normal yaşam döngüsünü kontrol altında tutan gen ifadelerinde meydana gelen değişimlerdir. Kanser hücre topluluğu vücudun daha uzak bölgelerinde yer alan sağlıklı hücrelere invazyon yaparak yayılır ve tedavi edilmediği takdirde sağlıklı hücrelerin ölümüne yol açar [11].

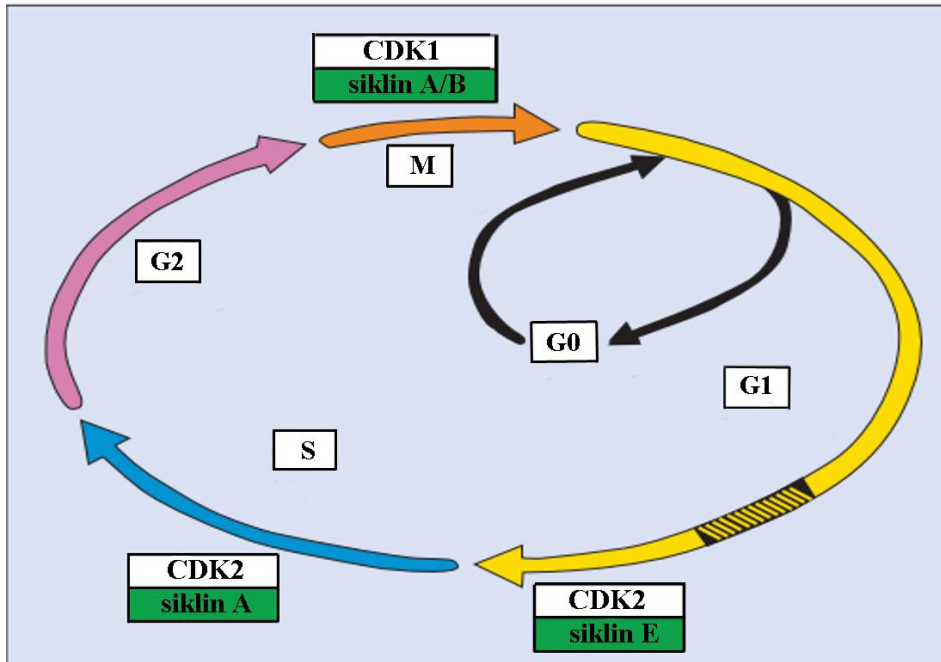
Kontrolsüz olarak çoğalan hücre topluluğuna tümör adı verilmektedir. Kötü huylu (malin) ve iyi huylu (benin) tümörleri birbirinden ayıran en önemli özellik; malin tümörlerin metastazik olmasıdır. Malin tümör hücrelerinin en belirgin özellikleri klonal kaynaklı oluşları, ölümsüzlüğü, genetik kararlılığı, kontakt inhibisyon, substurata tutunarak büyümede görülen kayıpları, büyüme faktörü ve besinlerden bağımsız gerçekleşen hücre çoğalması ve sağlıklı hücrelere metastazı olarak sıralanabilir [12].

Kanser hücrelerin sürekli ve kontrolsüz bir şekilde çoğalması ile ölümsüzlüğünün anlaşılabilmesi için ilk olarak normal hücrenin çoğalma mekanizması ve yaşam döngüsünün açıklanması önemlidir. Sağlıklı hücrenin yaşam döngüsü, hücrenin oluşumundan ölümüne kadar geçen evrelerdir. Tümör hücresi ise ölümsüzdür; sürekli bölünür ve çoğalır. Bu durum hücre yaşam döngüsünde görülen aksaklıklar ile ilgilidir.

Hücre yaşam döngüsü (cell growth cycle), hücrenin iki bölünme arasında geçen sürede hücrede meydana gelen bir dizi geçici biyokimyasal aktivitenin ve morfolojik değişikliğin olduğu süreç olarak tanımlanmıştır. Bölünmeye giren hücrelerin genetik ve morfolojik olarak birbirinin aynısı iki hücre oluşturarak döngüyü tamamladıkları bildirilmiştir [13]. Hücre bölünmesinin

görülmesinin temel nedeni, hücrede madde iletiminde ve çekirdeğin hücreyi kontrolünde zorlanmanın başlamasıdır.

Genel olarak, hücreler bir bölünme sinyali almadığı zaman hücre döngüsünün aktif (G_1, S, G_2 ve M) fazlarına girmezler ve dinlenme fazı denilen G_0 fazında beklerler. Hücre döngüsü sentez (S) ve mitoz (M) evreleri olmak üzere iki temel süreçten oluşmaktadır. Bu süreçlerde sırasıyla çekirdek DNA'sının sentez ve eşleme işlemleri için yapılan hazırlıklar ile hücrenin bölünme olayı gerçekleşmektedir. Oluşan döngüde DNA sentezi ile mitoz bölünme işlemleri arasında görülen zamansal farklar, boşluk fazları (G_1 ve G_2) olarak tanımlanır. Bu süreçlerde G_1 fazında DNA sentezlenirken, G_2 fazında olası herhangi bir DNA hasarı giderilmektedir. Bu süreçlerin gerçekleşmesinde sitokinler, mitojenler ve büyüme faktörlerinin uyarımları önemlidir. Sürecin hatasız olarak yürütülebilmesi için hücrelerin bölünüp bölünmeyeceğine karar veren hücre içi proteinler, evreler arasındaki geçişlerde kontrol noktaları olarak görev yapmaktadırlar. Hücre döngüsüne başlayacak ve ilerleyecek hücrelerin kapasitesi siklinler adı verilen proteinler ve bu proteinlerin sikline bağlı kinaz (CDK) etkileşimi ile sağlanmaktadır. Siklin ve kinazlar arasındaki bu etkileşim mekanizmaları oldukça karmaşıktır. İlgili CDK'lar ile etkileşmiş siklin D ve siklin E varlığı hücre döngüsünün G_1 kısmı ile ilgilidir. Siklin A varlığı, DNA sentezinin tamamlandığının işaretçisidir. Birleşmiş siklin B ve CDK1 varlığı döngünün mitoz bölünmeye geçtiğinin göstergesidir [14]. Hücre döngü evreleri ve bazı kontrol noktaları Şekil 2.1'de gösterilmiştir.



Şekil 2.1. Sağlıklı bir hücrenin hücre döngü evreleri (G_0, G_1, S, M ve G_2) ve bazı kontrol noktaları [14].

Normal bir hücre yaşam döngüsünde, hücrenin bölünmesini arttıran ve normal hücre ölümlerini inhibe edici protein üretimini sağlayan “proto-onkogenler”, hücre bölünmesini engelleyen veya ölümlerine neden olan proteini yapan “tümör baskılayıcı genler” ile kansere neden olan DNA mutasyonlarından koruyan “DNA tamir edici genler” bulunmaktadır. Hücrenin normal bir yaşam sürmesi bu genlerin dengeli bir şekilde çalışması ile bağlantılıdır. Aksi takdirde bu genler arasındaki herhangi bir düzensizlik kansere neden olmaktadır [15].

Kanser gelişimini tetikleyen etiyolojik faktörler kalıtsal ve çevreseldir. Genetik mutasyonların oluşumuna zemin hazırlayan kimyasal maddeler, tütün ürünleri, ışımaya, diyet, yaşlanma ve virüsler tümör oluşumuna neden olan çevresel faktörler olarak sıralanabilir. Proto-onkogenler, herhangi bir mutasyon sonucunda kanser yapıcı onkogenlere dönüşmektedirler. Onkogenler ve tümör baskılayıcı genlerde görülen genetik bozulma, ürettikleri normal hücrelerin yaşam döngüsünün kontrolünü sağlayan proteinleri bozarak kanser gelişimine neden olmaktadır. Buna ek olarak, kanser hücrelerinin ölümsüz olması ve sürekli çoğalmasının telomeraz aktivitesi ve apoptoz özelliklerinde görülen değişimlerinden kaynaklandığı saptanmıştır.

Telomerler kromozomların iki uç bölgesinde bulunan ve mitoz bölünme sırasında kesilerek kısalan kromozoma ait yapılardır. Hücreler bölündükçe telomerler kısalır; böylece hücreler ölüme doğru gider. Ancak kanser hücrelerinin önemli bir özelliği artan telomeraz aktivitesi ile telomerlerin kısalan parçalarını tamamlamasıdır. Bu durumun sonucu olarak hücreler sınırsız bölünme özelliği kazanır [16].

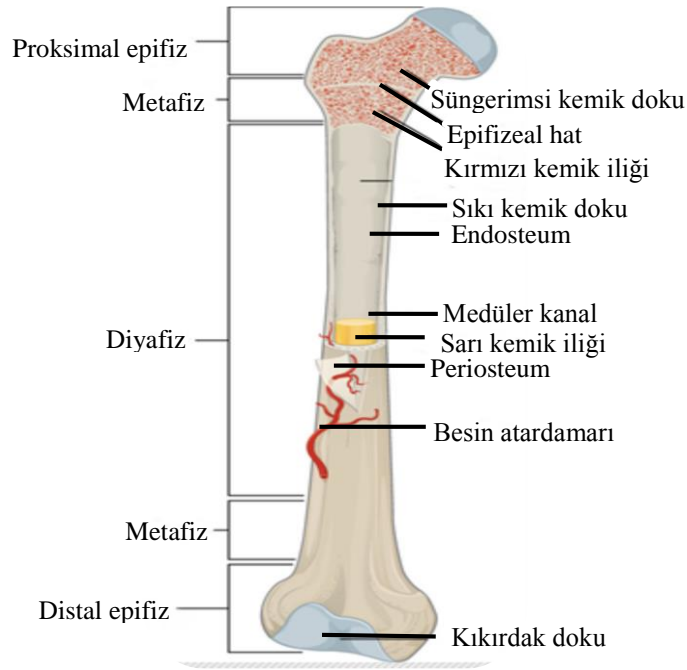
Apoptoz ise programlanmış hücre ölümü olup, normal vücut hücrelerinin fizyolojik işleyişini korur ve hücre sayısını kontrol eder. Apoptoz sürecini kontrol eden genlerde meydana gelen herhangi bir aksama tümör oluşumuna ve gelişimine neden olmaktadır [17, 18]. Tüm bu bilgilere ek olarak yapılan bir çalışmada, hücrenin yaşlandıkça DNA molekülünde meydana gelen hasarların arttığı görülmüştür. Bu hasarlar ya bazı proteinler yardımıyla DNA üzerinde giderilmekte ya da bazılarının aktifleşmesi ile hücrenin kendi kendini yok etmesi sağlanmaktadır [19].

2.2. Osteosarkom

Sarkomalar; iskelet, kas ve bağ dokularında görülen bir çeşit malin tümördür. Bu tümör tipi çocukluk ve ergenlik çağında sık görülmeyle beraber özellikle kol ve bacaklarda yayılmaktadır. İskelet sisteminde tümör kitlesinin kapladığı hacim temel alındığında; bağ dokuda fibrosarkom, kıkırdak dokuda kondrosarkom ve kemik dokuda osteosarkom olmak üzere üç tür birincil kemik tümöründen söz edilir [20]. En yaygın görülen malin kemik kanser tipi %35’lik oranla osteosarkomdur. İkinci sık karşılaşılan malin kemik kanser türü yetişkinlerde %30 oranında

kondrosarkom, çocuklarda ise Ewing's sarkomdur. Osteosarkom tüm çocukluk çağı kanserlerinin yaklaşık %3.4'lük kısmı ile bu dönemdeki primer malin kemik tümörlerinin %56'sını oluşturmaktadır [21].

Kemik; hayati organları koruyan, hareketi sağlayan, mineral depolayan özelleşmiş bir dokudur. İnsan vücudunda uzun, kısa, yassı ve düzensiz kemikler olmak üzere 230'dan fazla kemik çeşidi bulunmaktadır. Osteosarkom hastalığının primer olarak başladığı kemikler köprücük, kol, uyluk, kaval kemikleri ve uzun kemiklerdir. Uzun kemiklerin başlıca bölümlerini içi oyuk diyafiz kısmı, koni biçimli metafiz kısmı ve epifiz kısmı oluşturmaktadır. Diyafiz kortikal kemik dokusundan oluşurken, metafiz ile epifiz kanselöz kemik dokusundan oluşmaktadır. Çocuk kemiklerinde metafiz ve epifiz arasında büyüme plakaları yer almaktadır [22]. Yetişkin uzun kemiğin yapısı Şekil 2.2' de gösterilmiştir.



Şekil 2.2. Yetişkin uzun kemiklerin yapısı ve bölümleri.

Kemik, görevlerini yerine getirmeyi sürdürebilmek hedefi ile hasar gören kısmını tamir eden dinamik bir dokudur. Transkripsiyon faktörleri ve reseptör proteinlerinin desteği ile kemik hücrelerini oluşturan osteoblast hücreleri ve bu hücrelerin yıkımından sorumlu osteoklast hücreleri sistematik bir biçimde çalışarak kemik dokusunu oluşturmaktadır. Osteoblast hücreleri düzenleyici transkripsiyon faktörlerin yönlendirmesi yardımı ile mezenkimal kök

hücrelerden gelişir, farklılaşır ve olgunlaşırlar. Olgunlaşan osteoblast hücreleri mineralleşmemiş kemik matrisi osteoite farklılaşır [23].

Osteosarkom, tümöral osteoid veya olgunlaşmamış kemik hücrelerinin kemik yüzeyinden kontrolsüz çoğalması ile gelişim gösteren primer malin tümördür. Dünya Sağlık Örgütü'nün (WHO) yaptığı tümör sınıflaması osteosarkomu, histolojik olarak küçük hücreli, geleneksel, periostal, paraossal, düşük malinli ve yüksek malinli osteosarkom olmak üzere çeşitli alt gruplara ayırmaktadır. Bu alt sınıflar farklı moleküler ve biyolojik özellikler göstermektedir.

Osteosarkom tüm kemik türlerinde görülmekle beraber; çocukluk ve ergenlik dönemindeki bireylerde başlıca femur ve tibia gibi uzun kemiklerin iki ucunda bulunan ve hücre büyümesinin gerçekleştiği kemiğin metafiz bölgesinde görülmektedir. Kemik büyümesi ergenlik döneminde artış gösterdiğinden dolayı bu çağdaki bireylerde hastalığın görülme sıklığı yetişkinlere göre daha fazladır. Kemik büyümesi etkisinden dolayı çocuk ve ergen bireylerde sıklıkla uzun kemiklerde, yetişkinlerde ise aksiyal kemiklerde bu hastalığa rastlanmaktadır [20].

Osteosarkom tümörlerinin oluşma nedeni kesin olarak bilinmemekle birlikte genetik düzensizlikler, çevresel ve epidemiyolojik faktörler osteosarkomun etiyolojisi olarak tanımlanabilir. İyonlaştırıcı radyasyon, alkilleyici ajan gibi çevresel faktörlerin yanı sıra kemik dokusundaki genişleme ve zayıflama ile kendini belli eden Paget hastalığı, Li-Fraumeni sendromu gibi hastalıklar genetik risk faktörleri olarak sıralanabilir [24].

2.2.1. Klinik tedavi yöntemleri

Osteosarkom mikro metastazik bir hastalık olduğundan herhangi bir aşamada, genellikle akciğer, kemik ve yumuşak dokulara yayılmaktadır. Geniş bir bölgeye yayılan osteosarkom merkezi sinir sistemini de etkilemektedir. Gelişen akciğer metastazı sonucu oluşan solunum yetmezliği hastayı ölüme götürmektedir. Uygulanacak tedavi yöntemleri metastazın engellenmesi ve uzun süreli iyileşme hedeflenerek seçilmektedir.

Primer osteosarkom, bölgesel ağrı ve şişme semptomları ile teşhis edilmektedir. Metastazı engellemek ve uzun süreli iyileşme sağlayabilmek için cerrahi operasyon ve kemoterapi gibi birçok farklı tedavi yöntemi bir arada kullanılmaktadır. Sadece cerrahi operasyon uygulanan hastaların %20'lik bölümü kurtulurken; çoklu kemoterapi desteği ile bu oran üçte ikiye yükselmiştir [20].

Osteosarkom hastalığının başarılı tedavisi cerrahi operasyon ile lezyonlu bölgenin çıkarılması, ameliyat öncesi ve sonrasında yapılan kimyasal tedavi ve ışın tedavilerinin sistematik biçimde

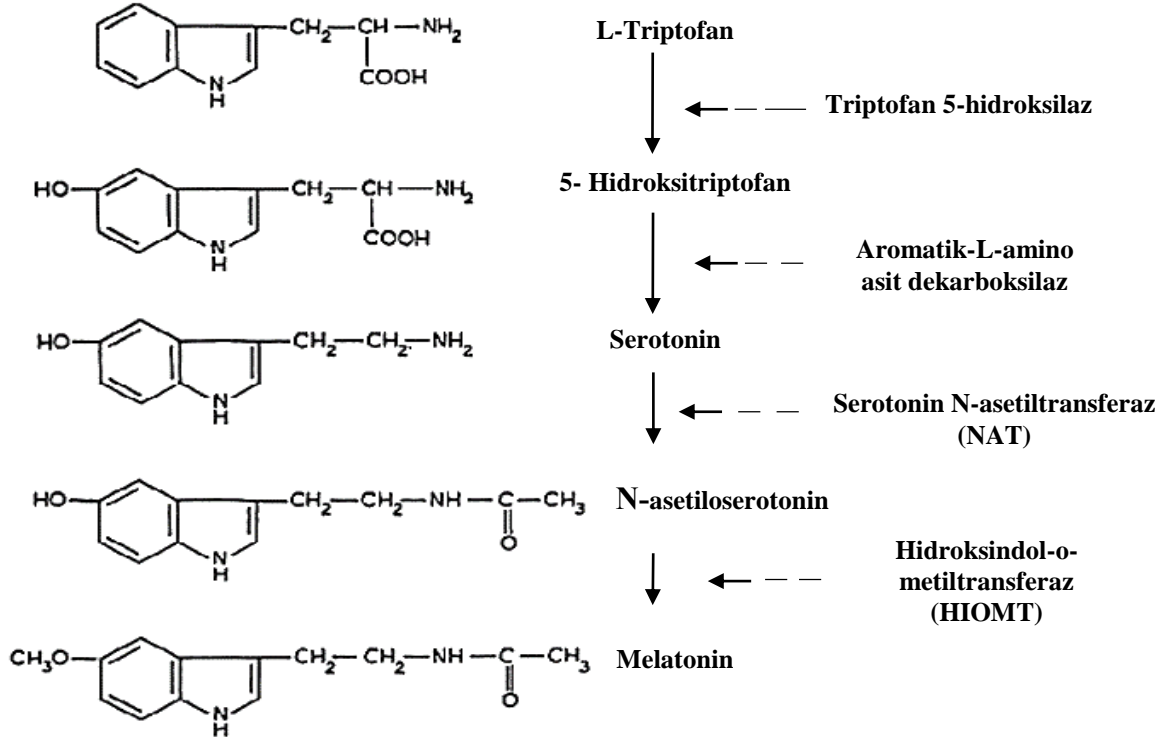
bir arada uygulamaları ile mümkün olabilir. Geri kalan tümör hücreleri kimyasal tedavi ile yok edilmekte ve metastazı engellenmeye çalışılmaktadır [3].

Cerrahi işlem öncesi uygulanan kemoterapinin amacı tümör dokusunun yıkımı ve olası mikro metastazik hücrelerin yok edilmesidir. Tümörün tipi, yeri ve kapsamına bağlı olarak yapılan cerrahi operasyonun amacı, yeterli miktar lezyonun tek parça halinde çıkarılmasıdır. Operasyon sonrası uygulanan kemoterapide ise iyileştirme hedeflenmektedir. Cerrahi müdahale ve kemoterapi ile hastaların %60-70'lik kısmının yaşam sürelerinin uzun dönemde arttırılabildiği kanıtlanmıştır [25].

Kullanılan kemoterapi ajanları uzun süreli kalp ve akciğer problemlerine, duyma kayıplarına, büyüme ve gelişmede azalmaya ve ikincil kanser gelişimine neden olmaktadır [26]. Kemoterapi sonrası karşılaşılan sorunları ortadan kaldırmak ve metastaz görülen vakaları iyileştirebilmek amacıyla kemoterapi ile birlikte kök hücre nakli ve tümör hedefli ilaç taşınım sistemlerinin kullanımı araştırılmaktadır. Farklı bilimsel alanlardaki gelişmeler doğrultusunda, kemoterapi ve radyoterapi gibi geleneksel yöntemlerin yanı sıra moleküler ve hücrenel olarak alternatif tedavi yöntemleri de geliştirilmektedir [25].

2.3. Melatonin

Melatonin (N-asetil-5-metoksi-triptamin) tüm canlılarda bulunan ve memelilerde beyin epifiz bezi (pineal gland) bölgesinden salgılanan bir hormondur [27-30]. Bu hormon isim babası da olan Lerner tarafından sığır beyinin epifiz bezi bölgesinden izole edilmiştir [30]. Sentez mekanizmasına göre triptofan hormonu bir dizi biyokimyasal reaksiyon geçirerek melatonine dönüşmektedir. Şekil 2.3'te görüldüğü gibi; triptofan pineal hücre içerisinde triptofan-5-hidroksilaz ve dekarboksilaz ile serotonine; ardından N-asetiltransferaz ve hidroksindol-O-metiltransferaz enzimleri ile melatonine çevrilir [31]. Memelilerde bu hormon epifiz bezi dışında, retinada, sindirim borusunda bulunan özelleşmiş hücrelerde, kemik iliği hücrelerinde, yumurtalıkta ve deride üretilmektedir [32].



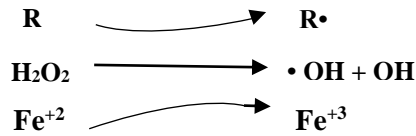
Şekil 2.3. Epifiz bezinde melatoninin metabolik yolağı [31].

İçerdiği indol halkası, metoksi grubu, asetil grupları ve uzun karbon zincirleri nedenleri ile melatonin lipofilik bir moleküldür ve sudaki çözünürlüğü düşüktür [33-35]. Molekül ağırlığı 232.3 g/mol ve erime noktası 116-120°C aralığındadır [36]. Kan serumundaki yarılanma ömrünün gün içerisinde 15 ile 60 dakika arasında değiştiği çeşitli çalışmalarda hesaplanmıştır [37].

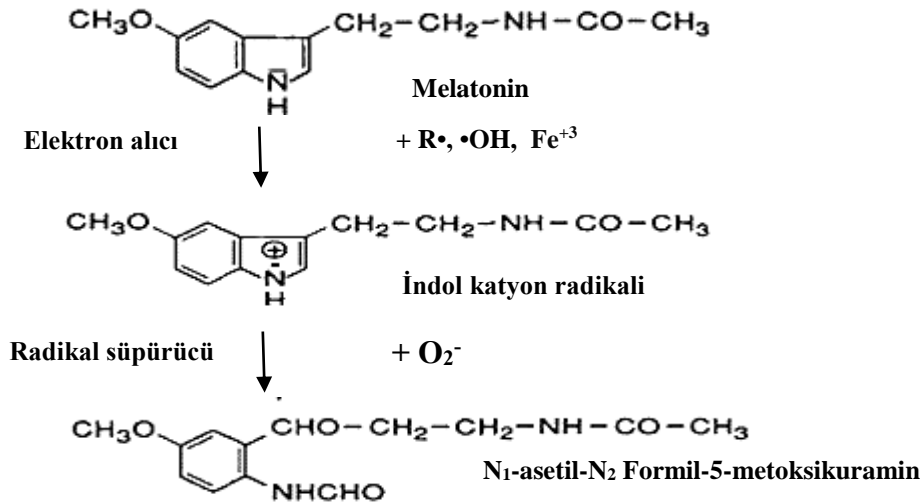
Melatonin ışığa duyarlı bir hormondur ve karanlıkta retina vasıtası ile salgılanmaya başlamaktadır. Kanda gece saat 2’de en yüksek konsantrasyonuna ulaşmaktadır, ilerleyen saatlerde de kandaki seviyesi gittikçe azalmaktadır [38]. Gün içerisinde yaşa bağlı olarak değişmeksizin ortalama melatonin üretimi 20 pg/mL, gece boyunca ise kandaki miktarı yaklaşık 200 pg/mL olarak belirlenmiştir [39]. Bu durum melatonine vücudun günlük ritmini, bir başka deyişle biyolojik saatini düzenleyici işlev kazandırmaktadır. Melatoninin uykuya dalma hızına etki ettiği kadar uyuma süresi ve kalitesine olan etkisini de gösteren çalışmalar yapılmıştır [40-43]. Ayrıca, melatoninin kemik oluşumu, vücut sıcaklığının kontrolü ve çeşitli hormonların salgılanmasını düzenlediğini ispatlayan çalışmalar mevcuttur [32, 44]. Melatonin, bağışıklık sistemini düzenleyici moleküllerin gen ifadelerini düzenler, ayrıca bağışıklık sistemi hücrelerinde etkili bir apoptoz inhibitörüdür [45]. Hayvan ve insanlar üzerinde yapılan çalışmalarda bu hormonun tümör hücrelerinin çoğalmasını, büyümesini ve metastazını engellendiği görülmüştür [5, 6, 46-48].

Melatonin reaktif oksijen ve azot serbest radikallerini indirgeyen doğal bir antioksidandır [49]. Yapısındaki indol halkası, hidroksil radikallerini ($\bullet\text{OH}$) bağlayarak bu hormona etkin bir radikal uzaklaştırıcı özellik kazandırmaktadır [50]. İndirgediği kanıtlanmış serbest radikallerden bazıları hidrojen peroksit (H_2O_2), azot oksit ($\text{NO}\bullet$), peroksinitrik asit ($\text{ONOO}\bullet$) ve peroksit radikal ($\text{LOO}\bullet$) şeklinde sıralanabilir. Hücre içerisinde bulunan temel antioksidanlar; enzimleri uyarma, bu enzimlerin etkinliğini artırma ve enzimleri oksidatif saldırılardan koruma gibi işlevlere sahiptir [51, 52]. Farmakolojik konsantrasyonlarda ise makromolekülleri, özellikle de DNA molekülünü, perdeleyerek insanı dejeneratif hastalıklardan koruduğu gösterilmiştir. Ayrıca hücre içinde mitokondride meydana gelen oksidatif fosforilasyon etkinliğini artırarak, serbest elektron sızıntısını engellemekte; böylelikle serbest radikal oluşumunun azaltılmasına yardımcı olmaktadır [53]. Reaktif oksijen ile etkileşen bu molekül, elektronunu radikal gruba vererek indol amin katyonuna yükseltgenir. Şekil 2.4'te melatoninin süper oksit anyon radikali varlığında N-asetil-N-formil-5-metoksiknuramin metabolitine dönüşüm basamakları görülmektedir [54]. Bu basamaklar çok kısa sürede gerçekleşmektedir.

A. Elektrofilik ara bileşenlerin üretimi:



B. Elektrofilik ara ürünlerin melatonin indolamin tarafından detoksifikasyonu:



Şekil 2.4. Melatoninin serbest radikalleri uzaklaştırma mekanizması [54].

Belirli koşullarda melatoninin antioksidan özelliği ile hücre içinde etkinlik gösteren diğer antioksidan moleküllerini karşılaştıran çeşitli çalışmalar yapılmıştır. Melatoninin özellikle

vitamin E ve C den daha güçlü ve koruyucu olduğu; ayrıca belirli koşullar ve ortamlarda serbest radikaller üzerinde diğer antioksidan moleküllerinden daha etkili olduğu görülmüştür [32].

Melatoninin bu farklı işlevlerini hücrelerde gerçekleştirebilmesi için hücre zarı, sitoplazması ve çekirdeğinde yer alan üç farklı ana reseptör tipi ve bunların alt tipleri tanımlanmıştır [55, 56]. Bu reseptörler; hücre zarında yer alan yüksek afiniteli MT1 ve düşük afiniteli MT2 reseptörleri, sitoplazmada kalsiyum bağlayıcı haberci protein olan kalmodulin reseptörleri ve çekirdekte ise retinoid bağımlı, az kullanılan hormon reseptörü olan RZR ve ROZ olarak sıralanabilir [57-59]. Melatonin, MT1 ve MT2 reseptörleri aracılığı ile sirkadiyen ritmine katkı sağlama, bağışıklık sistemini ve kalp dolaşım sistemlerini ayarlama gibi fizyolojik cevapları üretmenin yanında kanserden koruma, kemik fizyolojisi ve nörodejenaratif rahatsızlıklar üzerinde etkin bir rol almaktadır [58, 60, 61].

Özetlemek gerekirse; melatoninin başlıca fizyolojik görevleri; canlıların biyolojik saatini düzenlemek, bağışıklık sistemini kuvvetlendirmek, antioksidan etki göstererek hücreleri yaşlanmaktan korumak, kemik rejenarasyonunu arttırmak, vücut ısısını düzenlemek ve doğrudan antikanserojen etki göstermektir [62].

2.3.1. Melatoninin kanser üzerindeki etkileri ve etki etme yolları

Birçok dokuda çeşitli fizyolojik görevlere ve reseptörlere sahip melatoninin doğrudan ve dolaylı olarak antikanser etkilerinin olduğu bilinmektedir. Bu hormonun etkinliği hücre kültür ortamına, karsinojenik moleküllere ve doku tipine göre değişim gösterir. Lösemi, melanoma, nöroblastoma, göğüs, yumurtalık, prostat, kolon ve karaciğer tümörleri üzerinde çalışmalar yapılmış; uygulanan deney koşullarına, dozaj miktarına ve uygulandığı süreye göre etkinliği değişmekle birlikte melatoninin bu kanser hücreleri üzerinde tümör proliferasyonunu durdurduğu kanıtlanmıştır [6, 63, 64].

Melatoninin doğrudan etki eden antikanser özelliğinin yanında kronobiyolojik düzenleyici, antioksidan ve immün destekleyici özellikleri de dolaylı olarak kansere etki etmektedir [48]. Melatoninin, insan meme tümör hücreleri mitokondrilerinin zar geçirgenliğini ve bütünlüğünü değiştirerek bu hücreler üzerinde öldürücü etki gösterdiği düşünülmektedir [65]. Ayrıca, hücre içi apoptotik yolağı aktifleştirerek lösemi ve katı tümörleri öldürdüğünü gösteren çalışma da mevcuttur [66]. Birçok çalışmada melatonin konsantrasyonuna, ortam koşullarına ve tümör tipine bağlı olarak p21/WAF1 ve p53 denilen tümör baskılayıcı genlerin etkinliğini artırarak hücre döngüsünü çeşitli fazlarda durdurduğu gösterilmiştir [4, 67-69]. Melatoninin tümör hücrelerinin büyüme faktörlerinden biri olan linoleik asitin tümör hücrelerine girişini sağlayan reseptörleri azalttığı bilinmektedir. Tüm bunlara ek olarak tümör baskılayıcı genlerde görülen

bozulmaları da gidermektedir. Hücre zarı, sitoplazması ve çekirdeğinde yer alan melatonin reseptörleri yardımı ile hücre içi ve dışında gerek antiproliferasyon, gerek antioksidan etkileri ile hücreler kanser oluşumundan korunmaktadır. Melatoninin, serbest radikalleri indirgeyen antioksidatif özelliği yardımı ile kanserleşme eğilimindeki DNA hasarlarını önlediği ve böylelikle dolaylı olarak olası kanser oluşumu engellediği bilinmektedir [70]. Bu hormonun insan bağışıklık sistemi hücrelerinden olan monosit ve akyuvar hücrelerinin üretimini düzenlemesinin yanında interferon-gama ve interlökin adı verilen sitokinlerin artışı sağlayarak immün sistemi güçlendirdiği ortaya konulmuştur [71]. Yapılan çalışmalarda melatoninin tümör hücresinin telomeraz aktivitesini azalttığı sonucuna varılmıştır. Ayrıca melatoninin kemoterapide kullanılan ilaçların etkinliğini arttırdığı görülmüştür. Kanser tedavi yöntemlerinden olan radyoterapi ve kemoterapi esnasında destekleyici olarak kullanılan melatoninin hastaların ağrılarını dindirdiği, yan etkilerin görülme sıklığını azalttığı ve hastaların yaşam sürelerini uzattığı yönünde sonuçlar mevcuttur.

2.4. Hidrofobik Ajanların Sudaki Çözünürlüklerini Arttırma Yöntemleri

Lipofilik ve suda az çözünür yapıdaki melatoninin yüksek konsantrasyonları tümör hücrelerinin çoğalmasını engellemektedir. Vücut içerisinde farmakolojik olarak bu etkiyi sağlayabilmek için melatoninin sudaki çözünürlüğünün artırılması gerekmektedir. Hedef organda bir anda salım yapabilecek bir sistemde, çalışılan malzemenin de biyouyumluluğu oldukça önemlidir. Verilen bu bilgiler ışığında hidrofobik ilaçların sudaki çözünürlüğünü arttırma teknikleri dikkate alınmıştır. Bu teknikler; parçacık boyutlarını değiştirme, katı dağılımı, kriyojenik teknikler, nanosüspansiyon ve siklodekstrinlerle inklüzyon kompleksi oluşturma olarak sıralanabilir [72].

2.4.1. Parçacık boyutunu küçültme

Küçültülen madde boyutu hidrofobik maddenin yüzey alanının arttırılmasına neden olmaktadır. Artan yüzey alanı sayesinde hidrofobik madde çözücüsüyle daha fazla etkileşime girmekte ve çözünürlüğü artmaktadır. Ezme ve öğütme gibi geleneksel yöntemler hidrofobik yapıyı belirli boyutlara indirebilmekte, mikronize etme, sprey kurutma gibi ileri yöntemler ise bu yapıları daha da küçük boyutlara getirmektedir. Bu yöntemin dezavantajı ilacın doygun çözünürlüğüne herhangi bir etkisinin olmamasıdır [73].

2.4.2. Katı dağılımı

Bu yöntem, hidrofobik maddenin suda iyi çözünür bir taşıyıcı içerisinde dağıtılmasının; ardından soğutma ve vakumda kurutma yöntemleri ile katı hale getirilmesi tekniğidir [74]. Fizikokimyasal özelliklerin tekrarlanabilirlik problemi, ilaç ve taşıyıcının fiziksel ve kimyasal kararsızlıkları bu teknikte görülen başlıca dezavantajlardır [75].

2.4.3. Nanosüspansiyon

Bu teknik, nanometre boyutlarındaki ilaç partiküllerinin mikron mertebedeki çözücüde koloidal olarak dağıtılmasına dayanmaktadır [76]. Çöktürme, yüksek kayma gerilimi yardımıyla öğütme, emülsiyon ve yüksek basınçta homojenleştirme yöntemleri nanosüspansiyon çeşitleridir. Yöntem, hidrofobik molekülün çözünürlüğünü ve çözünme hızını arttırmakla birlikte yavaş ilaç salımına olanak vermektedir [77].

2.4.4. Kriyojenik teknikler

Bu yöntemde nano boyutta, yüksek gözenekli, amorf haldeki ilaç partikülleri üretilerek ilaç çözünürlüğü düşük sıcaklıkta artırılmaktadır. Yüksek ıslatılabilirlik ve yüzey alanı bu yöntemin avantajlarıdır [78].

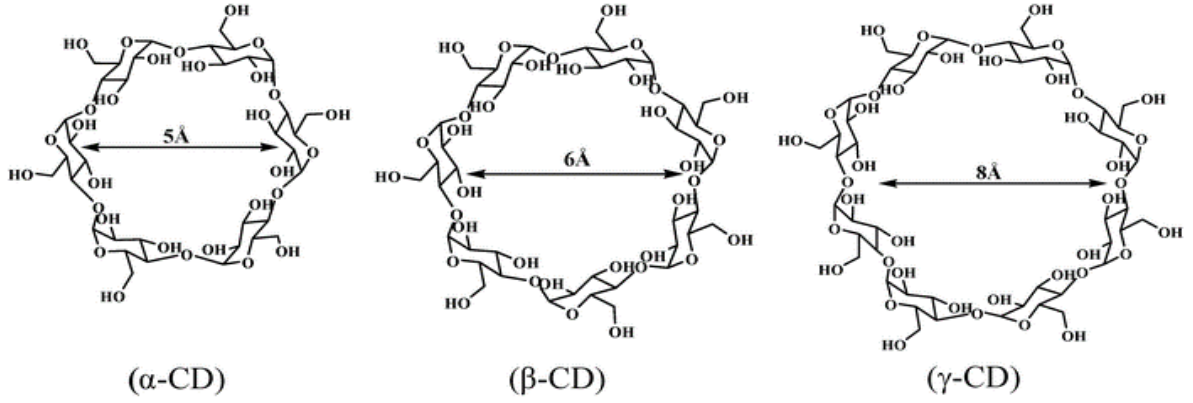
Bu yöntemlerle karşılaştırıldığında, suda az çözünür ilaçların suda çözünürlüğünü, çözünme hızını, kararlılığını ve biyoyumumluluğunu daha kesin bir biçimde arttırdığı kanıtlanan siklodekstrinlerle inklüzyon kompleksi oluşturma tekniği, ilerleyen bölümde detaylı bir şekilde açıklanmıştır [78].

2.5. Siklodekstrinler

Sikloamiloz, siklomaltoz, sikloglukan ve Scharinger dekstrinleri olarak da bilinen siklodekstrinler, birbirlerine α -(1,4) bağı ile bağlanmış ve yapısal gerilimlerden ötürü en az 6 D(+) glikopiranoz birimlerinden oluşan halkalı oligosakkaritlerdir [79, 80]. Doğal siklodekstrinler nişastanın *Bacillus macerans*, *Klebsiella oxytoca*, *Bacillus circulans* ve *Alkalophylic bacillus* gibi çeşitli basil bakteri türleri tarafından siklo glikoziltransferaz (SGTaz) enzimi ile parçalanması sonucu oluşmaktadır [79]. Sırasıyla 6, 7 ve 8 glikopiranoz birimi içeren α -, β - ve γ - siklodekstrin olmak üzere üç temel siklodekstrin çeşidi vardır. Bu temel siklodekstrinlerin kimyasal yapıları Şekil 2.5'te gösterilmektedir. Glikopiranoz birimleri arasındaki bağların serbest dönme hareketi eksikliğinden dolayı, siklodekstrinler toroidal şekildedir [80]. Halkanın iç kısmında yer alan glikosidik oksijen ve metil protonları bu bölgenin apolar; halka dış kısmında ikamet eden hidroksil grupları ise ilgili bölgenin polar bir yapıda olmasına neden olmaktadır. Dolayısıyla siklodekstrinlerin sahip olduğu bu polarite farkı halkanın iç kısmına hidrofobik, dış kısmına ise hidrofilik özellik kazandırır [81, 82].

Temel siklodekstrinlerin suda az çözünür olmaları bu yapıların kullanımındaki en önemli dezavantajdır. Hidroksil grupları arasında oluşan hidrojen bağları ile ilgili olan bu durum, ilgili grupların yüksek çözünürlükte gruplarla yer değiştirme reaksiyonu ile lehe çevrilir. En çok tercih edilen gruplar karboksimetil, hidroksipropil (nötr) ve sülfobütil (negatif yüklü)

gruplarıdır. Uygulama amacına göre temel siklodekstrinlerin fonksiyonel grupları modifiye edilerek yüklü, pH ve metal iyon kontrolü olan siklodekstrinlere dönüştürülmektedir [83].



Şekil 2.5. α -, β - ve γ - siklodekstrinlerin kimyasal yapılarının karşılaştırılması [84].

Çizelge 2.1. Temel ve modifiye edilmiş siklodekstrinler ve karakteristik özellikleri [85, 86].

Siklodekstrin	Molar yer değiştirme derecesi	Molekül ağırlığı (Da)	Sıçanlarda oral biyoyoumluluk (%)	Oda sıcaklığında su çözünürlüğü (mg/mL)	Fonksiyonel grup	Toptan fiyatı (Amerikan Doları /kg)
α -Siklodekstrin (α -CD)	-	972	1	145	-	45
β -Siklodekstrin (β -CD)	-	1135	0.6	18.5	-H	5
2-Hidroksipropil- β -siklodekstrin (HP β CD)	0.65	1400	3	>600	CH ₂ CHOHCH ₃	300
Sülfobütileter- β -siklodekstrin (SBECD)	0.9	2163	1.6	>500	-((CH ₂) ₄ SO ₃) ⁻	-
Metillenmiş- β -siklodekstrin (Me β CD)	1.8	1312	<12	>500	-CH ₃	350
γ -Siklodekstrin (γ -CD)	-	1297	0.02	232	-H	80
2-Hidroksipropil- γ -siklodekstrin (HP γ CD)	0.6	1576	<0.1	>500	-	400

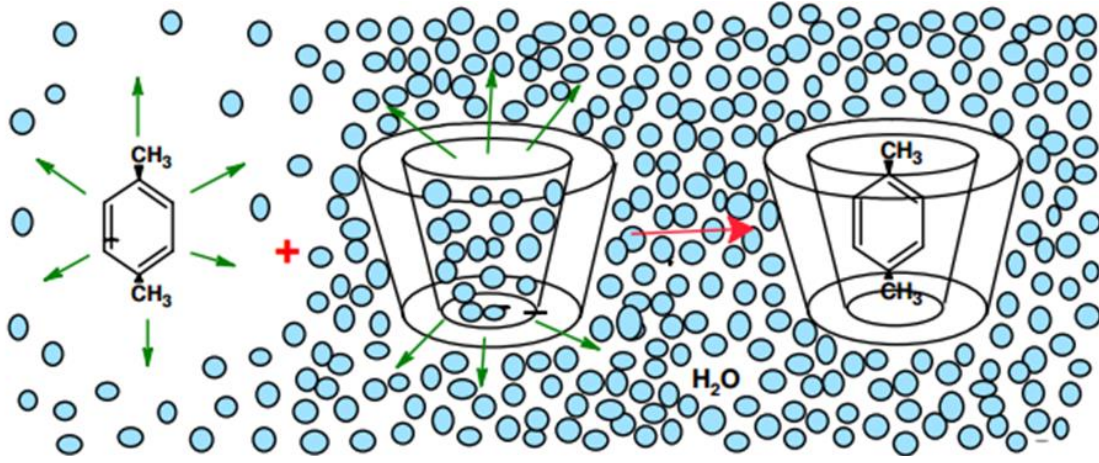
Çeşitli siklodekstrinlerin fizikokimyasal özellikleri ile fonksiyonel grupları Çizelge 2.1’de karşılaştırılmıştır. Çizelge, temel ve türevlenmiş siklodekstrinlerin fizikokimyasal özelliklerinin birbirlerinden oldukça farklı olduğunu göstermektedir. Glikopiranoz birim sayısı arttıkça molekül ağırlığı artmaktadır. Siklodekstrinlerin boşluk yüksekliği aynı olduğu için

molekül ağırlığındaki bu artış merkez boşluğunda genişlemeye neden olmaktadır. Boşluk çapında görülen artış misafir molekül ile siklodekstrin boşluğunun daha iyi etkileşimine olanak sağlayacağından siklodekstrinin inklüzyon kompleksi oluşturma kapasitesini arttırmaktadır. Glikopiranoz birim başına düşen yer değiştirme derecesi, reaksiyonun gerçekleştiği glikoz birimine ve misafir moleküle bağlı olarak siklodekstrinlerin kararlılığına ciddi bir şekilde etki etmektedir [87]. Sıçanlar üzerinde yapılan çalışmalara göre en iyi biyouyumluluk metillenmiş ve hidroksoipillenmiş siklodekstrinlerde görülmektedir. İnsanlar üzerinde yapılan toksikolojik çalışmalarda HP β CD molekülünün günlük 16 grama kadar alınabildiği; ağız ve damar yoluyla toksik etki olmaksızın kullanılabilirdiği görülmüştür [88]. Aynı zamanda sudaki çözünürlük göz önüne alındığında HP β CD molekülünün temel ve türetilmiş siklodekstrinler arasında suda en yüksek çözünürlüğe sahip olduğu görülmektedir. HP β CD molekülü diğer türevlenmiş siklodekstrinlere göre daha ucuzdur. Genelde primer veya sekonder hidroksil gruplarının 2-hidroksipropil grubuyla yer değiştirilmesi ile HP β CD elde edilir [88].

2.6. İnküzyon Kompleksleri

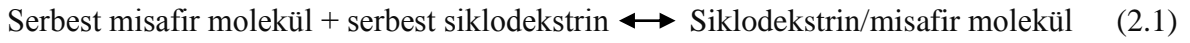
Hidrofobik boşluğa sahip olan siklodekstrin (ev sahibi) molekülü içerisine başka bir molekülün (misafir) kısmen ya da tamamen girmesi ile “inküzyon kompleksi” denilen yapılar oluşmaktadır. Ev sahibi ve misafir molekülü arasında Van der Waals ve hidrofobik etkileşimler gibi fiziksel kuvvetler kararlı kompleks oluşumundan sorumludur [89]. Kompleks oluşum mekanizması, öncelikle polar çözücünün, içerisine girdiği apolar mikro çevreye sahip siklodekstrin boşluğundan çıkmasıyla başlar. Hidrofobik etkileşimlerin artması nedeni ile hidrofobik misafir molekül siklodekstrin halkasının içerisine girer. Misafir molekül ile siklodekstrin boşluğunun boyut olarak birbirine uygunluğu ve misafir molekülün siklodekstrin içine girmesini sağlayacak sürücü güç tipi kompleks oluşumunda önemli faktörler olarak sıralanabilir [90]. Misafir ile siklodekstrin moleküllerinin birbirine göre bağıl boyutu; oluşturacakları kompleksin stokiyometrik oranlarının yanında, misafirin siklodekstrin boşluğuna giriş yönünü de belirlemektedir. Bir siklodekstrin molekülüne bir ya da iki misafir molekülün girmesi ile sırasıyla 1:1 ve 1:2 inklüzyon kompleksi oluşabilir. İnküzyon kompleks türleri ve misafir molekülün bağıl boyutunun inklüzyon kompleksi oluşumuna etkisi Şekil 2.6 ve 2.7’de gösterilmiştir [89]. Konu termodinamiksel açıdan şöyle yorumlanabilir: sulu siklodekstrin çözeltisinde, siklodekstrin boşluğu ve bu boşluk içerisindeki su molekülleri arasında apolar-polar etkileşim görülmektedir. Bu etkileşim ortamın entalpisini yükseltmektedir. Ortama apolar bir molekül eklendiğinde ise su molekülleri ortamdaki ayrılır ve misafir moleküller siklodekstrin boşluğu ile apolar-apolar etkileşime girer. Böylelikle

siklodekstrin boşluğu daha düşük enerjili ve kararlı hale gelmektedir [91]. Misafir molekülün siklodekstrin molekülü ile inklüzyon kompleksi oluşturma mekanizması Şekil 2.6'da sunulmuştur.

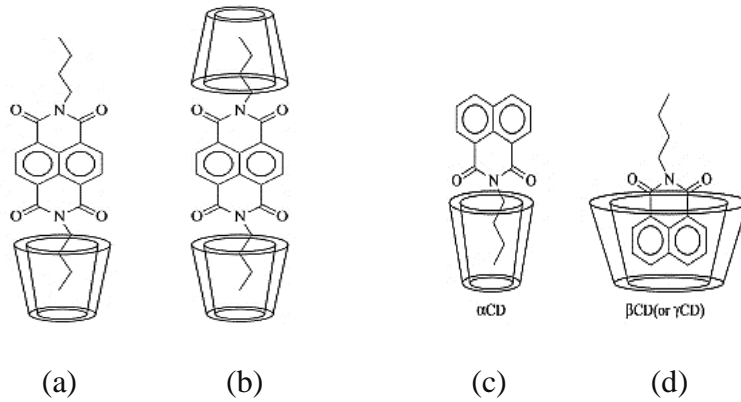


Şekil 2.6. Siklodekstrin molekülünün inklüzyon kompleksi oluşumunun şematik gösterimi. Misafir molekül p-kilendir, küçük daireler su molekülünü temsil etmektedir [79].

Serbest haldeki siklodekstrin ve misafir molekül arasında termodinamik bir denge (Eşitlik 2.1) söz konusudur [92].



İnküzyon kompleksi oluşumu ve ayrımı arasında oluşan denge sabitine (K) bakılarak oluşan inklüzyon kompleksinin kararlılığı hakkında bilgi edinilebilmektedir [80, 93, 94].



Şekil 2.7. İnküzyon kompleks tipi (a) (1:1) ve (b) (1:2); (c, d) bağıl boyutların kompleks oluşumuna etkisi [93].

Siklodekstrin ve misafir molekülün inklüzyon kompleksi oluşturması amacıyla kullanılan çözücü ortamının, sıcaklığın ve çözelti dinamiklerinin de kompleks oluşumundaki etkisi göz ardı edilemez. Misafir molekülün çözünür halde olması, kompleks oluşacak ortamın belli

sıcaklığa kadar ısıtılması, kullanılan çözücünün misafir ve siklodekstrin çözünürlüğünü arttıracak şekilde seçimi kompleks verimini arttırıcı faktörlerdir. Kompleks oluşturulan ortamın kompleks oluşturma verimine pozitif anlamda etkisi olduğu bilinmektedir. Ayrıca etanol ve dietil eter gibi organik çözücüler misafir molekülün çözünürlüğünü arttırırken aynı zamanda buharlaştırılarak kolayca uzaklaştırılabilmektedirler [94].

2.6.1. İnküzyon komplekslerinin üretim yöntemleri

Temelde ev sahibi ve misafir molekülün etkileşime geçebilmeleri ya da sıcaklık farkının sürücü güç olarak kullanılmasına dayanan öğütme, yoğurma, katı içinde dağılma, birlikte çökeltme, nötürleştirme, liyofilizasyon, sprey ile kurutma, eritme, süper kritik karbondioksit ve mikrodalga uygulaması yöntemleri ile inküzyon kompleksleri üretilmektedir. Üretim yöntemi oluşacak son ürünün kullanım alanına göre seçilmelidir [79, 89, 94].

Öğütme yöntemi: Kompleks bileşenlerinin havan yardımıyla daha küçük boyutlara indirilerek kompleks oluşturulmasıdır. Sürecin yavaş ve kompleks veriminin düşük olması yöntemin dezavantajlarıdır [89, 95].

Yoğurma yöntemi: Siklodekstrine az miktarda su eklenerek bulamaç haline getirilir. Ardından uygun ve az miktarda çözücü kullanılarak misafir molekül siklodekstrin çamuruna ilave edilir. Oluşan bulamaç karıştırıldıktan sonra buharlaştırılır ve katı inküzyon kompleksi elde edilir [96]. Elde edilen yapılar gerçek inküzyon kompleksi olmamaktadırlar [97].

Katı içerisine dağılma yöntemi: Kompleks bileşenlerinin ayrı ayrı etanol ve su çözücülerinde hazırlanması, sonra çözeltilerin dengeye gelene kadar karıştırılması ve son olarak vakumda kurutularak katı inküzyon kompleksi elde edilmesidir. Uzun işlem süreci ve düşük kompleks oluşum verimi karşılaşılan dezavantajlardır.

Birlikte çökeltme yöntemi: Mekanik ve termal sürücü güçlerle kompleks elde etme tekniğidir. Belli bir sıcaklığa kadar ısıtılan ve karıştırılan siklodekstrin çözeltisine yüksek sıcaklığa dayanıklı misafir molekülün eklenmesi, ardından karışma esnasında ilgili çözeltinin soğutulması ile oluşan çökelti halindeki inküzyon kompleksinin santrifüj yardımı ile toplanmasıdır. Bu yöntemin en büyük dezavantajı ise zaman, ısıtma ve soğutma için gereken enerji miktarı ve yüksek maliyet gibi ölçek büyütmede yaşanan sıkıntılardır [98, 99].

Nötürleştirme yöntemleri: Siklodekstrin ve misafir molekülü ayrı bir baz çözeltisinde karıştırılarak pH tespit edilir. Ardından asit eklenerek karıştırılır ve pH 7.4 olduğunda oluşan inküzyon kompleksi çöker. Çökelti izole edilir, kurutulur ve saklanır. Yüksek maliyeti ve alıkonma süresi uzun bir teknik olmasından dolayı endüstriyel kullanımı kısıtlıdır [100].

Liyofilizasyon yöntemi: Misafir molekül ile siklodekstrin bir araya getirilir. Ardından dondurma ve kurutma işlemi sırayla uygulanır. Bu yöntem vasıtası ile elde edilen nihai inklüzyon kompleks amorf yapıdadır. Bu durum hızlı çözünmeye neden olmaktadır [101].

Sprey ile kurutma yöntemi: Inklüzyon kompleksinin uygun çözücü ortamında dengeye gelene kadar karıştırıldıktan sonra çözeltinin püskürtülerek kurutma yöntemi ile kompleks elde edilmesine dayanan bir tekniktir. Bu yöntem misafir ve ev sahibi moleküllerin arasında iyi bir etkileşim sağlarken, düşük kompleks oluşum verimi ve termal stres karşılaşılan kısıtlamalarıdır [102].

Eritme yöntemi: İnce toz haldeki siklodekstrin ile eritilen misafir molekülü karıştırılır ve soğutularak katı kompleksler elde edilir. Yöntem, düşük kompleks oluşturma verimine sahiptir [103].

Süper kritik karbondioksit yöntemi: Siklodekstrin ve misafir molekülü uygun çözücü içinde karıştırıldıktan sonra süper kritik koşullardaki karbondioksit gazı bulunan tanka beslenir. Siklodekstrin karışım çözeltisi kaba püskürtüldüğünde bu iki çözelti birbiri içerisine difüzenir. Oluşan basınç farkı sürücü güç olarak kullanılmaktadır. Çözeltiler arasındaki genleşme farkı nedeniyle aşırı doygun hale gelen kompleks çöker ve çözücü sistemden uzaklaşır. Toksik, yanıcı olmayan ve ısıya dayanıklı olmayan maddelerle çalışmaya elverişli olması başlıca avantajları olarak sıralanabilir. Tüm organik çözücülerle çalışılmaması ve yüksek kurulum maliyeti de yöntemin dezavantajlarıdır [102].

Mikrodalga yöntemi: Uygun çözücüde hazırlanan misafir molekülü ile siklodekstrin çözeltisi kullanılarak mikrodalga yardımı ile inklüzyon kompleksi elde edilir. Genellikle bir ile iki dakika arasında değişen reaksiyon süresi ve 60°C sıcaklıkta çalışılmaktadır. Bu sıcaklık değeri inklüzyon komplekslerinin bozulmaya başladığı sıcaklık olduğundan dolayı çalışılabilecek en yüksek sıcaklık değeridir. Teknik, ortam sıcaklığında oldukça kararlı yapıların oluşmasını sağlayan kısa reaksiyon süresi ve yüksek kompleks verimi ile endüstriyel üretime oldukça elverişlidir [73, 104].

2.6.2. Inklüzyon komplekslerinin karakterizasyon teknikleri

Inklüzyon kompleksinin doğru formunun oluşup oluşmadığı, stokiyometrisinin anlaşılması, kararlılık sabitinin hesaplanması ve yapısının belirlenmesi adına çeşitli çalışmalar yapılmaktadır. Uygulanacak yöntemde oluşturulmuş kompleksin fiziksel hali de göz önünde bulundurulur. Katı inklüzyon kompleksi, taramalı elektron mikroskobu (SEM), taramalı diferansiyel kalorimetre (DSC), termogravimetrik analiz (TGA), Fourier dönüşümlü infrared

spektrofotometri (FTIR), nükleer manyetik rezonans spektrometrisi (NMR) ve X-ışını kırınımı (XRD) gibi enstrümental analiz tekniklerinin yanı sıra; kompleks stokiyometrisinin ve kararlılık sabitinin belirlenmesini sağlayan “Higuchi Connor faz çözünürlük eğrisi” de karakterizasyon çalışmalarını gerçekleştirmek amacı ile kullanılmaktadır.

2.6.2.1. Higuchi-Connor faz çözünürlük çalışması

İnklüzyon kompleksi oluşumunda, misafir ve ev sahibi molekülün arasında kimyasal bir reaksiyondan öte fiziksel bir etkileşim söz konusudur. Bu etkileşim kimyasal bir denge çerçevesinde yürütülmektedir. Dengeye gelmiş kompleks reaksiyonunun kararlılık sabiti ($K_{m:n}$), serbest haldeki misafir ve ev sahibi molekülün kompleks oluşturmaya yönelik reaksiyonun oluşum hız sabiti (k_o) ve kompleksin ayrışma hız sabiti (k_a) ile alakalıdır. Kararlılık sabiti ($K_{m:n}$) misafir molekülün kompleks içerisindeki kararlılığı hakkında bilgi vermektedir.

Bir birim misafir molekülünün, 1 birim siklodekstrin molekülün içerisine kısmen ya da tamamen girmesi ile oluşan inklüzyon kompleksi sitokiyometrik olarak 1:1 olarak adlandırılmaktadır. Bileşenlerin kimyasal yapılarına bağlı olmakla birlikte çoğunlukla 1:1 oranda kompleks elde edilmektedir. Bir siklodekstrin molekülünün iki tarafına misafir molekülün yerleşmesi ile 2:1 ve misafir molekülün iki ucuna ayrı ayrı siklodekstrin girmesi ile görülen 1:2 inklüzyon kompleksleri de mevcuttur. Higuchi ve Connors’ın geliştirdikleri faz çözünürlük diyagramı yardımıyla hem oluşturulan inklüzyon kompleksi tipi hem de kararlılık sabiti değeri tespit edilir [105-107]. Eşitlik 2.2’de ev sahibi ve misafir molekülün arasındaki kimyasal denge reaksiyonu görülmektedir.



Eşitlik 2.2’de “L” misafir molekülü, “CD” siklodekstrini, L_mCD_n oluşturulan inklüzyon kompleksini, m ve n ise sırası ile misafir ve siklodekstrin moleküllerin sitokiyometrisini ifade etmektedir. Eşitlik 2.2’deki kimyasal denge reaksiyonunun denge sabiti Eşitlik 2.3’te gösterildiği gibi hesaplanmaktadır.

$$K_{m:n} = \frac{[L_mCD_n]}{[L]^m[CD]^n} \quad (2.3)$$

Eşitlik 2.4 siklodekstrin olmaksızın misafir molekülün sudaki denge çözünürlüğünü ifade eden “ G_0 ” konsantrasyonunu göstermektedir.

$$[L] = L_0 \quad (2.4)$$

Eşitlik 2.5 ve Eşitlik 2.6 misafir ve siklodekstrin moleküllerinin toplam konsantrasyonlarını ifade etmektedir.

$$[L]_t = L_0 + m[L_mCD_n] \quad (2.5)$$

$$[CD]_t = CD + n[L_mCD_n] \quad (2.6)$$

Eşitlik 2.3'te ifade edilen $[CD]$, $[L_mCD_n]$, ve $[L]$ değerleri sırasıyla Eşitlik 2.7, 2.8 ve 2.9 ile elde edilir.

$$[CD] = CD_t - n[L_mCD_n] \quad (2.7)$$

$$[L_mCD_n] = \frac{[L]_t - [L]_0}{m} \quad (2.8)$$

$$[L] = [L]_t - n[L_mCD_n] \quad (2.9)$$

Siklodekstrine göre birinci dereceden olan ($n=1$) faz çözünürlük sistemi için Eşitlik 2.10 şu şekilde türetilir.

$$L_t = \frac{mKL_0^m [CD]_t}{1 + KL_0^m} + L_0 \quad (2.10)$$

$[CD]_t$ 'ye karşı $[L]_t$ değerleri grafiğe geçirildiğinde, y eksenini kesen düz bir profil elde edilmiştir. Bu grafiğe "faz çözünürlük diyagramı" adı verilir ve bu grafik Şekil 2.8'de gösterilmiştir. Bu grafiğin eğimi Eşitlik 2.11'de verilmiştir.

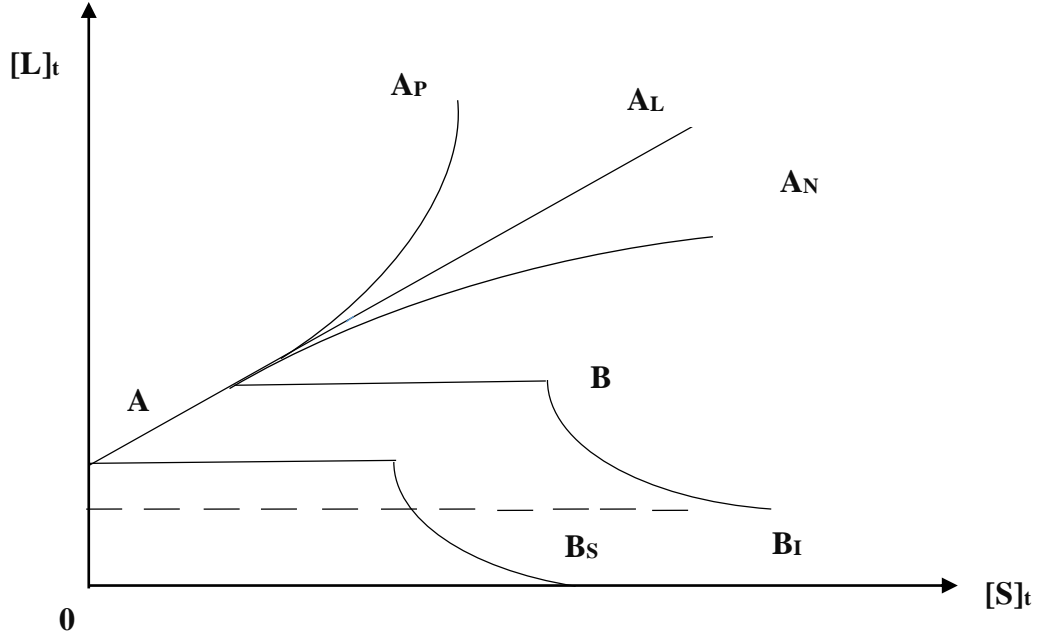
$$\text{Eğim} = \frac{mKL_0^m}{1 + KL_0^m} \quad (2.11)$$

Misafir moleküle göre birinci dereceden olan ($m=1$) sistemler için, kararlılık sabiti $K_{1:1}$ Eşitlik 2.12'den hesaplanabilir.

$$K_{1:1} = \frac{\text{eğim}}{L_0 * (1 - \text{eğim})} \quad (2.12)$$

Sitokiyometrik olarak 1:1 molar oranda oluşturulan inklüzyon komplekslerinin denge kararlılık sabitleri faz çözünürlük diyagramından hesaplanabilir. Bu diyagramda farklı eğri profilleri ortaya çıkmaktadır. Bu profiller çözünebilir ve çözünemez inklüzyon kompleksleri için sırası ile A ve B tipi olmak üzere iki gruba ayrılmaktadır. B tipi eğriler, az çözünür inklüzyon komplekslerini ifade eden B_S ve çözünmez inklüzyon komplekslerini ifade eden B_I denilen alt gruplara ayrılmaktadır. A tipi eğriler ise A_L (siklodekstrin çözünürlüğüne bağlı olarak ilaç çözünürlüğünde görülen doğrusal artış), A_P (izotermden pozitif sapma) ve A_N (izotermden negatif sapma) tipi denilen alt gruplara ayrılmaktadır. Siklodekstrin ve ilaç çözünürlüğünün doğrusal artış gösterdiği A_L tipi eğriler 1:1 inklüzyon kompleksinin varlığını kanıtlamaktadır. A_P tipi eğrilerin gösterdiği inklüzyon kompleksi tipi, ev sahibi molekülüne göre daha yüksek sitokiyometrik oranda misafir molekülle kompleks oluşturmaktadır. A_N tipi grafiğin yorumlanması güçtür; herhangi bir kompleks oluşturup oluşturmadığı kestirilemez. Bu duruma çözücüde görülen dielektrik sabitindeki değişimin neden olabileceği düşünülmektedir. Faz

çözünürlük grafiği eğimi 1'den büyükse A_P , 1'e eşit ve küçükse A_L grafiği elde edilmektedir. A_N grafiği ise kompleksin siklodekstrinin dışında oluştuğunu göstermektedir ve anlamsızdır [105, 108].



Şekil 2.8. Higuchi- Connor faz çözünürlük grafiği [105].

2.6.3. İnküzyon komplekslerinin kullanım alanları

İnküzyon kompleksinin önemi, siklodekstrin tarafından tutuklanan hidrofobik misafir molekülün fizikokimyasal özelliklerini geçici bir süre için de olsa iyileştirmesidir. Bu özellikler başta hidrofobik yapıların suda çözünürlüğünün fark edilir derecede artışı olmakla birlikte, misafir molekülün kararlılığı, ısı yada UV ışından korunma, fiziksel hal değişim kontrolü, istenmeyen tat ve kokuların maskelenmesidir. Bahsedilen bu avantajlar inküzyon komplekslerinin ilaç, yiyecek, kozmetik, çevre, tekstil ve ambalaj gibi sektörlerde sıklıkla kullanılmasını sağlamaktadır [107].

Toprakta bulunan ağır metallerin ve organik kirleticilerin belirlenmesinde kullanılan biyolojik tayin testlerinde bu bileşenlerin duyarlılıklarını arttırmak için siklodekstrinlerle inküzyon kompleksi oluşturulmuştur. Ayrıca bu bileşenlerin çözünürlüğü ve biyoyumluluğu arttırılarak toprağın ıslahı da sağlanmıştır. Atık sulardaki organik kirleticileri gidermek amacıyla geliştirilen polimerik sistem yapısına siklodekstrin katılmıştır. Bu polimerin kirleticileri adsorplama kapasitesinin arttığı görülmüştür [109-111]. İnküzyon kompleksleri kontrollü salım özelliğinden dolayı farmasötik alanda da tercih edilir. Uçucu bileşenlerin siklodekstrinler ile enkapsüle edilerek uzun süreli kullanımı sağlanmaktadır. Etken maddelerle oluşturulan

inklüzyon kompleksleri, bu maddeleri ışığa, oksijene, buharlaşma kayıplarına karşı korumakta, istenmeyen kokuları giderme özelliklerinden faydalanarak kozmetik sektöründe sıklıkla kullanılmasına neden olmaktadır. Gıda sektöründe ise besinleri ısısız ve oksidatif streslere, kötü tat ve kokulara karşı korumak amacıyla çeşitli gıdalarla inklüzyon kompleksi oluşturulur [8, 112, 113]. Misafir molekülün fizikokimyasal özelliklerinin artırılması ve istenmeyen kokuları uzaklaştırma gibi birçok özelliklerinden dolayı çeşitli siklodekstrinlerle oluşturulan inklüzyon kompleksleri ticari ürün olarak piyasada yer almaktadır. Bu ürünlerden bazıları Epicutin-TT, Pickelex, Vivace, Retinol, Dexol A, Nutrients & Anti-aging Agents'dır [114, 115].

2.6.4. İnküzyon komplekslerinin ilaç sektöründe kullanılması

İnküzyon kompleksi, ilacın çözünürlüğünü, kararlılığını, biyouyumluluğunu, geçirgenliğini, hedef organa etki etme süresini ve raf ömrünü arttırmaktadır. İlacın yan etkilerini azaltması ve siklodekstrinlerin toksik etkilerinin olmaması en büyük avantajlarından. Çeşitli ilaç yüklü kompleksin oral, bağırsak dışı, oküler, nasal ve rektal yollar ile vücuda etkisini inceleyen çalışmalar mevcuttur. Oral uygulamada çeşitli ilaçlar ile HP β CD kullanılarak oluşturulan inklüzyon komplekslerinde, ilacın çözünme ve dağılma hızının [116] ve ağız içi biyouyumluluğun [117, 118] arttığı görülmüştür. Bu özellikleri nedeni ile ilaç yardımcı maddeleri olarak kullanılan siklodekstrinler piyasada yaklaşık 30 farklı farmasötik üründe yer almaktadır. Bu ürünlerden bazıları Çizelge 2.2'de gösterilmektedir.

Çeşitli ilaçlar kullanılarak üretilen inklüzyon kompleksleri kontrollü ilaç salım sistemleri olarak incelenmiştir. Hidrofobik siklodekstrinler uzun sürede ilaç salımı yaparken hidrofilik siklodekstrinlerin hızlı bir şekilde bu salımı gerçekleştirdiğini gösteren çalışmalar bulunmaktadır. Böylece ihtiyaca göre ilacın yavaş ya da hızlı salımını yapabilecek sistemler geliştirilmektedir. Başbağ ve arkadaşları tarafından (2014) yapılan çalışmada hidrofobik bir ilaç olan Siklosporin A, HP β CD ve polihidroksietil-metakrilat (poli(HEMA)) kullanılarak çeşitli hidrojel tabanlı taşıyıcı sistemler geliştirilmiştir. Poli(HEMA-co-HP β CD) hidrojel poli(HEMA) yapısına HP β CD'nin çapraz bağlanmasıyla elde edilmiştir. Sonuç olarak, HP β CD içeren taşıyıcı sistemlerin uzun süreli salım yaptığı görülmüştür [119]. Kolon, deri ve beyin hedefli ilaç taşıyıcı sistemleri inklüzyon kompleksleri yardımıyla geliştirilmektedir. Bunun yanında inklüzyon komplekslerinin protein, peptit ve gen taşıyıcı uygulama çalışmaları gelecekte radikal tedavi olarak önemli bir rol oynayacaktır [120].

Çizelge 2.2. Siklodekstrin içeren ticari ilaçlar [85].

Siklodekstrin/ İlaç	Formülasyon	Ticari İsmi	Üretici Firma
α- Siklodekstrin Alprostadil (PGE ₁) Cefotiam hexetil HCL	IV çözeltisi Oral Tablet	Prostavasin Pensporin T	Ono (Japonya) Takeda (Japonya)
β-Siklodekstrin Benexate HCL Dexamethasone Nikotin Nitrogliserin Piroxicam Tiaprofenik asit	Oral tablet Dermal merhem Dilaltı tablet Dilaltı tablet Oral tablet Oral tablet	Ulgut Glymesason Nicorette Nitropen Brexin Surgamyl	Teikoku Kagaku Sangyou (Japonya) Fujinaga (Japonya) Pharmacia (İsveç) Nihon Kayaku (Japonya) Chiesi (İtalya) Roussel-Maestrelli (İtalya)
2-Hidroksipropil-β-siklodekstrin Cisapride Indomethacin Itraconazole Mitomycin	Fitil Göz damlası Oral ve IV çözeltisi IV çözeltisi	Propulsid Indocid Sporanox Mitozytrex MitoExtra	Janssen (Belçika) Chauvin (Fransa) Janssen (Belçika) SuperGen (USA) Novartis (İsviçre)
Rastgele metillenmiş-β-siklodekstrin 17β-Oestradiol Chloramphenicol	Burun Spreyi Göz damlası solüsyonu	Aerodiol Clorocil	Servier (Fransa) Oftalder (Portekiz)
Sülfobütil β-siklodekstrin Voriconazole Ziprasidone melate	IV çözeltisi IM çözeltisi	Vfend Geodon, Zeldox	Pfizer (USA) Pfizer (USA)

2.7. Mikrodalga Enerjisi

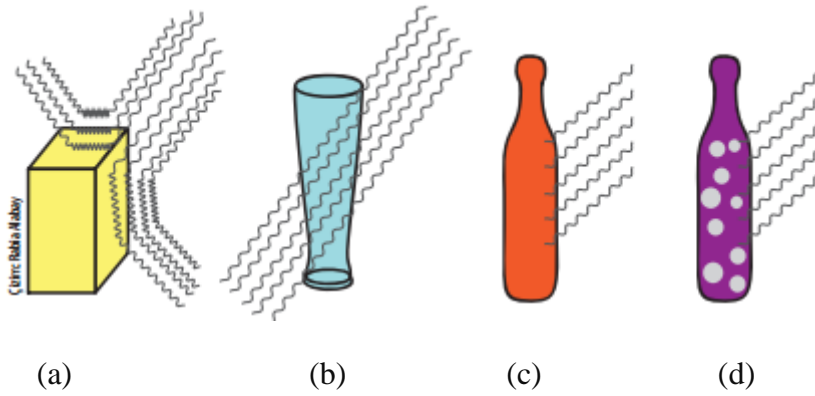
Mikrodalgalar, elektromanyetik spektrumun radyo dalgaları ile kızılötesi ışınlar arasında yer almaktadırlar. Dalga boyu 1mm ile 1 m arasında iken, frekansı 300MHz- 300GHz arasında olan mikrodalgalar; ultraviyole, görünür ya da infrared ışık gibi diğer elektromanyetik dalgalara kıyasla daha düşük frekansa ve enerjiye sahiptir.

Elektrik ve manyetik alan bileşenlerine sahip olan mikrodalgalar, dielektrik ısıtma mekanizması aracılığıyla ısıtma işlemini gerçekleştirmektedir. Bu ısıtma mekanizması mikrodalga ışımasının elektrik alan bileşeni ile iyonik ve dipolar türlerin etkileşmesi ile gerçekleşir. Dipol momente sahip moleküller dönme hareketine bağlı olarak ortaya çıkan sürtünme aracılığı ile ısınırken, yüklü parçacıklar polaritelerinde meydana gelen değişimden dolayı kazandıkları kinetik enerji vasıtası ile ısınmaktadırlar [121].

Mikrodalga cihazları temel olarak mikrodalga kaynağı (jenaratör), iletim hattı ve aplikatörden meydana gelmektedir. Düşük maliyet, güvenilirlik ve yüksek verim avantajlarından dolayı magnetron tüpleri kullanılmaktadır. Isıtılan katottan kopan elektronlar, anot ile katot arasında

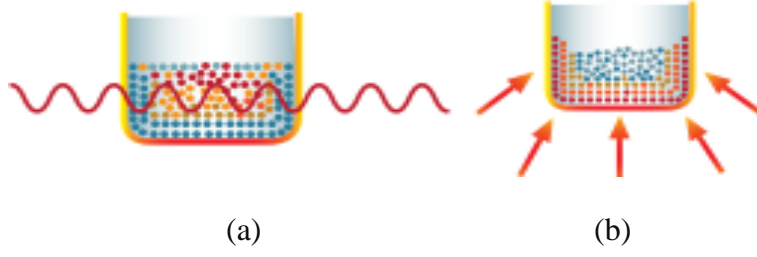
dik ve sabit manyetik alan tarafından dönmeye zorlanırlar. Dönen elektronlar mikrodalga salımına dönüşmektedir. Bu ışımlar iletim hattı ile aplikatöre gönderilir. Aplikatörden ısıtılmak istenen maddeye mikrodalgalar homojen yayılırlar.

Mikrodalga ışıması iletken maddelerin yüzeyinden yansırken, yalıtkan maddelerin içerisinde herhangi bir etki olmaksızın geçerler ve bu maddelerin içinde ısınma gözlenmez. Dielektrik özelliğe sahip maddeler mikrodalga tarafından ısıtılabilir. Mikrodalgayı soğuran çözeltiyi içeren malzemeler de soğurma derecesine bağlı olarak ısınır [122]. Mikrodalganın bu malzemelerle olan etkileşimi Şekil 2.9’da gösterilmiştir.



Şekil 2.9. Mikrodalganın çeşitli malzemelerle etkileşimi: (a) elektriksel olarak iletken, (b) yalıtkan, (c) mikrodalgayı soğuran malzemeler ve (d) mikrodalgayı soğuran çözeltiyi içeren malzemeler [123].

Geleneksel ısıtma metotlarında, ısınma kondüksiyon, konveksiyon ve radyasyon gibi ısı aktarım türleri ile gerçekleşmektedir. Isıtılmak istenen maddenin bulunduğu kap yüzeyinden başlayarak kap içerisindeki malzemeye doğru ısı aktarılır ve termal gradient oluşur. Geleneksel ısınma heterojen ve uzun süren bir süreçtir. Mikrodalga ile ısıtma işlemi ise ısıtılmak istenen maddeyi doğrudan etkilemekte ve molekülleri harekete geçirdiği için termal gradienti azaltmaktadır. Bu nedenle mikrodalga ile ısıtma işlemi geleneksel ısıtma işlemine göre daha hızlı ve homojen bir şekilde gerçekleşmektedir [121]. Geleneksel ısıtma ve mikrodalga ısıtma mekanizması Şekil 2.10’da sunulmuştur.



Şekil 2.10. (a) Mikrodalga ve (b) geleneksel ısıtma mekanizmalarının karşılaştırılması. Geleneksel ısıtma yöntemleri ile günler süren reaksiyon süreleri mikrodalga ısıtma ile çok kısa sürelere indirilirler. Enerji elektromanyetik dalgalarla maddeye doğrudan taşındığı için ortamda enerji kaybı olmaz. Kolayca optimize edilebildiğinden laboratuvar ve sanayide rahatça uygulanabilir [121].

Mikrodalga yiyeceklerin pişirilmesi, pastörize edilmesi ve kurutulması amaçları ile gıda sektöründe yaygın olarak kullanılmaktadır. Sterilizasyon ve kurutma gibi özelliklerinin yanında vücut içindeki fiziksel ve biyolojik işlevlerin kontrol ve takibi için geliştirilen termal görüntüleme için mikrodalga ışınım biyomedikal alanda kullanılmaktadır. Polimer üretim yöntemi, seramiklerin sinterlenmesi ve selülozik atıkların işlenmesi gibi alanlarda kimya sektöründe kullanılmaktadır [123].

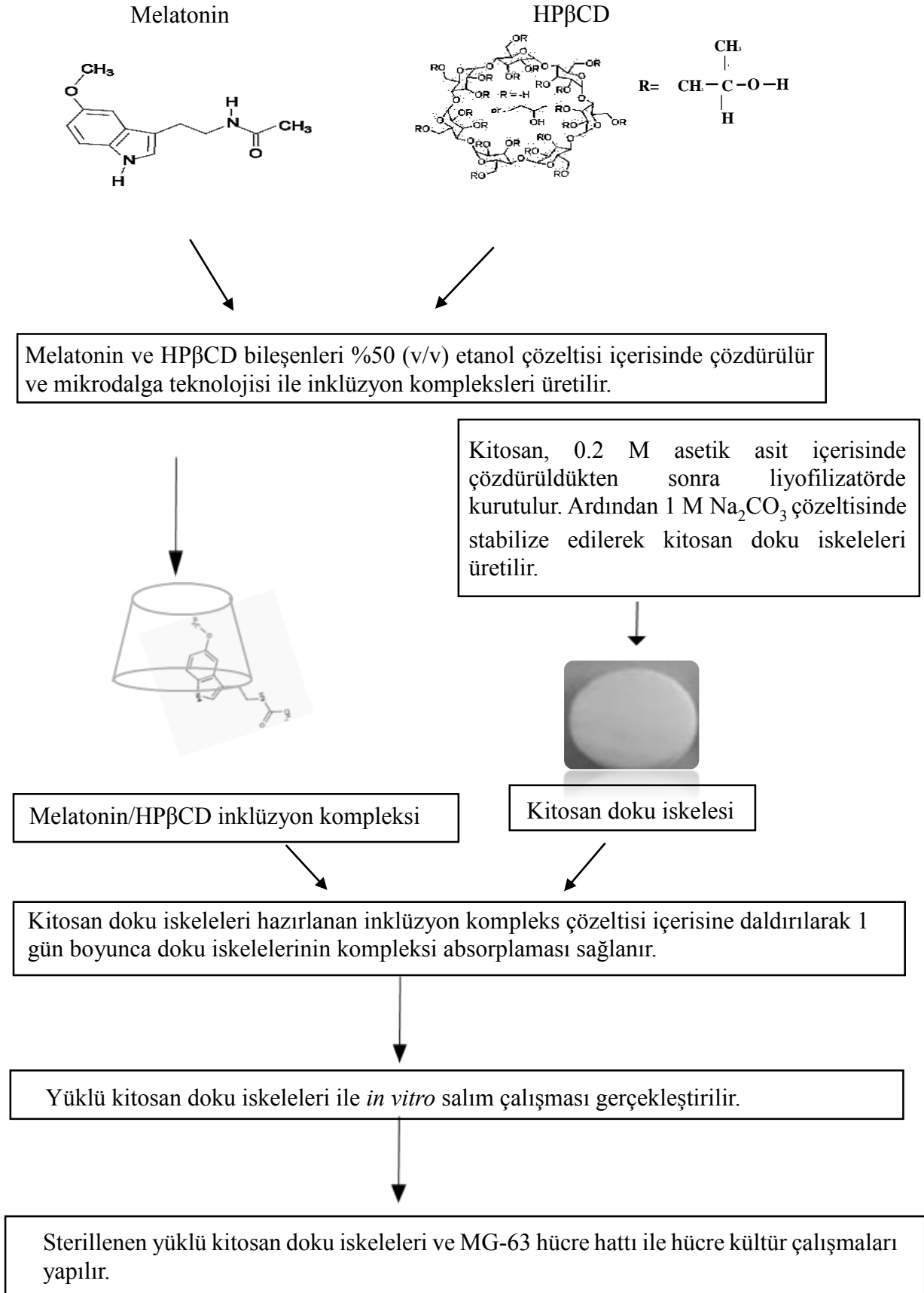
3. DENEYSEL ÇALIŞMALAR

Sunulan tez çalışmasında, melatonin/HP β CD inklüzyon kompleksinin taşıyıcı bir sistem ile kitosan doku iskelesi kullanılarak insan osteosarkom hücreleri üzerindeki dolaylı etkisinin incelenmesi hedeflenmiştir. Bunun için, mikrodalga ve oda koşullarında fiziksel karıştırma yöntemleri ile melatonin/HP β CD inklüzyon kompleksi oluşturulmuştur. Mikrodalga güç ve süre değişkenleri optimize edilerek mikrodalga yönteminde elde edilebilecek en yüksek melatonin konsantrasyonu belirlenmiştir. Optimum koşullar, Higuchi-Connor faz çözünürlük diyagramından hesaplanan kararlılık sabitleri yardımıyla belirlenmiştir. Ardından oluşturulan melatonin/HP β CD inklüzyon kompleksinin varlığını kanıtlamak amacıyla çeşitli karakterizasyon çalışmaları yapılmıştır.

Kitosan doku iskeleleri yüksek biyoyumluluğu ve gözenekli yapısından dolayı ilaç taşıyıcı sistemi olarak seçilmiş ve dondurarak-kurutma yöntemiyle üretilmiştir. Katı melatonin ve melatonin/HP β CD inklüzyon kompleksinin doku iskelelerine yükleme ortamı ve yüklü kitosan doku iskelelerinin kurutma tekniğini belirlemek üzere çeşitli çalışmalar yapılmıştır. Melatonin ve melatonin/HP β CD inklüzyon kompleksi kitosan doku iskelelerine yüklendikten sonra fosfat tampon çözeltisi ile vücut içi ortam taklit edilerek *in vitro* salım çalışması yapılmıştır. Böylelikle melatoninin salım kinetikleri hakkında bilgi edinilmiştir.

Son olarak, melatonin ve melatonin/HP β CD inklüzyon kompleksinin insan kemik kanseri üzerindeki dolaylı etkisinin incelenmesi için MG-63 insan osteosarkom hücre hattı ile yapılan durgun hücre kültür çalışmalarına yer verilmiştir. Hücrelerin canlılığı ve çoğalması MTT analizi ile tespit edilmiş, optik mikroskop görüntüleri ile desteklenmiştir. Üretilen kompleksin hücre döngüsü üzerindeki etkisi akış sitometrisi ile belirlenmiştir.

Şekil 3.1’de tez kapsamında yapılan çalışmalar şematik olarak sunulmuştur.



Şekil 3.1. Tez çalışmasının akış çalışması.

3.1. Kullanılan Kimyasallar ve Cihazlar

İnklüzyon kompleksi bileşenleri olan melatonin, 2-hidroksilpropil- β -siklodekstrin (HP β CD) ile çözücü olarak kullanılan etanol Sigma-Aldrich (ABD) firmasından satın alınmıştır. Kompleks üretimi Milestone (ABD) marka mikrodalga endüstriyel fırında gerçekleştirilmiştir. İnklüzyon kompleksleri vakum etüvünde (Thermo Scientific, ABD) kurutulmuştur.

Doku iskelesi hammaddesi orta molekül ağırlıklı ve %75-85 deasetilasyon derecesine sahip kitosan ve iskele stabilizasyonu için kullanılan sodyum karbonat (Na₂CO₃) Sigma-Aldrich (ABD) firmasından satın alınmıştır. Kitosan çözücüsü olarak kullanılan asetik asit Riedel-de Haen (ABD) firmasından temin edilmiştir. Dondurarak-kurutma işlemi Christ (Almanya) marka liyofilizatörde gerçekleştirilmiştir. *In vitro* salım ortamı olan fosfat tampon çözeltisi (PBS) Sigma (Almanya) firmasından satın alınmıştır. Salım ve Higuchi-Connor faz çözünürlük çalışmalarında melatonin konsantrasyon tayini Thermo Scientific 2000c (ABD) marka spektrofotometrede (nanodrop cihazı) yapılmıştır.

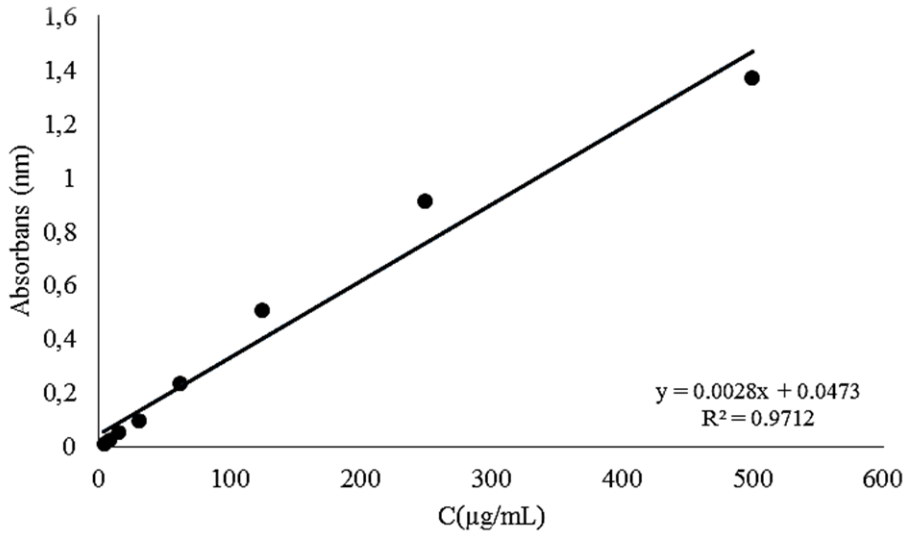
Doku iskelesi üretimi ve hücre kültür çalışmalarında kullanılan 24 gözlü Petri kapları (TCPS) Techno Plastic Products (İsviçre) firmasından temin edilmiştir. Hücre kültür çalışmalarında kullanılan MG-63 hücre hattı Balıkesir Üniversitesi, Moleküler Biyoloji ve Genetik Bölümü'nden alınmıştır. Fetal sığır serumu (FBS) Biowest'ten (Fransa); tripsin/EDTA çözeltisi, Dulbecco's Minimum Essential Media (DMEM, L-glutaminsiz), izopropanol, penisilin-streptomisin, 3-[4,5-dimetiltiazol-2-il]-difenilterazolyum bromür (MTT) ve propidyum iyodür Sigma'dan (Almanya) satın alınmıştır. Hücre kültür flaskları (25 ve 75 cm²) Orange Scientific (Belçika) firmasından alınmıştır. Hücrelerin mitokondriyal aktiviteleri ASYS Hitech UVM 340 Plate Reader (Avusturya) cihazı ile 690 nm referans olmak üzere 570 nm'de belirlenmiştir. Hücre döngü analizi BD FACS Calibur Flow Cytometer marka akış sitometre (ABD) cihazı ile yapılmıştır. Tüm hücre kültür çalışmaları Bioair (İtalya) marka, tip II laminar akış kabininde yürütülmüştür.

3.2. Melatonin/ HP β CD İnklüzyon Kompleksinin Üretim Yöntemleri

Mikrodalga yöntemi ile farklı koşullarda elde edilen melatonin/HP β CD inklüzyon komplekslerinin, içerdikleri melatonin miktarları ve kararlılık sabitleri (K) Higuchi-Connor faz çözünürlük grafiği ile belirlenmiştir. Bu bilgiler ışığında oda koşullarında fiziksel karıştırma yöntemi ve mikrodalga yönteminin karşılaştırılması ile mikrodalga koşullarının belirlenmesine yönelik çalışmalar yapılmıştır.

3.2.1. Melatonin tayini ve kalibrasyonu grafiğinin oluşturulması

Oluşturulacak melatonin/HPβCD inklüzyon kompleksinde bulunan melatonin miktarını tayin etmek amacıyla melatoninin distile su içerisindeki çözeltisi (0.5 mg/mL) hazırlanmıştır. Hazırlanan melatonin çözeltisi seyreltilerek melatoninin farklı konsantrasyonlarındaki çözeltileri elde edilmiştir. Farklı derişimlerdeki bu çözeltilerin UV spektrofotometrede 279 nm dalga boyundaki absorbanları ölçülmüştür ve kalibrasyon grafiğı çizilmiştir. Kalibrasyon grafiğı Şekil 3.2’de gösterilmiştir.



Şekil 3.2. Melatonin konsantrasyonunun belirlenmesinde kullanılan kalibrasyon grafiğı (Dalga boyu: 279 nm).

3.2.2. Higuchi-Connor faz çözünürlük diyagramının eldesi

Higuchi ve Connor’un (1965) geliştirdiğı bu yöntemle, oluşturulan inklüzyon kompleksinin kararlılığı belirlenmektedir [105]. Yöntem, kararlılık sabitlerini dikkate alarak kompleks oluştururken kullanılan yöntemlerin karşılaştırılmasına olanak sağlamaktadır. Bu amaçla, 0-0.10 M konsantrasyon aralığındaki HPβCD ve aşırı miktarda melatonin içeren sulu çözeltileri oda sıcaklığında dengeye gelene kadar karıştırılarak inklüzyon kompleksleri elde edilmiştir. Sistem dengeye geldikten sonra melatonin konsantrasyonu spektrofotometrik olarak belirlenmiş ve melatonin konsantrasyonu HPβCD konsantrasyonuna karşı grafiğı geçirilmiştir. Bu çalışma ile elde edilen en yüksek melatonin konsantrasyonu, kararlılık sabiti ve oluşan kompleksin sitokiyometrik oranı bulunmuştur.

3.2.3. Melatonin/HP β CD inklüzyon komplekslerinin mikrodalga yöntemi ile elde edilmesi ve optimum koşullarının belirlenmesi

Melatonin/HP β CD inklüzyon kompleksi mikrodalga teknolojisi kullanılarak hazırlanmıştır. Bu yöntem; uygun çözücüde hazırlanmış, kompleks bileşenlerini içeren çözeltinin mikrodalga ısıtma mekanizması yardımıyla inklüzyon kompleksi elde edilmesine dayanır [124]. Sunulan tez çalışmasında, 0 ile 0.10 M konsantrasyon aralığında hazırlanan HP β CD ve aşırı miktardaki melatonin suda çözülmüştür. Hazırlanan sulu melatonin ve HP β CD çözeltisi mikrodalga fırına (Milestone) konulmuştur. Suda çözünen inklüzyon komplekslerinin bozulmaya başladığı sıcaklık olan 60°C’de mikrodalga koşulunda çalışılmıştır. Hazırlanan örnekler Çizelge 3.1’de gösterilen güç ve süre değişkenleri kullanılarak optimum mikrodalga koşulları belirlenmiştir. Mikrodalga işlemi uygulandıktan sonra elde edilen melatonin/HP β CD inklüzyon kompleks çözeltisi 0.45 μ m membran filtrelerinden süzölmüştür. Ardından, inklüzyon kompleksinde bulunan melatonin miktarı spektrofotometrik olarak belirlenmiş ve melatonin konsantrasyonuna karşı HP β CD konsantrasyonu grafiğe geçirilerek Higuchi-Connor’ın faz çözünürlük diyagramı oluşturulmuştur.

Çizelge 3.1. Melatonin/HP β CD inklüzyon kompleksi oluşturulması için kullanılan mikrodalga koşulları.

Süre (saniye)	GÜÇ (Watt)		
	150	600	900
45	-	-	+
90	+	+	+
180	+	-	+

3.2.4. Melatonin/ HP β CD inklüzyon komplekslerinin oda koşullarında fiziksel karıştırma yöntemi ile elde edilmesi

Oda koşullarında gerçekleştirilen fiziksel karıştırma yönteminde de mikrodalga yönteminde kullanılan melatonin, HP β CD ve çözücü miktarları ile çalışılmıştır. Bileşenler 24 ve 72 saat boyunca manyetik karıştırıcı yardımı ile karıştırılarak inklüzyon kompleksi oluşturulmuştur. Inklüzyon komplekslerinin içerdiği melatonin konsantrasyonu UV spektrofotometresinde 279 nm dalga boyunda tayin edilmiştir.

3.2.5. Melatonin/HPβCD inklüzyon komplekslerinin kurutulması

Optimum mikrodalga koşulları kullanılarak üretilen inklüzyon kompleksleri, 0.45 µm membran filtreden geçirilerek vakum altında 50°C sıcaklıkta 3 gün boyunca kurutulmuştur. Böylelikle katı halde melatonin/HPβCD inklüzyon kompleksleri elde edilmiştir.

3.3. Melatonin/HPβCD İnküzyon Komplekslerinin Karakterizasyonu

3.3.1. Fourier dönüşümlü infrared spektroskopisi (FTIR) analizi

Üretilen katı haldeki melatonin/HPβCD inklüzyon kompleksini yapısal olarak karakterize etmek amacıyla FTIR analizi yapılmıştır. Örneklerin FTIR spektrumları 400-4000 cm⁻¹ dalga boyu aralığında alınmıştır. Kurutularak katı hale getirilen örnekler potasyum bromürle (KBr) karıştırılarak hazırlanmış diskler kullanılarak Thermo Scientific FTIR- SMART ITR Diamond ATR (ABD) cihazında analiz gerçekleştirilmiştir.

3.3.2. Diferansiyel taramalı kalorimetri (DSC) analizi

Saf melatonin ve HPβCD örneklerinin termal geçiş sıcaklıklarının bulunması ve melatoninin siklodekstrinin içerisindeki boşluğa girip girmediğinin belirlenmesi amacıyla 40°-200°C sıcaklık aralığında, azot ortamında ve 10°C/dakika ısıtma hızında diferansiyel taramalı kalorimetre (Diamond DSC, Perkin Elmer, ABD) cihazı ile analiz gerçekleştirilmiştir.

3.3.3. Termogravimetrik (TGA) analiz

Üretilen melatonin/HPβCD inklüzyon kompleksinin fiziksel ve kimyasal değişimlerinin gerçekleştiği sıcaklığı belirlemek amacı ile SII exstar 6000 (Perkin Elmer, ABD) cihazı yardımıyla 40°-450°C sıcaklık aralığında ve 10°C/dakika ısıtma hızında analiz gerçekleştirilmiştir.

3.3.4. X ışını kırınımı (XRD) analizi

Elde edilen melatonin/HPβCD inklüzyon kompleksinin faz özelliklerini incelemek ve nitel analizi yapabilmek için Micro Max 007HF DW (Rigaku) cihazında Kα ışınması ile XRD analizi gerçekleştirilmiştir. Analiz, 0°-60° (2θ) kırınım açısı aralığında yürütülmüştür.

3.3.5. ¹H ve ¹³C nükleer manyetik rezonans spektroskopisi (NMR) analizi

Melatoninin, HPβCD boşluğuna giriş yönünü tayin etmek ve ilgili moleküllerin kendi aralarındaki fiziksel etkileşimlerinin türünü belirlemek amacıyla nükleer manyetik rezonans spektroskopisi (Bruker, Almanya) ile analiz yapılmıştır. Birer miligram melatonin, melatonin/HPβCD ve HPβCD birer mililitre D₂O çözeltisinde ayrı ayrı çözdürülerek analiz gerçekleştirilmiştir.

3.3.6. Kompleks oluşturma veriminin hesaplanması

Bölüm 3.2.5'te anlatılan yöntem kullanılarak katı halde elde edilen melatonin/HPβCD inklüzyon kompleksleri %50 (v/v) etanol çözeltisi içerisinde çözdürülmüş ve UV spektrofotometresi (279 nm) yardımıyla içerdikleri melatonin konsantrasyonu tayin edilmiştir. Bu amaçla kullanılan kalibrasyon grafiği Ek 1'de verilmiştir. Hesaplanan melatonin konsantrasyonları kullanılarak, Eşitlik 3.1 yardımıyla yüzdece inklüzyon kompleksi oluşturma verimi hesaplanmıştır.

$$\% \text{İnklüzyon kompleksi oluşturma verimi} = \frac{[\text{Hesaplanan melatonin miktarı}]}{[\text{Teorik melatonin miktarı}]} * 100 \quad (3.1)$$

3.4. Melatonin/HPβCD İnküzyon Kompleksi İçeren ve İçermeyen (Boş) Kitosan Doku İskelelerinin Sentez ve Karakterizasyonu

3.4.1. Boş kitosan doku iskelelerinin sentezi

Kitosan doku iskeleleri grubumuzca geliştirilen dondurarak-kurutma yöntemi ile üretilmiştir [125]. Bu yöntemde göre; %75-85 deasetilasyon derecesine sahip ve orta ağırlıktaki kitosan, 0.2M asetik asit çözeltisinde iki gün boyunca karıştırılarak hazırlanmış, böylelikle %2 (w/v) kitosan konsantrasyonuna sahip jel karışımlar elde edilmiştir. Ardından, bu jel karışım 0.45 µm filtreden geçirilerek safsızlıkları giderilen kitosan çözeltisi 24 gözlü Petri kaplarına (TCPS) aktarılmış ve -20°C'de dondurulmuştur. Kitosan çözeltisi -80°C sıcaklıkta 5 gün boyunca liyofilizatörde (Christ, Alpha 2-4 LO) kurutularak oluşan buz kristallerinin süblimleşmesi sağlanmış ve gözenekli bir yapı elde edilmiştir. Oluşturulan çözünür kitosan doku iskeleleri 1 M sodyum karbonat (Na₂CO₃) çözeltisinde 6 saat stabilize edilmiş ve böylelikle çözünmez hale getirilmiştir. Yıkama işlemi distile su ile ortam nötr oluncaya kadar sürdürülmüştür. Ardından iskeleler liyofilizatör yardımı ile 1 gün boyunca kurutulmuştur. Böylelikle 9 mm çap ve 2 mm kalınlığa sahip kitosan doku iskeleleri üretilmiştir.

3.4.2. Melatonin ve melatonin/HPβCD inklüzyon komplekslerinin kitosan doku iskelelerine yüklenmesi ve yüklü iskelelerin karakterizasyonu

3.4.2.1. Yükleme yönteminin seçimi

Melatonin/HPβCD inklüzyon kompleksi ve melatonin, kitosan doku iskelelerine emdirme yöntemiyle yüklenmiştir. Emdirme işleminin gerçekleştirilebilmesi için pipetleme ve daldırma olmak üzere iki farklı teknik kullanılmıştır. Daldırma yönteminde, kitosan doku iskelelerine yüklenecek bileşenin uygun çözeltisi hazırlandıktan sonra kitosan doku iskeleleri ilgili çözeltiliye daldırılmıştır. Pipetleme yönteminde ise, melatonin veya melatonin/HPβCD inklüzyon kompleks çözeltisi kitosan doku iskeleleri üzerine mikro pipet yardımıyla enjekte

edilmiştir. Yüklü doku iskeleleri 1 gün boyunca +4°C’de bekletilmiştir. Ardından -20°C’de 4 saat ön dondurma işlemi yapılmış ve sonrasında 1 gece boyunca liyofilizatörde kurutulmuştur.

3.4.2.2. Doku iskelelerinin kurutma yönteminin belirlenmesi

Melatonin ve melatonin/HPβCD inklüzyon kompleksi yüklü kitosan doku iskelelerinin yapısal özelliklerinin değiştirilmeden kurutulması için uygun yöntem belirlenmeye çalışılmıştır. Boş kitosan doku iskeleleri 2 mL hacminde distile su, etanol ve %50 (v/v) etanol çözeltisi içerisine daldırılmıştır ve bir gün boyunca +4 °C’de çözücülerin iskelelere emilimi sağlanmıştır. Çözücülerle yüklü bu iskeleler liyofilizatörde ve vakum etüvünde kurutulmuşlardır. Kurutulan iskelelerin 0 ile 150 dakika arasındaki belli sürelerdeki ağırlık kayıpları belirlenmiş ve yapısal değişimleri gözlemsel olarak incelenmiştir.

3.4.2.3. SEM ile görüntüleme

Melatonin/HPβCD inklüzyon kompleksi içeren kitosan doku iskelelerinden alınan enine ve boyuna kesitler altın-paladyum ile kaplanmış ve Zeiss (Evo-50, Almanya) taramalı elektron mikroskobu (SEM) ile incelenmiştir.

3.4.2.4. XRD analizi

Boş ve melatonin/HPβCD inklüzyon komplekslerini içeren kitosan doku iskelelerinin XRD (PANanalytical X’Pert Pro MPD) analizi gerçekleştirilmiştir. Sonuçlar 0-60° (2θ) kırınım açısı aralığında tarama yapılarak elde edilmiştir.

3.4.3. Melatonin ve melatonin/HPβCD inklüzyon komplekslerinin kitosan doku iskelelerine yükleme miktarının hesaplanması

Kitosan doku iskeleleri tarafından emilen melatonin ve melatonin/HPβCD inklüzyon kompleksi miktarının bulunması için konsantrasyon ve hacim değerlerinin bilinmesi gereklidir. Bu amaç doğrultusunda, öncelikle üretilen 4 mg melatonin/HPβCD inklüzyon kompleksinin içerdiği melatonin miktarı spektrofotometrik olarak belirlenmiştir. Bu değer kullanılarak inklüzyon kompleksinin kitosan doku iskelelerine yüklenmeden önceki başlangıç melatonin konsantrasyon değerine geçilmiştir. Kompleksin kitosan doku iskelelerine emdirilme işleminden sonra iskeleler çözülden uzaklaştırılmıştır. Kalan çözeltinin melatonin miktarı spektrofotometrik olarak belirlendikten sonra uygun kalibrasyon grafiği kullanılarak melatoninin konsantrasyon değeri hesaplanmıştır. Sulu melatonin/HPβCD inklüzyon kompleksi çözeltisi ile çalışıldığında Bölüm 3.2.1’de yer alan kalibrasyon grafiğinden yararlanılırken etanolde hazırlanan melatoninin iskele başına düşen miktarının belirlenmesinde Ek 2’de yer alan melatoninin etanoldeki kalibrasyon grafiği kullanılmıştır. İskeleler tarafından emilen kompleks çözeltisinin hacim değerleri, emilim işleminin öncesinde ve sonrasında

bulunan çözelti yüksekliklerindeki değişim belirlenmiştir. Bunun için cam şişenin 1 mm yükseklik başına ne kadar çözelti hacmi değiştiği tespit edilmiş ve 1 mm yükseklik değişiminin 200 µL'e karşılık geldiği bulunmuştur. İskele başına düşen melatonin miktarının hesaplama işlemi de Ek 4'te sunulmuştur.

3.4.4. *In vitro* Melatonin Salım Çalışması

Melatonin ve melatonin/HPβCD inklüzyon kompleksi yüklü kitosan doku iskeleleri liyofilizatörde kurutulduktan sonra % 0.1 (w/v) sodyum azit içeren 5 mL fosfat tampon çözeltisine (PBS, pH 7.4) eklenerek salım çalışmaları yürütülmüştür. *In vitro* salım çalışmaları 70 rpm hızında ve 37 °C'de çalışan çalkalamalı etüvde gerçekleştirilmiştir. Salınan melatonin miktarını belirleyebilmek için ilk gün 0, 5, 10, 15, 20, 30, 60, 90, 120, 160 ve 300 üncü dakikalarda rezervuardan numuneler alınmış ve alınan numune hacmi kadar taze PBS ortama eklenmiştir. Alınan numunelerin içerdiği melatonin miktarları 279 nm'de spektrofotometrik olarak belirlenmiştir. Salınan melatoninin konsantrasyon değerleri Ek 2'de verilen kalibrasyon grafiğinden elde edilen denklem yardımıyla hesaplanmıştır. Bu konsantrasyonlar kullanılarak melatoninin kümülatif salım profili oluşturulmuştur. Salım çalışmasında 3 paralel örnek kullanılmıştır.

3.5. Hücre Kültür Çalışmaları

3.5.1. Hücre kültür koşulları

Melatoninin insan kemik kanseri üzerindeki etkisini incelemek amacıyla fibroblastik morfolojide ve yüzeye yapışarak çoğalan 17. pasajdaki insan osteosarkom hücre hattı (MG-63) hücreleri kullanılmıştır. Kullanılan MG-63 hücrelerinin ikilenme süresi 26 saat olarak belirlenmiştir. Bu hücrelerin kültürasyon işlemi hacimce %10 fetal sığır serumu (FBS), %1 penisilin/streptomisin, %2 L-glutamin içeren DMEM besi ortamında ve 37°C'deki Heraus Instruments (Almanya) marka CO₂ inkübatöründe gerçekleştirilmiştir. Hücreler kültür kaplarını tamamen kapladıktan sonra tripsinizasyon işlemi ile tutunduğu yüzeyden kaldırılmıştır. FBS içeren besi ortamı ile tripsin inhibe edilerek tripsinin hücrelere zarar vermesi engellenmiştir.

Hücre kültür çalışmalarında, TCPS, boş kitosan doku iskelesi, melatonin/HPβCD inklüzyon kompleksi yüklü kitosan doku iskelesi ve melatonin yüklü kitosan doku iskelesi olmak üzere dört farklı grup kullanılmıştır. Öncelikle, 24 gözlü TCPS'lerin her bir gözüne 2x10⁴ hücre/mL olacak şekilde MG-63 hücreleri ekilmiş ve bir gün boyunca hücrelerin kap yüzeyine tutunmaları ve çoğalmaları sağlanmıştır. Ertesi gün hücrelerin üzerindeki besi ortamı uzaklaştırılmış ve taze besi ortamı eklenmiştir. Ardından, boş, melatonin ve melatonin/HPβCD inklüzyon kompleksi yüklü kitosan doku iskeleleri TCPS gözlerine yerleştirilmiş ve üç gün boyunca CO₂

inkübatöründe inkübasyon gerçekleştirilmiştir. Çalışmada kontrol grubu olarak doku iskelesi içermeyen TCPS ve boş kitosan doku iskeleleri kullanılmıştır. Hücre kültür çalışmaları 3 paralel örnekle yürütülmüştür. Tüm kitosan doku iskeleleri iki yönlü olarak UV ışık altında 10 dakika boyunca sterilize edilmiştir.

3.5.1.1. MTT analizi

3-[4,5-dimetiltiazol-2-il]-difeniltetrazolyum bromür (MTT) analizi, üremesini devam ettiren canlı hücrelerin mitokondriyal aktivitelerinin belirlenmesine dayanan bir analizdir. Bu analizde suda çözünür tetrazolyum tuzları hücre içerisinde metabolize edilerek suda çözünmez formazan kristallerine dönüşmektedir. Elde edilen formazan kristalleri izopropanolde çözüldüğünde mor renkli bir çözelti oluşmaktadır. Ortaya çıkan mor renkli bu çözelti spektrofotometrik olarak absorbans değeri verir ve bu değer çoğalan canlı hücre miktarı ile doğru orantılıdır. Hücreler kitosan doku iskeleleri aracılığı ile etkileştirildikten sonraki 1., 2. ve 3. günlerde kantitatif olarak MTT analizi gerçekleştirilmiştir. Bunun için gözlere 600 µL serumsuz taze besi ortamı ile 60 µL MTT çözeltisi (2.5 mg/mL steril PBS) eklenerek 37°C'de 3 saat inkübe edilmiştir. İnkübasyon işleminin ardından 400 µL 0.04 M HCL içeren izopropanol çözeltisi gözlere eklenerek oluşan mor renkli formazan kristallerinin çözünmesi sağlanmıştır. Elde edilen çözeltiden 200 µL alınarak 96-gözlü kaba aktarılmış ve spektrofotometre (pleyt reader, Asys UVM 340, Avusturalya) yardımıyla 690 nm referans olmak üzere 570 nm'de absorbans ölçümü yapılmıştır.

3.5.1.2. İvert mikroskop ile görüntüleme

Boş ve yüklü kitosan doku iskeleleri ile etkileşen hücrelerin 3 gün boyunca her gün optik mikroskop ile görüntüleri alınmıştır. Görüntüleme öncesi hücrelerin üzerindeki iskeleler ve besi ortamları gözlerden uzaklaştırılmış ve yerine steril PBS eklenerek optik mikroskop (Olympus, ABD) ile farklı büyütme oranlarında hücre fotoğrafları çekilmiştir.

3.5.1.3. Akış sitometride hücre döngüsünün belirlenmesi

MG-63 hücreleri kitosan doku iskeleleri ile etkileştirildikten 1 gün sonra akış sitometrisinde hücre döngü analizi gerçekleştirilmiştir. Hücrelerin üzerindeki besi ortamı ve tripsinizasyon işlemiyle yüzeyden kaldırılan hücreler ayrı ayrı 1,500 rpm'de 5 dakika boyunca santrifüjlenmiştir. Süpernatant atıldıktan sonra, 1 kez steril PBS ile yıkanan hücreler %70'lik soğuk etanolde tespit edilmiş ve analize kadar -20°C'de bekletilmiştir. Analiz öncesinde, hücreler PBS ile yıkandıktan sonra 1,500 rpm'de 5 dakika boyunca santrifüjlenmiştir. Ardından, hücrelerin üzerine %0.1 Triton X-100, 10 µg/mL propidyum iyodür ve 100 µg/mL DNase-free RNase içeren boyama çözeltisi eklenmiş ve yarım saat karanlıkta inkübasyon

gerçekleştirilmiştir. İnkübasyon sonrası hücre döngü analizi akış sitometri cihazında (BD FACS Calibur, ABD) gerçekleştirilmiş ve 20,000 çekirdek sayılarak iki değişkenli histogramdan sonuçlar değerlendirilmiştir.

3.5.1.4. İstatistiksel analiz

Yapılan deneysel çalışmalardan elde edilen veriler, üç deney için ortalama olarak \pm standart sapma değerleri olarak sunulmuştur. Çalışma sonuçları, Graphpad Software Instant programı kullanılarak istatistiksel açıdan değerlendirilmiştir. Farklı grupların istatistiksel olarak karşılaştırılması için tek yönlü varyans analiz (ANOVA) testi kullanılmış ve p-değerinin 0.05'ten az olduğu durumlar anlamlı kabul edilmiştir.

4. SONUÇLAR VE TARTIŞMA

Tezin bu bölümünde yapılan deneysel çalışmalardan elde edilen sonuçlara ve bu sonuçların değerlendirilmesine yer verilmiştir. İlk olarak melatonin/HP β CD inklüzyon komplekslerinin üretimi ve karakterizasyonu ile ilgili sonuçlar sunulmuştur. Daha sonra kompleks yüklü kitosan doku iskelelerinin karakterizasyonları ve yapılan *in vitro* salım çalışmaları anlatılmıştır. Son olarak ise, MG-63 hücre hattı kullanılarak durgun hücre kültür ortamında gerçekleştirilen canlılık ve proliferasyon çalışmalarından elde edilen sonuçlara yer verilmiştir.

4.1. Melatonin/HP β CD İnküzyon Komplekslerinin Hazırlanması

Melatoninin birçok fizyolojik özelliğinin yanı sıra, tümör hücreleri üzerinde apoptotik ve antiproliferatif etkilere sahip olduğu bilinmektedir [48]. Melatoninin tümör hücreleri üzerindeki bahsedilen bu olumlu etkileri göz önüne alınarak gerçekleştirilen bu çalışmada, insan osteosarkom hücrelerinin canlılığını ve çoğalmasını engellemek için bu hormon tercih edilmiştir. Melatoninin kanser hücreleri üzerindeki öldürücü etkisini gösterebilmesi için yüksek konsantrasyonda olması gerekmektedir [4, 126]. Sudaki çözünürlüğü az olan melatoninin yüksek konsantrasyonlara çıkabilmesi için siklodekstrin molekülleri ile inklüzyon kompleksi oluşturulması fikri ortaya çıkmıştır.

Siklodekstrinler hidrofobik boşluğa ve hidrofilik dış yüzeye sahip oligosakkaritlerdir. Bu moleküllerin en önemli özelliği hidrofobik yapılarla inklüzyon kompleksi oluşturarak bu yapıların fizikokimyasal özelliklerini arttırmaktır [94]. Çalışma kapsamında siklodekstrinler arasından suda yüksek çözünürlüğe ve minimum toksikolojik etkilere sahip olması nedeniyle hidrokisipropil- β -siklodekstrin (HP β CD) seçilmiştir. HP β CD'nin kendisi ve çeşitli ilaçlarla oluşturduğu inklüzyon kompleksleri Amerikan Gıda ve İlaç Dairesi (FDA) tarafından onaylıdır ve çeşitli ticari ürünler olarak piyasada bulunmaktadır.

Literatür incelendiğinde, melatonin/HP β CD inklüzyon komplekslerinin üretildiği sınırlı sayıda çalışma olduğu görülmüştür. Bu çalışmalarda inklüzyon kompleksleri fiziksel karışım, dondurarak-kurutma, ani buharlaşma ve öğütme gibi çeşitli yöntemler kullanılarak üretilmiştir [9, 10]. Ancak literatürde bu inklüzyon komplekslerinin mikrodalga yöntemiyle oluşturulduğu bir çalışmaya rastlanılmamıştır. Bununla beraber, mikrodalga yöntemiyle daha hızlı ve yüksek verimde inklüzyon komplekslerinin oluşturulduğu bilinmektedir. Böylelikle, tez çalışması kapsamında melatonin/HP β CD inklüzyon komplekslerinin mikrodalga yöntemiyle üretilmesi fikri ön plana çıkmıştır.

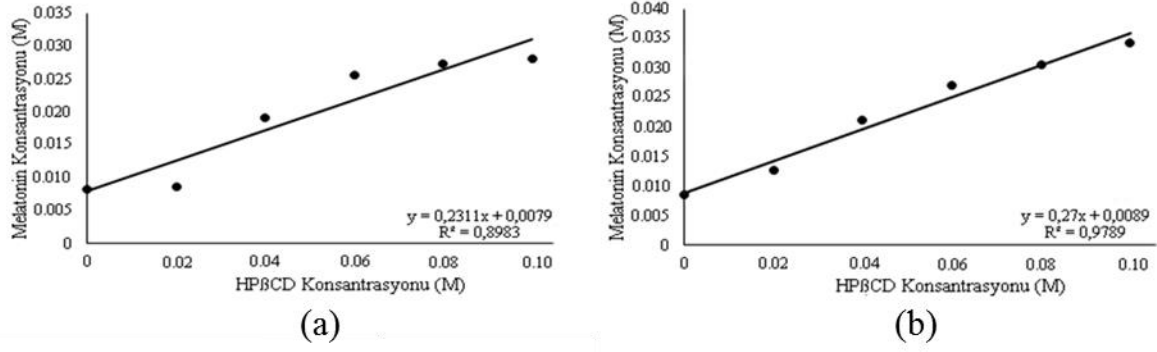
Mikrodalga yöntemi, inklüzyon kompleksi üretiminde kullanılan bir tekniktir. Bu yöntemde; siklodekstrin ve misafir molekül uygun bir çözücü içerisinde çözdürülür. Ardından oluşturulan çözelti mikrodalga fırında kısa sürede mikrodalga ışımasıyla etkileştirilerek inklüzyon komplekslerinin oluşumu sağlanır. Zhao ve arkadaşları (2001) tarafından yapılan çalışmada, Andrographolide/HP β CD inklüzyon kompleksi %50 (v/v) etanol çözeltisinde 60°C ve 90 saniye boyunca mikrodalga işlemiyle üretilmiştir. Mikrodalga işlemi tamamlandıktan sonra, kompleks oluşturmamayan bileşenlerin çözeltiden ayrılması için yeterli miktarda çözücü ortama eklenerek önce siklodekstrinin, sonra ilacın çökmesi sağlanmıştır. Son olarak, kompleks oluşturmamış bileşenleri ayırmak için çözelti 0.45 μ m'lik membran filtrelerden geçirilmiştir [124].

Sunulan tez çalışmasında, ilk olarak melatonin/HP β CD inklüzyon kompleksleri önce oda sıcaklığında fiziksel karıştırma yöntemiyle, ardından mikrodalga yöntemiyle oluşturulmuştur. Mikrodalga işlemiyle gerçekleştirilen inklüzyon kompleksleri üretiminde, elde edilebilecek en yüksek melatonin konsantrasyonuna ve denge kararlılık sabitine ulaşabilmek amacıyla mikrodalga koşullarından olan güç ve süre değişkenlerinin optimum değerleri belirlenmiştir. Bu amaca yönelik olarak, mikrodalga işlemi şu şekilde yapılmıştır: Sulu çözeltisi hazırlanan melatonin ve HP β CD moleküllerine farklı güç (150 W, 600 W, 900 W) ve süre (45 s, 90 s, 180s) değişkenleri uygulanmıştır. Mikrodalga işleminin ardından elde edilen melatonin/HP β CD inklüzyon kompleksleri 0.45 μ m membran filtrelerden geçirilerek çözeltideki olası safsızlıkların giderilmesi amaçlanmıştır. Zhao ve arkadaşlarının yaptığı çalışmadan farklı olarak; çalışılan siklodekstrin tipi (HP β CD) hidrofilik yapıda olduğundan dolayı, mikrodalga işleminden sonra uygun bir çözücü eklenerek kompleks oluşturmamış bileşenlerin çöktürülmesi işlemi yapılmamıştır. Bir sonraki aşamada, fiziksel karıştırma ve mikrodalga yöntemlerini karşılaştırabilmek için oluşturulan inklüzyon komplekslerinin kararlılık sabitleri, içerdiği melatonin konsantrasyonları ve alıkonma süreleri belirlenmiştir. Son olarak, daha yüksek melatonin konsantrasyonunda inklüzyon kompleksinin üretilmesi için melatonin/HP β CD inklüzyon kompleksi %50 (v/v) etanol çözeltisinde ve optimum mikrodalga koşullarında oluşturulmuştur. Oluşturulan bu inklüzyon kompleksini içeren çözelti kurutularak katı hale getirilmiştir.

4.1.1. Melatonin/ HP β CD inklüzyon komplekslerinin oda sıcaklığında fiziksel karıştırma yöntemi ile elde edilmesi

Melatonin/HP β CD inklüzyon komplekslerinin fiziksel karıştırma yöntemiyle oluşturulması amacıyla, sulu HP β CD ile melatonin çözeltisi oda koşullarında 24 ve 72 saat boyunca

kariştirilmiştir. Bu işlemden sonra, 0.45 µm membran filtrelerden süzdürülen kompleks çözeltilerinin içerdiği melatonin konsantrasyonu spektrofotometrik olarak belirlenmiş ve hesaplanan melatonin konsantrasyonları ile Higuchi-Connor faz çözünürlük diyagramları çizilmiştir. Elde edilen faz çözünürlük diyagramları ve bu diyagramlardan elde edilen sonuçlar sırasıyla Şekil 4.1 ve Çizelge 4.1’de verilmiştir.



Şekil 4.1. Oda koşullarında fiziksel karıştırma yöntemi ile oluşturulan inklüzyon komplekslerine ait faz çözünürlük diyagramları: (a) 24 saat ve (b) 72 saat.

Şekil 4.1’de bulunan faz çözünürlük diyagramlarındaki eğimlerin birden küçük (<1) bulunması, melatonin/HPβCD inklüzyon komplekslerinin sitokiyometrik olarak 1:1 (M/M) oranında oluştuğunu ve bu komplekslerin A_L tipi eğri verdiğini göstermektedir [127]. Şekil 4.1’de yer alan 24 ve 72 saatlik çalışmanın faz çözünürlük diyagramlarına bakıldığında, 24 saatlik çalışmaya ait profilin 72 saatlik çalışmanınki kadar doğrusal olmadığı belirlenmiştir. Yirmidört ve 72 saatlik çalışmaların regresyon değerleri sırasıyla 0.898 ve 0.979 olarak tespit edilmiştir.

Çizelge 4.1. Oda sıcaklığında fiziksel karıştırma yöntemi ile oluşturulan melatonin/HPβCD inklüzyon komplekslerinin özellikleri.

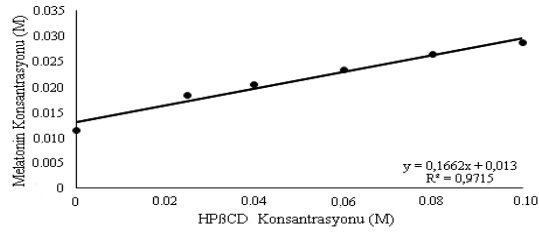
Süre (Saat)	R^2	K (M^{-1})	L_0 (M)	$[C_{maks}]$ (M)
24	0.898	44.22	0.00849	0.0320
72	0.979	43.53	0.00850	0.0343

Kararlık sabitleri (K), melatoninin sudaki çözünürlüğü (L_0) ve inklüzyon kompleksindeki en yüksek melatonin konsantrasyonu ($[C_{maks}]$) verilen Çizelge 4.1 incelendiğinde, oda sıcaklığında

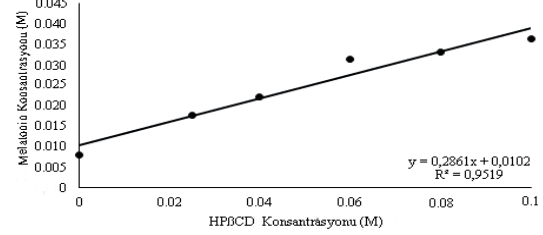
24 ve 72 saat boyunca fiziksel karıştırma yöntemi ile oluşturulan melatonin/HP β CD inklüzyon komplekslerinin kararlılık sabitleri sırasıyla 44.22 ve 43.53 M⁻¹, melatoninin suda çözünürlükleri ise 0.00849 ve 0.00850 M, komplekste bulunan en yüksek melatonin konsantrasyonları 0.0320 ve 0.0343 M olarak hesaplanmıştır. Elde edilen kararlılık sabiti değeri 24 saat için daha yüksek olmasına rağmen regresyon değerinin (R²) bu koşulda düşük olması, inklüzyon kompleksinin oluştuğu dengenin henüz tamamlanmadığına işaret etmektedir. Bu veriler ışığında, inklüzyon kompleksi denge reaksiyonunun 72 saatte tamamlandığı anlaşılmaktadır. Maeda ve arkadaşlarının (2014) yaptığı çalışmada melatoninin farklı siklodekstrinlerle oda sıcaklığında fiziksel karıştırma yöntemiyle 3, 17, 24, 48 ve 72 saat süreleri boyunca inklüzyon kompleksleri oluşturulmuş ve 72 saatte inklüzyon kompleksinin dengeye geldiği görülmüştür [9]. Böylelikle, tez çalışmasından elde edilen sonuç ile literatürün uyumlu olduğu görülmüştür.

4.1.2. Melatonin/HP β CD inklüzyon komplekslerinin mikrodalga yöntemi ile elde edilmesi ve optimum koşulların belirlenmesi

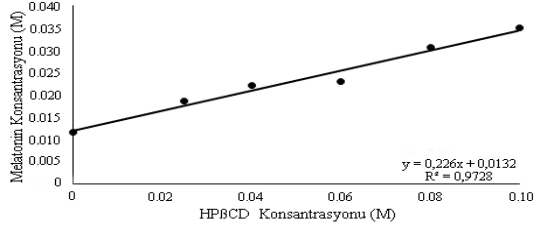
Çalışmada 0-0.10 M konsantrasyon aralığındaki HP β CD ve 10 mg/mL konsantrasyondaki melatonin kullanılmıştır. Belirlenen melatonin ve HP β CD bileşenleriyle farklı mikrodalga koşullarında inklüzyon kompleksleri oluşturulmuştur. Bu komplekslerin içerdiği melatonin miktarları spektrofotometrik olarak tayin edilmiş ve siklodekstrin konsantrasyonlarına karşı melatonin konsantrasyonu grafiğe geçirilmiştir. Uygulanan farklı mikrodalga koşullarına göre oluşturulan faz çözünürlük diyagramları Şekil 4.2’de verilmiştir.



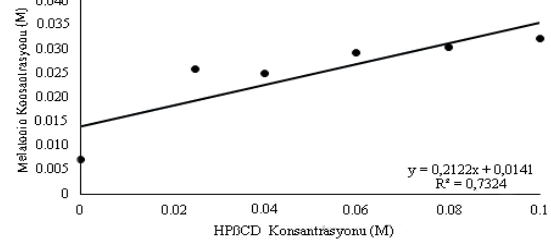
(a)



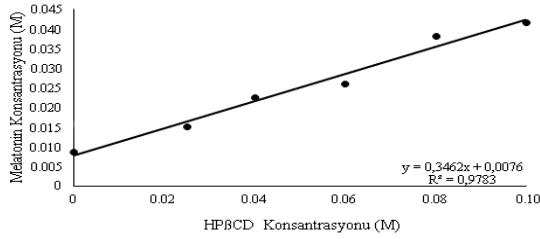
(d)



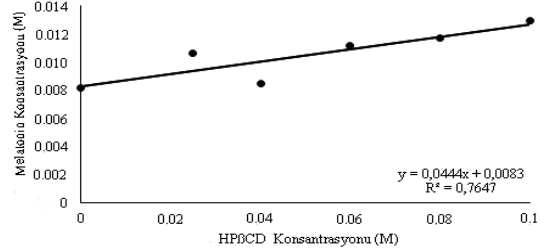
(b)



(e)



(c)



(f)

Şekil 4.2. Farklı mikrodalga koşullarında elde edilen melatonin/HPβCD inklüzyon komplekslerinin faz çözünürlük diyagramları: (a) 150 W, 90 s; (b) 600 W, 90 s; (c) 900 W, 90s; (d) 900 W, 45 s; (e) 900 W, 180 s ve (f) 150 W, 180 s.

Şekil 4.2'deki faz çözünürlük diyagramlarının eğimlerinin birden küçük (<1) bulunması, melatonin/HPβCD inklüzyon komplekslerinin sitokiyometrik olarak 1:1 (M/M) oranında oluştuğunu ve bu komplekslerin A_L tipi eğri verdiğini göstermektedir [127]. Bu faz çözünürlük eğrilerine ait eğim ve melatoninin suda çözünürlük verileri kullanılarak Eşitlik 2.12'de yer alan denklik yardımıyla, melatonin/HPβCD inklüzyon komplekslerinin denge kararlılık sabit değerleri hesaplanmıştır. Bulunan kararlık sabitleri (K), melatoninin sudaki çözünürlüğü (L_0) ile inklüzyon kompleksindeki en yüksek melatonin miktarı ($[C_{maks}]$) hesaplanmış ve Çizelge 4.2'de sunulmuştur.

Çizelge 4.2. Farklı mikrodalga koşullarında oluşturulan melatonin/HP β CD inklüzyon komplekslerinin özellikleri.

	Uygulanan güç (Watt)								
	150			600			900		
Uygulanan süre (saniye)	K (M ⁻¹)	L ₀ (M)	[C _{maks}] (M)	K (M ⁻¹)	L ₀ (M)	[C _{maks}] (M)	K (M ⁻¹)	L ₀ (M)	[C _{maks}] (M)
45	-	-	-	-	-	-	39.28	0.0088	0.036
90	17.41	0.0114	0.028	25.31	0.0115	0.035	62.15	0.0085	0.043
180	5.67	0.0081	0.012	-	-	-	37.43	0.0071	0.032

Çizelge 4.2'ye göre; mikrodalga gücünün kompleks oluşumuna etkisinin belirlenmesi için 150, 600 ve 900 Watt mikrodalga gücünde 90 s boyunca çalışılmıştır. Bu çalışmanın sonucunda, elde edilen melatonin/HP β CD inklüzyon komplekslerinin kararlılık sabitleri ile uygulanan mikrodalga gücü arasında doğrusal bir ilişki olduğu görülmüştür. Mikrodalga sürelerinin inklüzyon kompleksi üzerindeki etkisinin belirlenmesi amacıyla 900 W gücünde 45, 90 ve 180 saniyede inklüzyon kompleksleri oluşturulmuştur. Bu çalışmanın sonucundaysa, kompleks oluşumunun 90 saniyede en yüksek kararlılık sabitine ve melatonin konsantrasyonuna ulaştığı belirlenmiştir. Bununla beraber, uygulanan mikrodalga sürelerinde yapılan değişikliklerin elde edilen inklüzyon komplekslerinin kararlılık sabitleri ve melatonin konsantrasyonları üzerinde etkisinin birbirlerine benzer olduğu görülmüştür. Ayrıca, 150 Watt ve 180 saniyede üretilen inklüzyon kompleksinin, aynı mikrodalga gücünde 90 saniyede üretilen komplekse göre daha düşük melatonin konsantrasyonuna ve kararlılık sabitine sahip olduğu görülmüştür. Böylelikle, 45 ve 180 saniye mikrodalga süresi uygulamalarında üretilen inklüzyon kompleksinin kararlılık sabiti ve melatonin konsantrasyonu birbirine benzer olmasından dolayı bu süreler tüm mikrodalga güçlerinde kullanılmamıştır. Sonuç olarak, melatonin/HP β CD inklüzyon kompleksinin mikrodalga yöntemi ile üretileceği en uygun koşulların 900 W, 60°C ve 90 s olduğu bulunmuştur. Optimum mikrodalga koşulundaki kararlılık sabitinin değeri 62.15 M⁻¹, melatoninin suda çözünürlüğü 0.00852 M⁻¹ ve elde edilen en yüksek melatonin konsantrasyonu 0.043 M olarak belirlenmiştir.

Literatürde melatonin/HP β CD inklüzyon komplekslerinin mikrodalga yöntemi ile üretildiği başka bir çalışmaya rastlanılmamıştır. Bu komplekslerin farklı yöntemlerle üretilmesinden hesaplanan kararlılık sabitleri sunulmuştur. Maeda ve arkadaşları tarafından (2014) yapılan çalışmada, oda sıcaklığında 72 saatlik fiziksel karıştırma yöntemi ile elde edilen melatonin/HP β CD inklüzyon komplekslerinin faz çözünürlük diyagramı çizilmiş ve kararlılık sabiti 89 M^{-1} bulunmuştur [9]. Babu ve arkadaşları tarafından (2008) yapılan başka bir çalışmada, oluşturulan melatonin/HP β CD inklüzyon kompleksine ait faz çözünürlük diyagramı kullanılarak komplekse ait kararlılık sabiti 193.6 M^{-1} olarak hesaplanmıştır [10]. Belirtilen çalışmalarda kullanılan HP β CD'nin moleküler ağırlığı ve yer değiştirme dereceleri belirtilmemiştir. Tez çalışmamızda kullanılan HP β CD'nin 1460 g/mol moleküler ağırlığına ve 0.8 M yer değiştirme derecesine sahip olduğu bilinmektedir. Yer değiştirme derecesi arttıkça daha kararlı inklüzyon kompleksleri oluşmaktadır. Çalışılan HP β CD'nin yer değiştirme derecesinin diğer çalışmalarda kullanılan HP β CD'den farklı olması, çalışmamızdan elde edilen inklüzyon kompleksinin kararlılık sabitinin daha düşük olmasına neden olduğu düşünülmüştür. Sunulan tez çalışmasında, melatonin/HP β CD inklüzyon kompleksleri oluşturmak amacıyla kullanılan mikrodalga ve oda sıcaklığında fiziksel karıştırma yöntemleri karşılaştırıldığında; optimum mikrodalga koşullarında elde edilen inklüzyon komplekslerinin daha yüksek miktarda melatonin içerdiği ve oluşturulan inklüzyon komplekslerin daha kararlı olduğu sonucuna varılmıştır. Bununla birlikte, fiziksel karıştırma yoluyla 72 saatte elde edilen inklüzyon kompleksleri mikrodalga yöntemi ile 90 saniye gibi oldukça kısa bir sürede üretilmiştir.

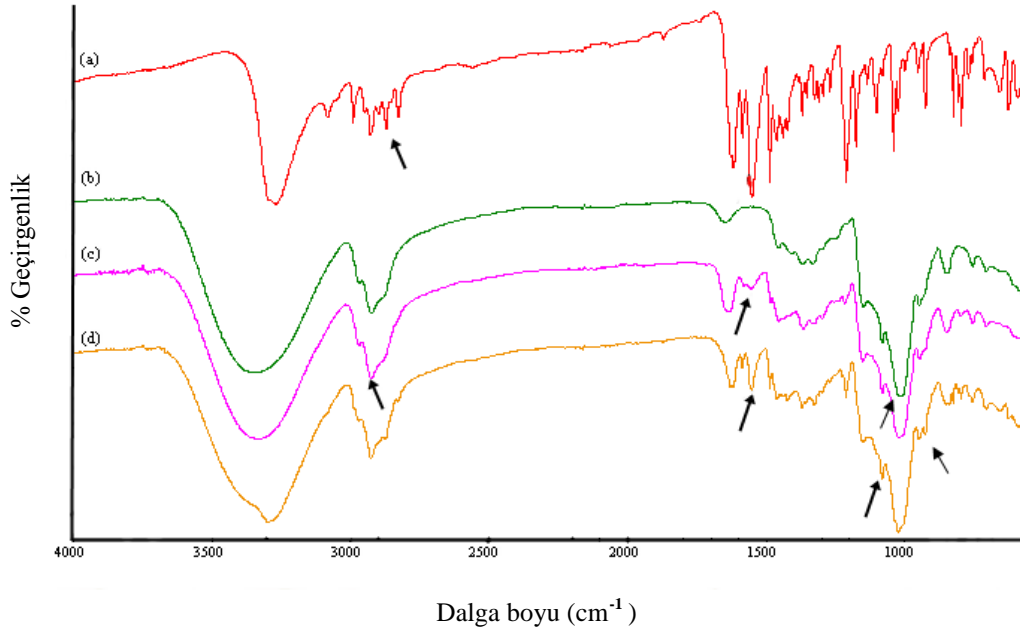
4.1.3. Melatonin/HP β CD inklüzyon kompleksi üretim verimi

Sunulan tez çalışmasında, melatoninin inklüzyon kompleksi üretim verimi $\% 90.32 \pm 4.38$ olarak belirlenmiştir. Bu sonuçtan da anlaşılacağı üzere, melatoninin oldukça yüksek verimde kompleks oluşturduğu görülmüştür.

4.2. Melatonin/HP β CD İnküzyon Komplekslerinin Karakterizasyonları

4.2.1. Fourier dönüşümlü infrared spektroskopisi (FTIR) analizi

Mikrodalga yöntemi ile üretilen melatonin/HP β CD inklüzyon komplekslerinin kimyasal yapısını belirlemek ve inklüzyon kompleks oluşumunu kanıtlamak için saf HP β CD'in, saf melatoninin, melatonin/HP β CD inklüzyon kompleksinin ve melatonin/HP β CD fiziksel karışımının FTIR analizleri yapılmıştır. Örneklerin FTIR spektrumları Şekil 4.3'te gösterilmiştir.



Şekil 4.3. Melatonin/HPβCD inklüzyon kompleksi ve inklüzyon kompleksi bileşenlerine ait FTIR spektrumları: (a) melatonin, (b) HPβCD, (c) melatonin/HPβCD inklüzyon kompleksi ve (d) melatonin/HPβCD fiziksel karışımı.

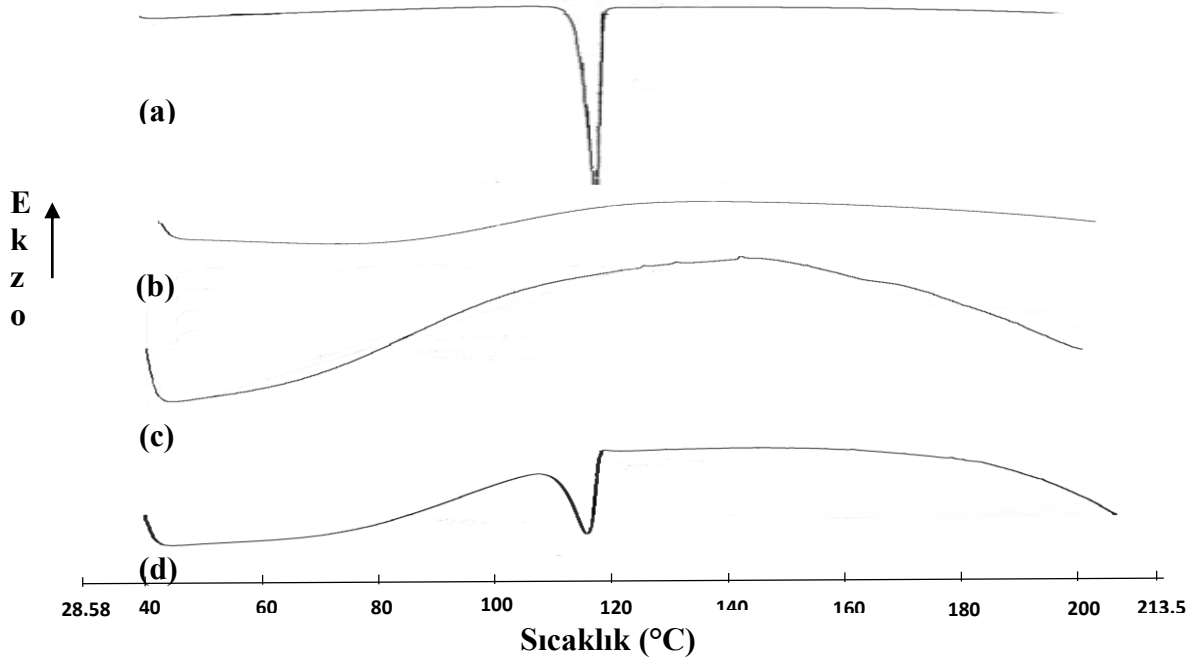
Şekil 4.3(a)'da verilen toz haldeki melatoninin FTIR spektrumuna ait 3305 cm^{-1} 'de görülen pikin amid $-\text{NH}$ gerilme bandına; 3078 cm^{-1} , 2988 cm^{-1} , 2928 cm^{-1} ve 2828 cm^{-1} 'de görülen piklerin $-\text{CH}$ gerilme bantlarına, 1621 cm^{-1} ve 1557 cm^{-1} 'de görülen piklerin amid yapısında bulunan $-\text{C}=\text{O}$ gerilme bantlarına, 1489 cm^{-1} 'de görülen pikin $-\text{NH}_2$ gerilme bandına ve 1309 cm^{-1} 'de görülen pikin ise aromatik $-\text{C}=\text{C}$ bağına ait olduğu bilinmektedir [36]. Şekil 4.3 (b)'de yer alan toz haldeki HPβCD'nin FTIR spektrumunda 3350 cm^{-1} civarındaki geniş pikin $-\text{OH}$ gerilme bandına, 2900 cm^{-1} civarındaki pikin $-\text{CH}$ gerilme bandına, 1450 cm^{-1} civarında piklerin CH_2 ve CH_3 düzlem içi bükülme bantlarına, 1158 cm^{-1} ve 1082 cm^{-1} 'de yer alan piklerin $-\text{C}-\text{O}$ ve $-\text{C}-\text{C}$ gerilme bantlarına ve 945 cm^{-1} 'deki küçük pikin α -1,4 bağlarından kaynaklı gerilme bandına ait olduğu belirlenmiştir [7]. Melatonin/HPβCD fiziksel karışımına ait spektrumun yer aldığı Şekil 4.3(d)'de, kompleksi oluşturan bileşenlere ait karakteristik piklerin varlığı görülürken, inklüzyon kompleksinin FTIR spektrumunun bulunduğu Şekil 4.3 (c)'de bu piklere rastlanmamıştır. Ayrıca bu iki spektrum arasında bazı farklılıklar göze çarpmıştır. Bu farklılıklardan ilki melatoninin $2500\text{-}3000\text{ cm}^{-1}$ dalga boyu aralığındaki karakteristik $-\text{CH}$ piklerinin inklüzyon kompleksine ait spektrumda bulunmamasıdır. Diğer bir farklılık ise, melatoninin 1550 cm^{-1} civarında görülen amid grubuna ait $-\text{C}=\text{O}$ pikinin fiziksel karışıma ait spektrumda görülürken, inklüzyon kompleksine ait spektrumda daha düşük şiddette görülmesidir. HPβCD molekülündeki $-\text{OH}$ fonksiyonel gruplarının etkisiyle, melatoninin 3300

cm^{-1} civarında görülen $-\text{NH}$ gerilme bandına ait piki inklüzyon kompleksine ait spektrumda kaybolmuştur. Melatonine ait $1000\text{-}1200\text{ cm}^{-1}$ 'de bulunan piklere inklüzyon kompleksine ait spektrumda rastlanmamıştır. Fiziksel karışımın FTIR spektrumunda 975 cm^{-1} görülen HP β CD'ne ait küçük bir pikin yanında melatonine ait başka bir pikle de karşılaşılmıştır. Inklüzyon kompleksinin FTIR spektrumunda ise, sadece 975 cm^{-1} görülen HP β CD'ne ait küçük bir pike rastlanmıştır.

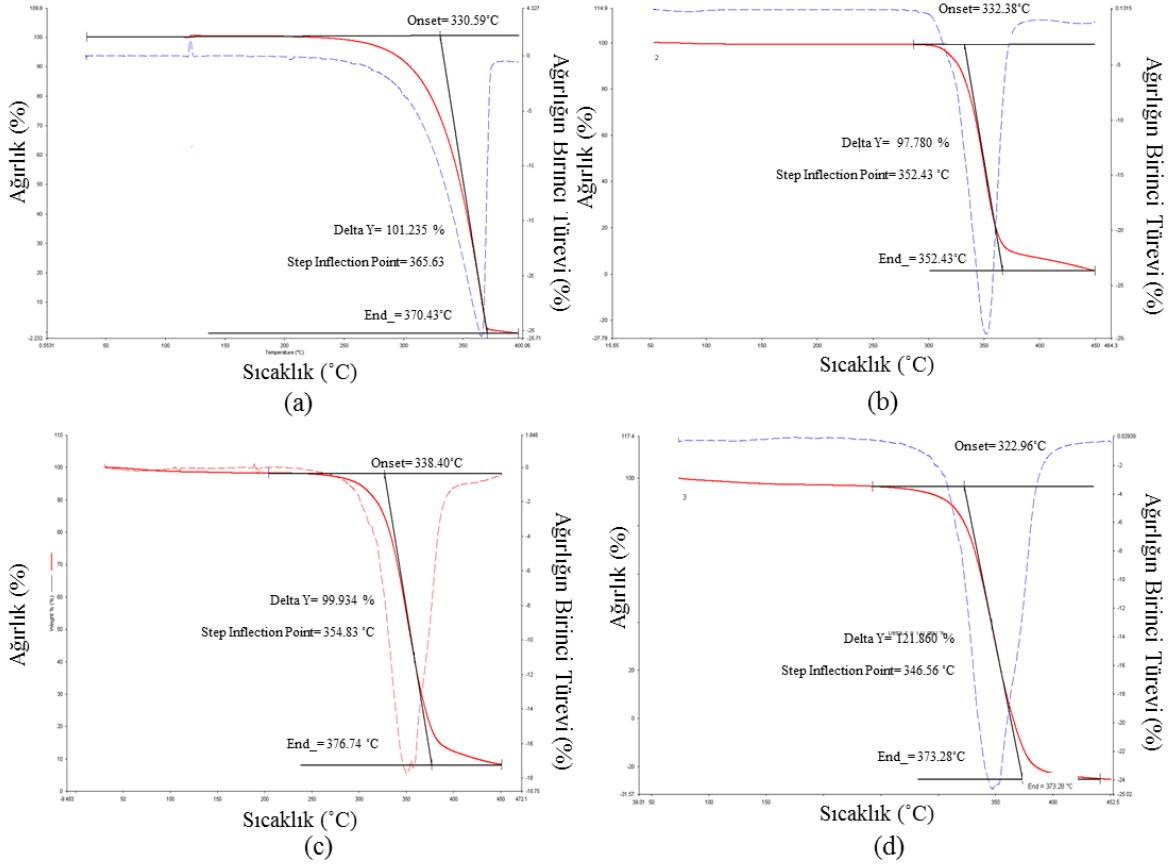
Williams ve arkadaşları (1998) tarafından yapılan çalışmada kolesterol, HP β CD, kolesterol/HP β CD inklüzyon kompleksleri ve kolesterol/HP β CD fiziksel karışımlarına ait FTIR spektrumları verilmiştir. Kolesterol ve HP β CD moleküllerinin yer aldığı FTIR spektrumunda, bu bileşenlerin karakteristik pikleri görülmüştür. Misafir molekül ve siklodekstrinin fiziksel karışımlarına ait FTIR spektrumlarında ise, kompleksi oluşturan bileşenlerin karakteristik pikleri göze çarparken, kolesterol/HP β CD inklüzyon kompleksinde bu piklere rastlanmamıştır [128]. Çalışma kapsamında üretilen melatonin/HP β CD inklüzyon kompleksinin varlığı kalitatif olarak kanıtlanmış ve literatürle desteklenmiştir.

4.2.2. Diferansiyel taramalı kalorimetrik analiz (DSC) ve termogravimetrik analiz (TGA)

Melatonin, HP β CD, melatonin/HP β CD fiziksel karışımları ve melatonin/HP β CD inklüzyon komplekslerine ait DSC ve TGA analiz sonuçları sırasıyla Şekil 4.4'te ve Şekil 4.5'te sunulmuştur.



Şekil 4.4. DSC termogramları: (a) melatonin, (b) HP β CD, (c) melatonin/HP β CD inklüzyon kompleksi ve (d) melatonin/HP β CD fiziksel karışımı.



Şekil 4.5. Termogravimetrik analiz sonuçları: (a) melatonin, (b) HPβCD, (c) melatonin ve HPβCD inklüzyon kompleksi ve (d) melatonin/HPβCD fiziksel karışımı.

Şekil 4.4 (a)'da melatoninin keskin erime piki 119°C'de görülmüştür ve bu değer Avrupa Birliği Sağlık ve Tüketici Güvenliği (2010) tarafından yapılan çalışmayla uyumludur [36, 129]. Şekil 4.4 (b)'de verilen HPβCD molekülüne ait termogramda 80°-120°C arasında görülen geniş pikin siklodekstrin yapısından çıkan su molekülleri ile ilgili olduğu düşünülmüştür. Bu değer, Paula ve arkadaşları (2007) tarafından yapılan DSC çalışmasındaki HPβCD piki ile tutarlıdır [130]. Şekil 4.4 (c)'de yer alan inklüzyon kompleksi termogramında melatonin erime pikinin tamamen kaybolduğu görülmüştür. Melatonin/HPβCD fiziksel karışımına ait DSC termogramının verildiği Şekil 4.4 (d)'de melatonin erime piki 118°C'ye kaymıştır.

Babu ve arkadaşları (2008) tarafından yürütülen çalışmada melatonin/HPβCD inklüzyon komplekslerinin DSC karakterizasyonu yapılmıştır. İlgili çalışmada, oluşturulan melatonin/HPβCD fiziksel karışımında karakteristik melatonin erime pikinin daha düşük bir sıcaklık değerine kaydığı anlatılmıştır. Inklüzyon kompleksine ait spektrumdaysa melatonin erime pikinin kaybolduğu ve geniş pikin şiddetinin arttığı görülmüştür. Inklüzyon kompleksi

termogramında görülen bu değişimin nedeninin melatoninin HP β CD molekülleri ile etkileşiminden kaynaklandığı düşünölmüştür [10].

Paula ve arkadaşlarının (2007) gerçekleştirdiğı çalışmada estradiol/HP β CD inklüzyon komplekslerinin DSC ile karakterize edilmiştir. Geniş siklodekstrin endotermik pikiyle beraber keskin estradiol piki ilgili bileşenlerin spektrumlarında görölmüştür. Estradiol/HP β CD fiziksel karışımında bileşenlerin karakteristik piklerinin estradiole ait erime pikinden daha düşük sıcaklık değerine kaydığı görölmüştür [130].

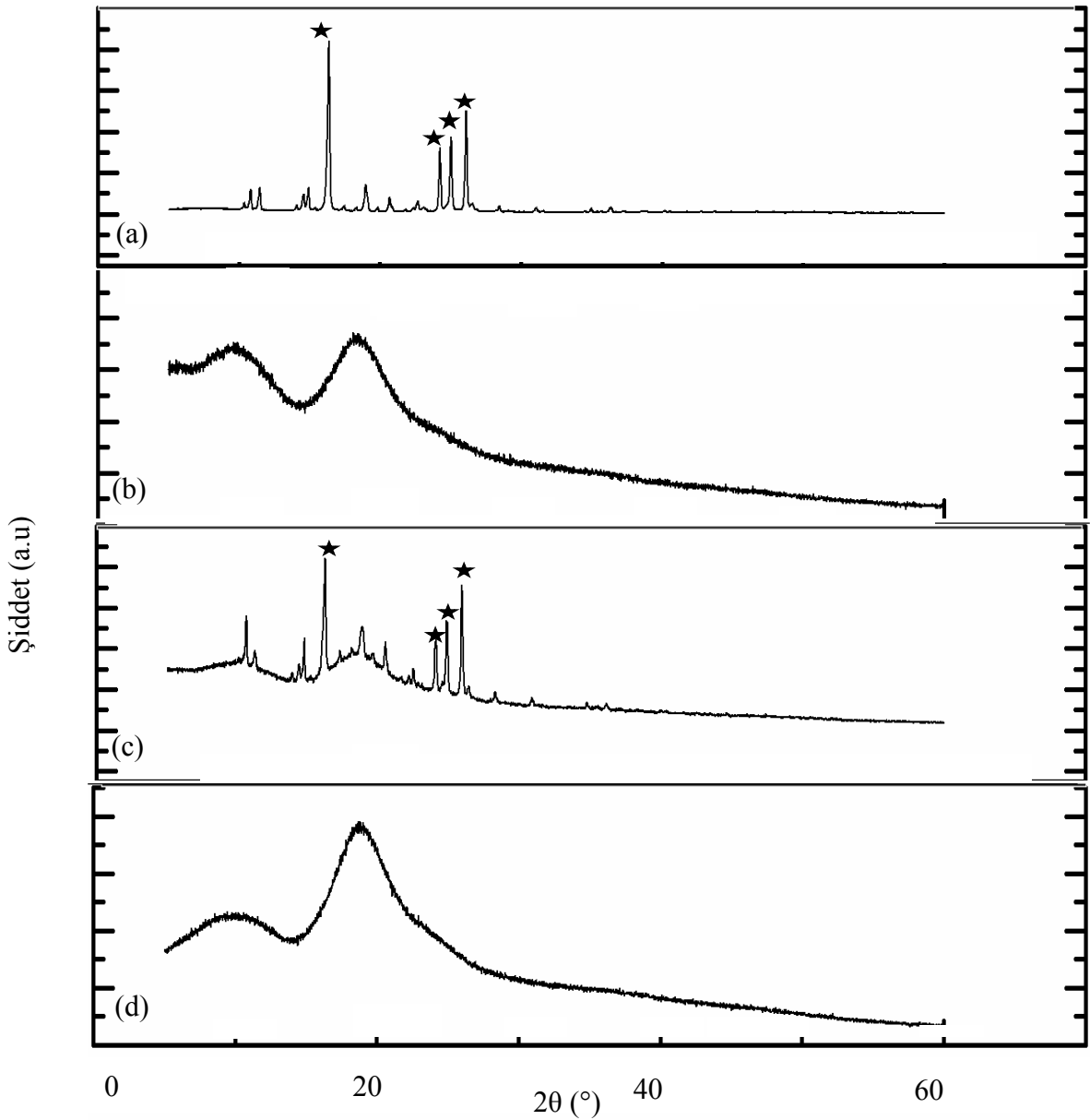
Şekil 4.5'te melatonin, HP β CD, melatonin/HP β CD fiziksel karışımı ve melatonin/HP β CD inklüzyon kompleksine ait termogramlar sunulmuştur. Melatonine ait termogramın yer aldığı Şekil 4.5 (a)'da, melatoninin 331°C civarında bozunduğı görölmüştür. HP β CD'in termogramının bulunduğı Şekil 4.5 (b)'te ise bozunma sıcaklığının 332°C olduğı belirlenmiştir. Melatonin/HP β CD inklüzyon kompleksinin gösterildiğı Şekil 4.5 (c) incelendiğinde, kompleksin bozunma sıcaklığının 338°C'de olduğı görölmüştür. Melatonin/HP β CD fiziksel karışımının gösterildiğı Şekil 4.5 (d)'te ise, serbest haldeki bileşenlerin bozunma sıcaklık aralığında 322°C'de bozunma piki görölmüştür.

Yang ve arkadaşları (2009) tarafından yapılan çalışmada Artemether/HP β CD inklüzyon kompleksinin TGA ile karakterize edilmiştir. Artemether/HP β CD fiziksel karışımının termogramında serbest haldeki bileşenlerin bozunma sıcaklıkları termogramda görölmüştür. Serbest haldeki ilacın bozunma sıcaklıkları inklüzyon kompleksi termogramında görölmüştür [131].

Bu bilgiler ışığında, tez kapsamında gerçekleştirilen çalışmada elde edilen sonuçların literatürle uyumlu olduğı kanıtlanmıştır.

4.2.3. X-Işını kırınım (XRD) analizi

Melatonin/HP β CD inklüzyon kompleksinin oluşumunu ve faz özelliklerini belirlemek için XRD analizi gerçekleştirilmiştir. Melatonin, HP β CD, melatonin/ HP β CD inklüzyon kompleksi ve melatonin/ HP β CD fiziksel karışımına ait XRD spektrumları Şekil 4.5'te gösterilmiştir.



Şekil 4.6. XRD sonuçları: (a) melatonin, (b) HPβCD, (c) melatonin/HPβCD fiziksel karışım ve (d) melatonin/HPβCD inklüzyon kompleksi.

Şekil 4.6 (a)'da verilen XRD grafiğinde, melatonin 17.6°, 24.8°, 25.2° ve 26.2° olmak üzere karakteristik 4 ana pik vermiştir. Şekil 4.6 (b)'deki HPβCD'e ait XRD grafiğinde ise, amorf bir yapıda olan HPβCD'nin 15° ile 25° arasında geniş bir pik verdiği görülmüştür. Melatonin ve HPβCD yapılarına ait belirtilen pik değerleri Hideko ve arkadaşları (2014) tarafından elde edilen XRD değerleri ile benzerdir [9]. Melatonin/HPβCD fiziksel karışımına ait XRD grafiğinin yer aldığı Şekil 4.6 (c)'de, kompleksi oluşturan bileşenlerin karakteristik piklerinin çakıştığı görülmüştür. Bu nedenle, kompleks bileşenlerinin fiziksel karışımına ait XRD spektrumundaki pikler daha düşük şiddette kendini göstermiştir.

Zheng ve arkadaşları (2009) tarafından yapılan çalışmada, quercetin/HP β CD inklüzyon kompleksleri XRD ile karakterize edilmiştir. Misafir molekül ile siklodekstrinin karakteristik pikleri, bileşenlerin fiziksel karışımlarına ait XRD grafiğinde fark edilirken; oluşturulan misafir molekül/siklodekstrin inklüzyon kompleksine ait XRD grafiğinde misafir molekülün karakteristik piklerinin kaybolduğu görülmüştür. Bu da misafir molekülün siklodekstrin ile kompleks oluşturduğunun kanıtıdır [132].

Araujo ve arkadaşları (2007) Pyrimethaninein (PYR) ve HP β CD kullanarak oluşturdukları inklüzyon komplekslerinin varlığını kanıtlamak için XRD karakterizasyon çalışmasını yapmışlardır. Bu çalışmada PYR, HP β CD, PYR/HP β CD fiziksel karışımı ve PYR/HP β CD inklüzyon kompleksi kullanarak analiz gerçekleştirilmiştir. Sonuç olarak; PYR'nin kristal yapıda ve HP β CD'nin amorf yapıda olduğu görülmüştür. PYR/HP β CD fiziksel karışımına ait XRD grafiğinde bileşenlerin karakteristik pikleri görülmüştür. Bu yapıların inklüzyon kompleksine ait XRD grafiğinde oluşan kompleksin geniş pik aralığı, amorf haldeki HP β CD molekülündeki pik aralığında görülürken PYR'nin karakteristik pikleri ile karşılaşılmamıştır [133].

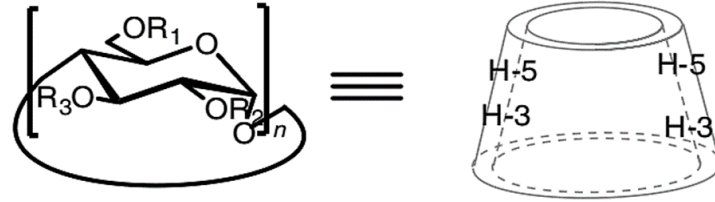
Bongiorno ve arkadaşları (2005), melatonin ile çeşitli doğal siklodekstrinleri kullanarak inklüzyon kompleksleri oluşturmuşlar ve çeşitli enstrümental yöntemler yardımıyla bu kompleksleri analiz etmişlerdir. Yapılan analizlerden biri olan XRD karakterizasyonunda, saf β -siklodekstrin, saf melatonin, melatonin/ β -siklodekstrin fiziksel karışımı ve melatonin/ β -siklodekstrin inklüzyon kompleksi grupları ile çalışmışlardır. Kristal haldeki melatonine ait XRD pikleri yalnızca fiziksel karışıma ait grafikte görülmüştür. Amorf yapısından dolayı saf β -siklodekstrine ait XRD grafiğinde geniş bir pikle karşılaşılmıştır. Inklüzyon kompleksine ait XRD grafiğinde, kristal yapıdaki melatoninin karakteristik piklerinin kaybolduğu ve β -siklodekstrin'in XRD grafiğine benzediği göze çarpmıştır. Sonuç olarak, inklüzyon kompleksine ait XRD grafiğinde saf melatonine ait piklerin görülmemesi amorf bir yapının oluşumuna işaret etmiştir [34].

Verilen tüm bu bilgiler, tez kapsamında gerçekleştirilen XRD analizini desteklemiştir. XRD sonuçları oluşan amorf haldeki melatonin/HP β CD inklüzyon kompleksinin varlığını kanıtlamıştır.

4.2.4. ^1H nükleer manyetik rezonans spektroskopisi (^1H NMR)

^1H NMR analizinde görülen kimyasal kaymaların daha net anlaşılması için HP β CD molekülüne ait numaralandırılmış H atomları Şekil 4.7'de gösterilmiştir. HP β CD'nin ve melatoninin serbest

ve inklüzyon kompleksi halinde meydana gelen kimyasal kaymaların ppm cinsinden değerleri ve bunların değişimleri Çizelge 4.3'te gösterilmiştir.



$n=7$ $R_1=R_2=R_3=CH_2CH(CH_3)OH$ veya H

HPβCD

Şekil 4.7. HPβCD'ne ait H atomlarının numaralandırılması.

Çizelge 4.3. HPβCD'nin ve melatoninin kimyasal kayma değerleri.

HPβCD Proton	δ_{serbest} (ppm)	δ_{kompleks} (ppm)	$\Delta\delta$ ($\delta_{\text{kompleks}}-\delta_{\text{serbest}}$) (ppm)
H1	5.1304	5.1206	-0.0098
H2	3.5022	3.5101	0.0079
H3	3.9019	3.8885	-0.0134
H4	3.3602	3.3566	-0.0036
H5	3.7441	3.7542	0.0101
H6	3.5974	3.5957	-0.0017
Melatonin Proton			
H2	7.0757	7.1064	0.0307
H4	7.0668	7.0752	0.0084
H6	6.7818	6.806	0.0242
H6'	6.7599	6.784	0.0241
H7	7.0757	7.3074	0.2317
H7'	7.0668	7.2867	0.2199
OCH ₃	3.5156	3.5888	0.0732
α	3.3264	3.3566	0.0302
β	2.7971	2.8212	0,0241
NHCOCH ₃	1.0366	1.1787	0.1421

Çizelge 4.3'ün siklodekstrin kısmı incelendiğinde, siklodekstrin boşluğunun iç kısmında yer alan H-3 ve H-5 protonlarının kimyasal kayma değişimleri sırasıyla -0.0134 ppm ve 0.0101 ppm olarak tespit edilmiştir. Siklodekstrine ait tüm kimyasal kayma değişimlerinin arasında H-

3 protonuna ait değişimin en yüksek olduğu belirlenmiştir. Siklodekstrinin dış kısmında bulunan H-1, H-2 ve H-4 protonlarının kimyasal kayma değişimlerinin küçük olduğu görülmüştür. En yüksek kimyasal kayma değerleri siklodekstrin boşluğunun iç kısmında bulunan H-3 ve H-5 protonlarında; daha düşük kimyasal kayma değerlerininse boşluğun dış kısmında yer alan H-1, H-2 ve H-4 protonlarında olduğu dikkat çekmiştir.

Yuan C. ve arkadaşları (2012) tarafından yapılan çalışmada, HPβCD boşluğunun iç kısmında bulunan H-3 ve H-5 protonlarının çevrelerindeki değişimlere oldukça duyarlı oldukları belirtilmiştir. Siklodekstrin dış kısmında yer alan H-1, H-2 ve H-4 protonlarında bu duyarlılığın daha az olduğundan bahsedilmiştir. Bunun sonucu olarak, boşluğun içindeki protonların kimyasal kayma değerlerinin diğerlerine göre daha büyük değişim göstermesi gerektiği düşünölmüştür. Kompleks olduğunda misafir molekülün elektron bulutu etkileştiiği siklodekstrin iç protonunu perdelemiş ve siklodekstrin protonlarını yukarı alana doğru yönlendirerek bir kimyasal kayma oluşturmuştur. Bununla birlikte, diğer iç protonlarla misafir molekülün arasında oluşan Van der Waals kuvvetleri nedeniyle aşağı alana doğru kimyasal kayma görölmesine neden olmuştur [134]. Böylelikle, tez çalışmasının NMR kısmının literatürle tutarlı olduğu kanıtlanmıştır.

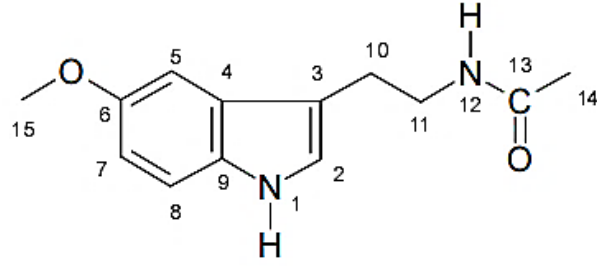
Yang ve arkadaşları (2009) tarafından yapılan çalışmada Artemether ve HPβCD bileşenleriyle inklüzyon kompleksi oluşturulmuştur. Artemether/HPβCD inklüzyon komplekslerinin ¹H NMR analizinde H-3 protonunda kimyasal kaymada görölen değişiminin H-5'tekine göre daha yüksek olduğu fark edilmiştir. Bu yüzden ilaç molekülünün siklodekstrin boşluğuna geniş bölümünden girdiği düşünölmüştür [134]. Sunulan tez çalışmasında da H-3 protonu kimyasal kayması yüksek olduğundan melatoninin HPβCD'e boşluğun geniş kısmından girdiği düşünölmüştür.

Çizelge 4.3'ün melatonin kısmı incelendiğinde, protonların aşağı alana doğru kimyasal kayma gösterdiği belirlenmiştir. Apolar siklodekstrin boşluğu ile etkileşen misafir molekülün kimyasal kaymadaki değişimlerin bu yönde olduğu bilinmektedir [135]. Buna göre melatoninin tüm yapısının siklodekstrin içerisine girdiği düşünölmüştür.

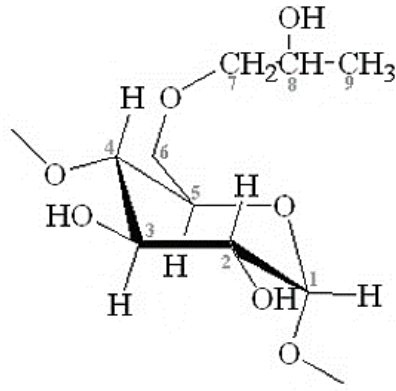
4.2.5. ¹³C nükleer manyetik rezonans spektroskopisi (¹³C NMR)

¹³C NMR analizi, inklüzyon kompleksi olduğunda misafir molekülün siklodekstrin ile kurduğu etkileşim türünü ve boşluk içerisine giren misafir molekül kısmını belirlemektedir [136]. Melatoninin ve HPβCD karbon numaralandırmaları sırasıyla Şekil 4.8'de ve Şekil 4.9'da verilmiştir. Melatonin ve HPβCD moleküllerinin serbest ve inklüzyon kompleksi halinde

meydana gelen kimyasal kaymalarının ppm cinsinden değerleri ve bunların değişimleri Çizelge 4.4'te gösterilmiştir.



Şekil 4.8. Melatonin molekülünde bulunan karbon atomlarının numaralandırılması.



Şekil 4.9. HPβCD molekülünde yer alan karbon atomlarının numaralandırılması.

Çizelge 4.4. HP β CD ve melatoninin ^{13}C NMR kimyasal kayma değerleri.

Melatonin Karbon	δ_{serbest} (ppm)	δ_{kompleks} (ppm)	$\Delta\delta$ ($\delta_{\text{kompleks}} - \delta_{\text{Serbest}}$) (ppm)
C-2	124.3905	123.8873	-0.5032
C-5	112.6531	112.0220	-0.6311
C-7	111.5822	111.3517	-0.2305
C-10	23.9734	24.7321	0.7587
C-11	40.0522	40.0120	-0.0402
C-14	21.7506	21.9783	0.2277
C-15	56.0191	56.4051	0.3860
HP β CD Karbon			
C-6	60.2154	59.9738	-0.2416
C-8	66.3875	66.3755	-0.0120
C-2	71.3970	71.7143	0.3173
C-5	71.7061	72.1852	0.4791
C-3	71.9755	72.8964	0.9209
C-7	76.1025	76.8867	0.7842
C-4	80.7927	80.9085	0.1158
C-1	99.1721	99.5983	0.4262

Çizelge 4.4'e göre, melatonine ait amin ve indol halkasında bulunan karbonlardan C-2, C-5, C-7 ve C-11'de yukarı alana göre kimyasal kayma görülürken C-10, C-14 ve C-15 karbonlarında aşağıya doğru kimyasal kayma olduğu belirtilmiştir. Bu değişim, Inoue ve arkadaşları (1993) tarafından yorumlanan "reaksiyon alan teorisi" ile açıklanmıştır. Bu teoriye göre; misafir molekülün siklodekstrin kısmına giren bölümü yukarı alana doğru bir kimyasal kayma gösterirken, siklodekstrinin geniş kısmında kalan bölümü aşağı alana doğru kaymaktadır [104]. Bu sonuçlar ışığında, melatonin atomları ile HP β CD boşluğunun arasında hidrofobik bir etkileşim olduğu düşünülmektedir. HP β CD'e ait ^{13}C NMR'da kimyasal kaymanın değişiminin yönünden ziyade büyüklüğü önem arz etmektedir. Çizelge 4.4'te verilen HP β CD kayma değerlerine göre, molekülün tüm karbonlarının kimyasal kaymalarında değişim görülürken; C-3, C-6 ve C-7 atomlarına ait kimyasal kaymalarında görülen değişim daha fazladır ve bu da melatonin ile bu karbonların daha iyi etkileştiğini düşündürmektedir.

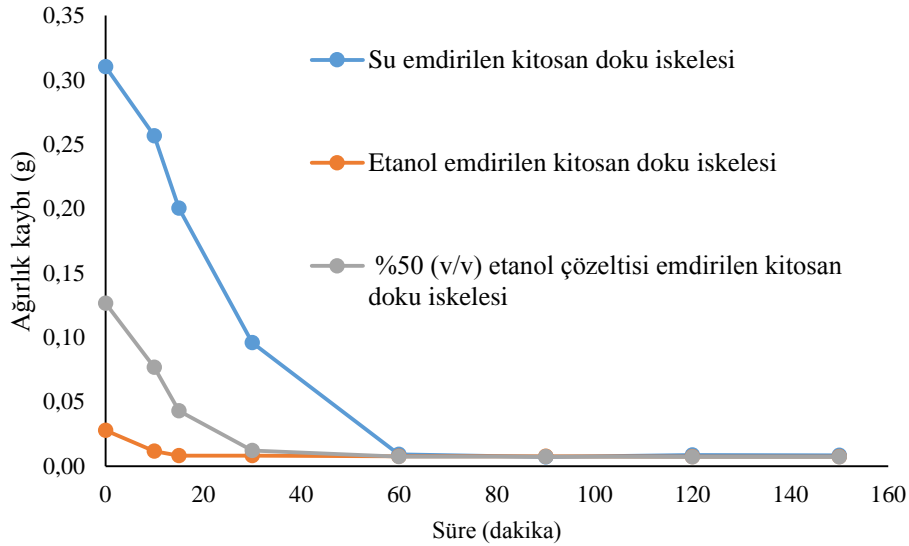
4.3. Melatonin/HP β CD İnküzyon Kompleksinin Kitosan Doku İskelelerine Yükleme Çalışması

4.3.1. Melatonin ve melatonin/HP β CD inküzyon komplekslerinin kitosan doku iskelesine yükleme yönteminin seçilmesi

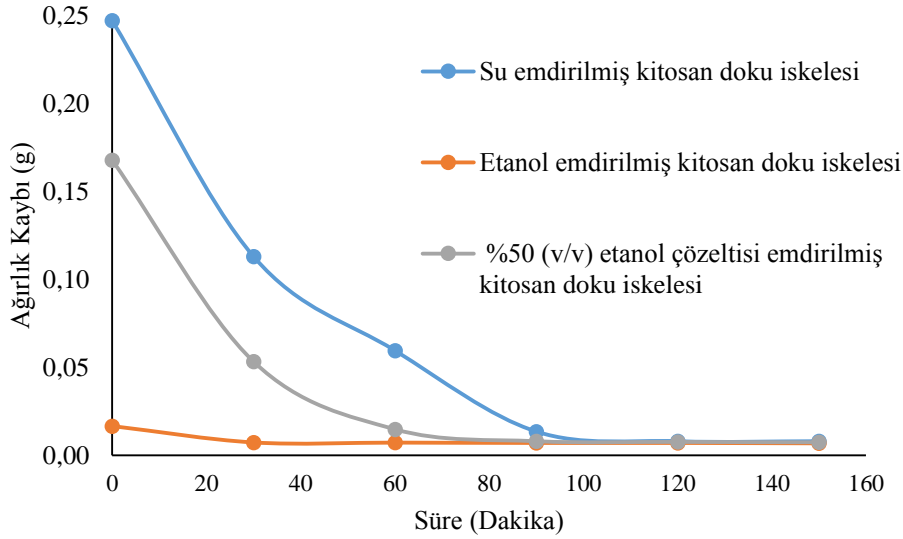
Çalışma kapsamında gerçekleştirilen melatonin ve melatonin/HP β CD inküzyon kompleksleri kitosan doku iskelelerine pipetleme ve daldırma olmak üzere iki farklı yöntemle emdirilmiştir. Pipetleme yönteminde, kitosan iskelelerinin yükleme işlemi sonrasında büzüşerek yapısal bütünlüğünü kaybettiği görülmüştür. Daldırma yönteminde ise yüklenen iskelelerin yapısal bütünlüğünün korunduğu belirlenmiştir. Sonuç olarak, melatonin/HP β CD inküzyon kompleksinin kitosan doku iskelesine daldırma yöntemi ile yüklenmesine karar verilmiştir.

4.3.2. Yüklü iskelelerin kurutma tekniğinin seçimi

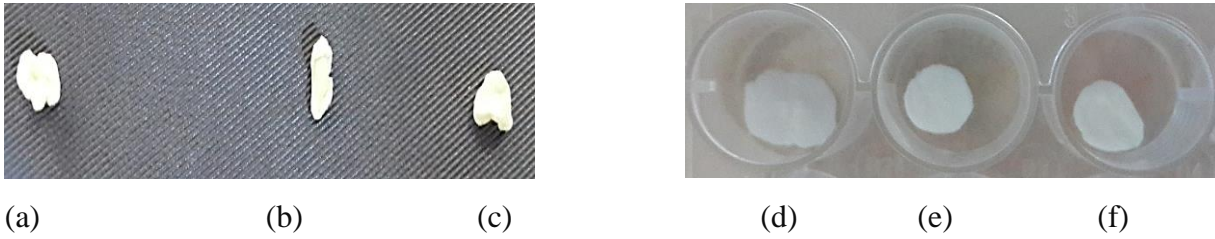
Yapılan tez çalışması kapsamında, melatonin ve melatonin/HP β CD inküzyon kompleksi yüklü kitosan doku iskelelerinin yapısal bütünlüğünün korunması amacıyla uygun bir kurutma yöntemi araştırılmıştır. Bu amaçla; su, etanol ve %50 (v/v) etanol çözeltisi kitosan doku iskelelerine emdirildikten sonra vakum altında ve liyofilizatörde olmak üzere iki farklı şekilde kurutulmuştur. Kurutma işlemi 150 dk boyunca sürmüş ve kurutulan iskelelerin ağırlık kayıpları sırasıyla Şekil 4.10'da ve Şekil 4.11'de verilmiştir. Kurutma işleminin sonrasında elde edilen iskelelerin görüntüleri ise Şekil 4.12'de verilmiştir.



Şekil 4.10. Vakumda kurutulan çözücü yüklü kitosan doku iskelelerinin ağırlık kayıplarını gösteren grafik.



Şekil 4.11. Liyofilizatörde kurutulan yüklü kitosan doku iskelelerinin ağırlık kayıplarını gösteren grafik.

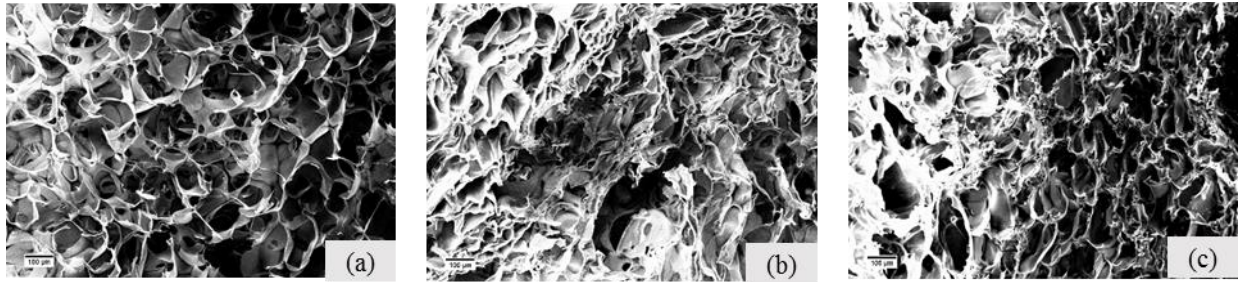


Şekil 4.12. Vakumda kurutulan (a) etanol, (b) su ve (c) %50 (v/v) etanol çözeltisi emdirilen ve dondurarak-kurutulan (d) etanol, (e) su ve (f) %50 (v/v) etanol çözeltisi emdirilen kitosan doku iskelelerinin görüntüleri.

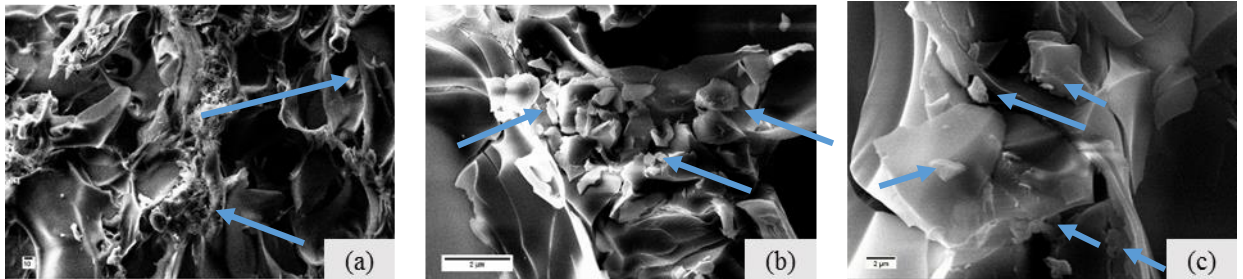
Bölüm 3.5.2.2’de açıklandığı şekilde yürütülen çalışmada, farklı çözücü emdirilen kitosan doku iskeleleri 0 ile 150 dakika arasındaki belli sürelerde tartılmıştır. Bu tartım değerleri yardımıyla iskelelerde görülen ağırlık kayıpları zamana karşılık grafiğe geçirilmiştir. Bununla birlikte, iskelelerdeki yapısal değişimler de görüntülenmiştir. Vakumda kurutulan yüklü kitosan doku iskelelerinin sunulduğu Şekil 4.10’da yüklü kitosan doku iskelelerinin 1 saatte kuruduğu görülürken, liyofilizatörde kurutulan iskelelerinin yer aldığı Şekil 4.11’de bu işlemin yaklaşık 2 saatte tamamlandığı görülmektedir. Şekil 4.12’de vakumda kurutulan iskelelerin büzüştüğü ve yapısal bütünlüğünün bozulduğu görülmektedir. Liyofilizatörde kurutulan iskelelerin ise (Şekil 4.12, d, e ve f) bütünlüğünün korunduğu sonucuna varılmıştır ve yüklü iskelelerin liyofilizatörde kurutulmasına karar verilmiştir.

4.3.3. Yüklü kitosan doku iskelelerinin taramalı elektron mikroskobu (SEM) ile karakterizasyonu

Tez çalışması kapsamında, yüklü kitosan doku iskelelerinin gözenek yapılarının görülmesi ve iskeledeki kompleks varlığının kanıtlanması amacıyla SEM analizi gerçekleştirilmiştir. Boş, vakumda ve dondurularak kurutulmuş melatonin/HP β CD inklüzyon kompleksi yüklü kitosan doku iskelelerinin SEM görüntüleri Şekil 4.13'te sunulmuştur. Ayrıca, dondurularak kurutulmuş melatonin/HP β CD inklüzyon kompleksi yüklü kitosan doku iskelelerinin farklı büyütmelerdeki SEM görüntüleri Şekil 4.14'de sunulmuştur.



Şekil 4.13. Kitosan doku iskelelerinin x 250 büyütmedeki SEM görüntüleri: (a) boş kitosan doku iskelesi, (b) vakumda kurutulmuş inklüzyon kompleksi yüklü kitosan doku iskelesi ve (c) dondurarak-kurutulmuş inklüzyon kompleksi yüklü kitosan doku iskelesi.



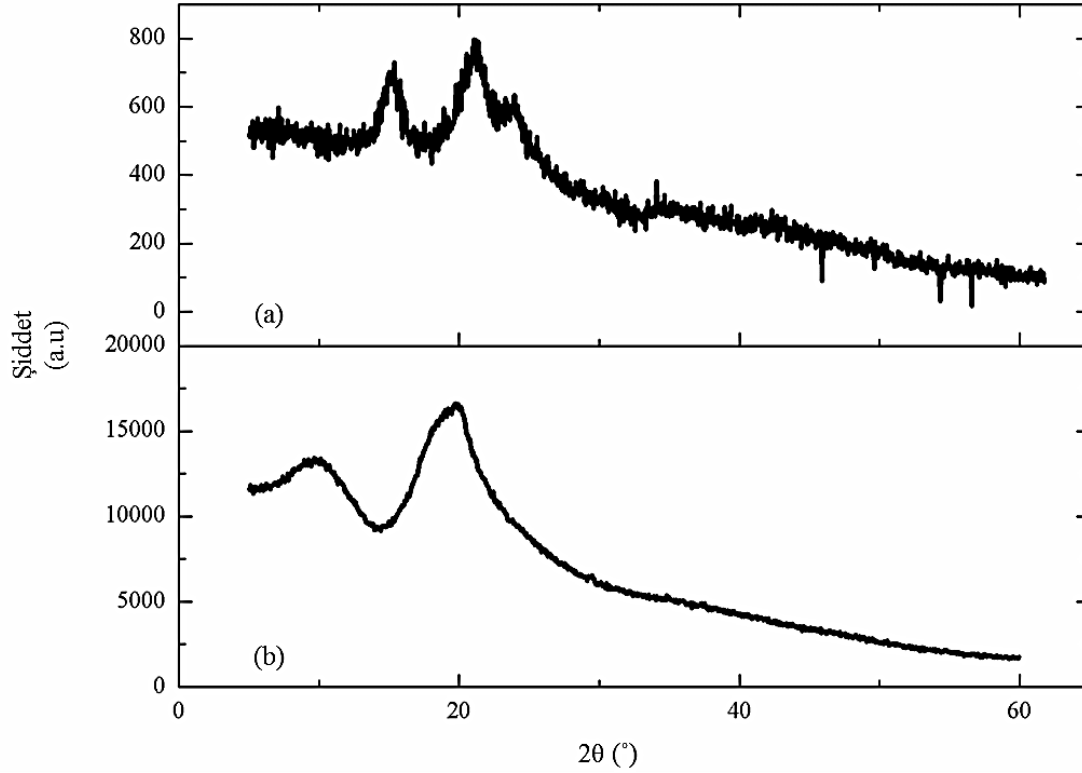
Şekil 4.14. Dondurarak-kurutulmuş melatonin/HP β CD inklüzyon kompleksi yüklü kitosan doku iskelesinin SEM görüntüleri: (a) x 1,000, (b) x 3,000 ve (c) x 10,000.

Şekil 4.13'te bulunan görüntüler incelendiğinde, vakumda kurutulmuş kitosan doku iskelelerinin gözenek çapının boş kitosan iskeleye göre küçüldüğü ve bazı gözeneklerin kapandığı görülmektedir. Dondurarak-kurutulan yüklü kitosan doku iskelesinin gözenek çapının ve içsel bağlantılarının korunduğu gözlenmiştir.

Şekil 4.14'deki dondurarak-kurutulan yüklü kitosan doku iskelelerinin görüntüleri incelendiğinde, iskele gözeneklerinde katı melatonin/HP β CD inklüzyon komplekslerinin bulunduğu görülmüştür. Danciu ve arkadaşları (2014) tarafından yapılan çalışmada da SEM fotoğraflarındaki benzer amorf parçacıkların “kompleks” olduğu yorumu yapılmıştır [137].

4.3.4. Yüklü kitosan doku iskelelerinin XRD ile karakterizasyonu

Melatonin/HP β CD inklüzyon kompleksinin kitosan doku iskelesine yüklenip yüklenmediğini kanıtlamak için XRD analizi gerçekleştirilmiştir. Boş ve inklüzyon kompleksi yüklü kitosan doku iskelelerinin XRD grafikleri Şekil 4.14'te sunulmuştur.



Şekil 4.15. (a) Boş ve (b) melatonin/HP β CD inklüzyon kompleksi yüklü kitosan doku iskelelerinin XRD grafikleri.

Şekil 4.15'e göre, boş kitosan doku iskelesine ait XRD grafiğinde kitosanın karakteristik pikleri 10° ve 20° civarında görülmektedir. Bu karakteristik pikler Qi ve arkadaşları tarafından (2004) yapılan çalışmadaki kitosanın karakteristik XRD pikleri ile uyumludur [138]. Melatonin/HP β CD inklüzyon kompleksinin XRD karakteristik pikleri 20° ile 25° arasında bulunduğu için bu pikler boş kitosan doku iskelesinin XRD pikleri ile çakışmaktadır. Bu nedenle, kompleks yüklü kitosan doku iskelelerinin pik şiddeti boş kitosan doku iskelesinin XRD spektrumuna göre daha yüksektir. Sonuç olarak, yüklü kitosan doku iskelelerindeki inklüzyon kompleksi varlığı kanıtlanmıştır.

4.4. Melatonin ve Melatonin/HP β CD İnküzyon Kompleksinin Kitosan Doku İskelelerine Yükleme Miktarının Belirlenmesi ve *In vitro* Salım Çalışması

4.4.1. Kitosan doku iskelesi başına düşen melatonin ve melatonin/HP β CD inküzyon kompleksi miktarının belirlenmesi

Bölüm 3.5.2.1’de anlatılan daldırma yöntemi kullanılarak serbest melatonin ve melatonin/HP β CD inküzyon kompleksi kitosan doku iskelelerine yüklenmiştir. Yüklenen miktarlar Ek 4’te belirtildiği şekilde hesaplanmıştır. Serbest melatonin ve melatonin/HP β CD inküzyon kompleksi çözünürlüklerinden dolayı sırasıyla etanol ve su içerisinde hazırlanarak kitosan doku iskelelerine yüklenmişlerdir. İskele başına yükleme miktarları Çizelge 4.5’te verilmiştir.

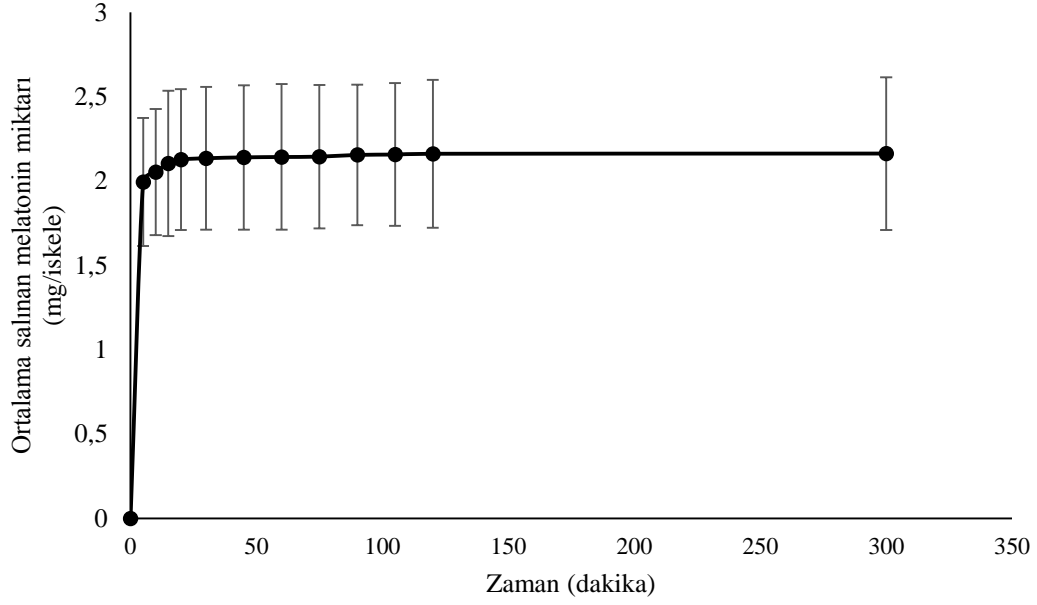
Çizelge 4.5. Farklı çözeltilerdeki melatonin ve melatonin/HP β CD inküzyon komplekslerinin kitosan doku iskelelerine yüklenme miktarları.

Melatonin/HP β CD inküzyon kompleksleri yüklü kitosan doku iskelesi			Melatonin yüklü kitosan doku iskelesi
Yüklenen melatonin miktarı (mg/ iskele)	Etanol	Su	Etanol
	1.67 \pm 0.11	2.58 \pm 0.01	1.53 \pm 0.21
Yüklenen melatonin miktarı (mg/g iskele)	203.66 \pm 14.02	314.63 \pm 0.78	186.58 \pm 25.73

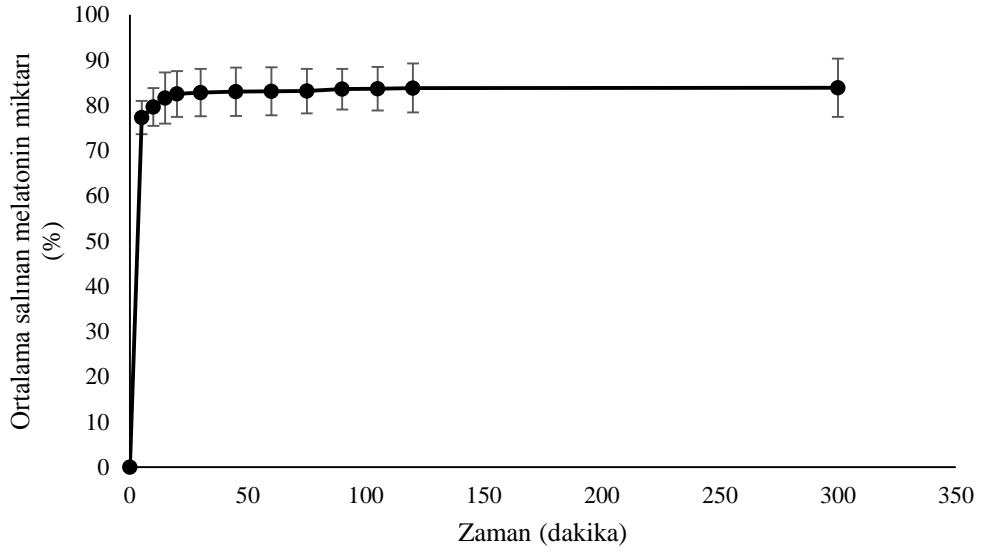
Çizelge 4.5’te verilen bilgiler ışığında, melatonin/HP β CD inküzyon kompleksinin sulu çözeltisinde gerçekleştirilen yükleme veriminin etanole göre daha yüksek olduğu sonucuna varılmıştır. Bunun nedeninin, kitosanın sulu çözeltilerle daha iyi etkileşerek şişmesinden kaynaklandığı düşünülmüştür. Ayrıca, melatonin ve melatonin/HP β CD inküzyon kompleksi yüklü kitosan doku iskeleleri karşılaştırıldığında, iskele başına düşen melatonin miktarının inküzyon kompleksinde daha yüksek olduğu sonucuna varılmıştır. Böylelikle inküzyon kompleksi su içerisinde çözülerek iskelelere yüklenmiştir.

4.5.2. *In vitro* salım çalışması

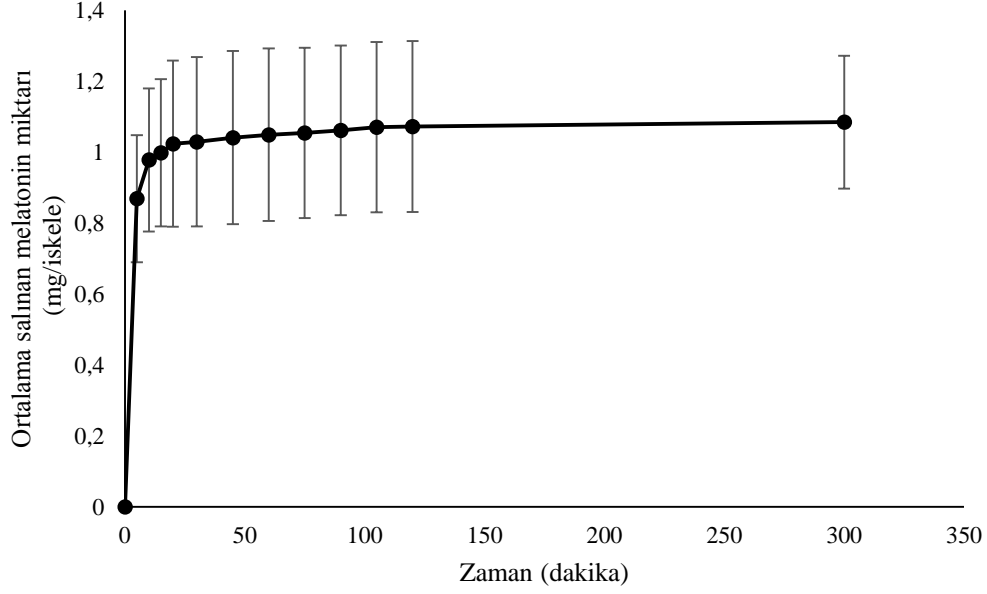
Melatonin ve melatonin/HP β CD inküzyon kompleksi yüklü kitosan doku iskeleleri ile 2 mL PBS ortamında 4 gün süren *in vitro* salım çalışması yapılmıştır. Melatonin/HP β CD inküzyon komplekslerinden salınan kümülatif melatonin miktarı Şekil 4.16’da ve yüzde salımı ise Şekil 4.17’de sunulurken melatonin yüklü kitosan doku iskelesinden salınan kümülatif melatonin miktarı Şekil 4.18’de ve yüzdesi Şekil 4.19’da verilmiştir.



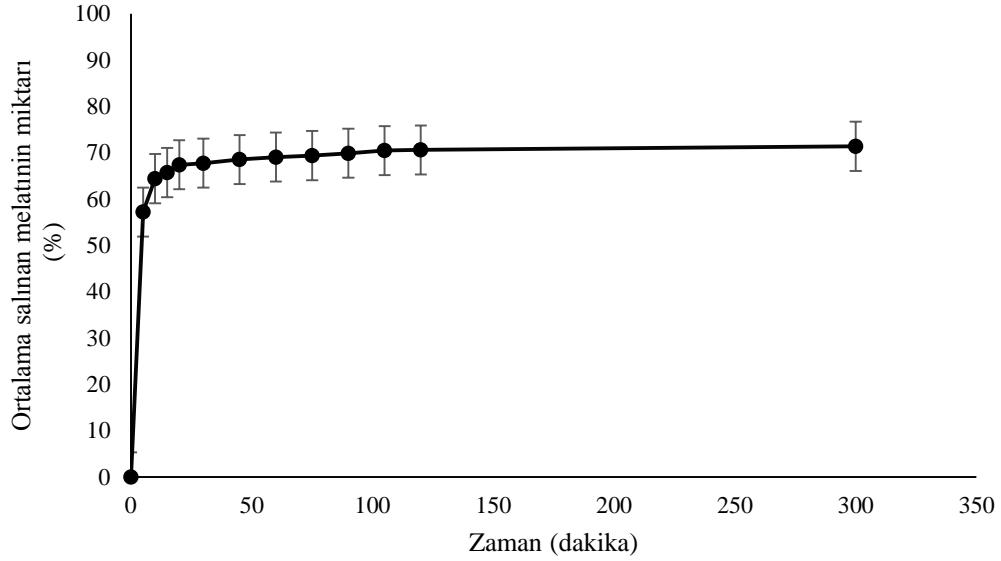
Şekil 4.16. Melatonin/HP β CD inklüzyon kompleksi yüklü kitosan doku iskelelerinden salınan iskele başına düşen melatoninin miktarca kümülatif salım değerleri.



Şekil 4.17. Melatonin/HP β CD inklüzyon kompleksi yüklü kitosan doku iskelelerinden salınan melatoninin yüzde kümülatif salım değerleri.



Şekil 4.18. Melatonin yüklü kitosan doku iskelesinden salınan iskele başına düşen melatonin miktarca kümülatif salım değerleri.



Şekil 4.19. Melatonin yüklü kitosan doku iskelesinden salınan iskele başına düşen melatonin yüzde kümülatif salım değerleri.

Salım çalışmasında, ilk beş saatte melatoninin büyük bir kısmının salındığı görülmüş ve bu yüzden tezin bu kısmında ilk beş saatlik salım grafiklerine yer verilmiştir. Şekil 4.16'da ve Şekil 4.17'de iskelelere yüklenen inklüzyon kompleksinden sırasıyla 2.16 ± 0.452 mg ve %83 melatoninin salındığı görülmüştür. Şekil 4.18'de ve Şekil 4.19'da melatonin yüklü iskelelerden 1.08 ± 0.187 mg ve %71 melatoninin salındığı görülmüştür. Zhang ve arkadaşlarının yaptığı çalışmada hidrofobik ilaçla oluşturulan inklüzyon komplekslerinin doku iskelesinden %80

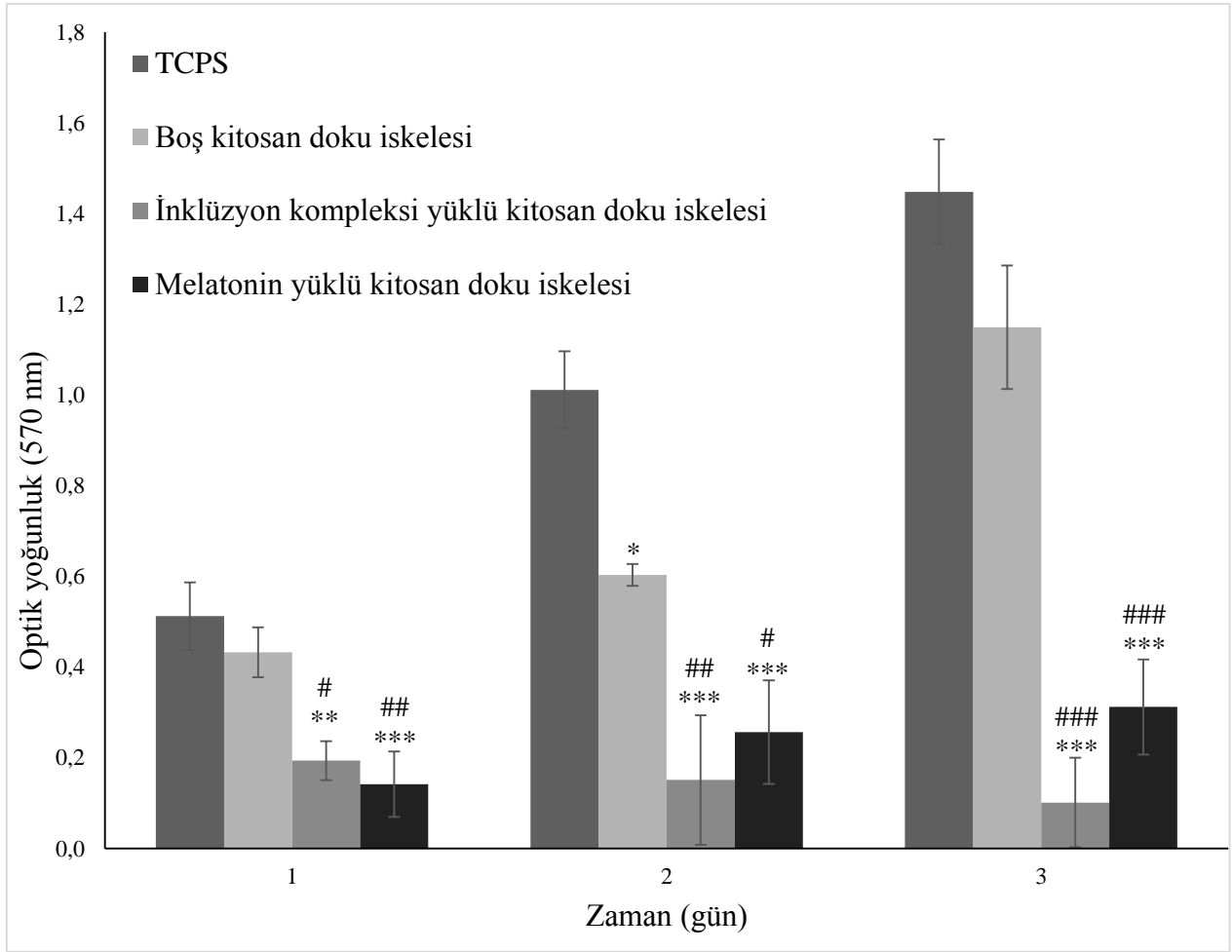
oranında salım yaptığı görülmüştür [139]. Böylece, tez kapsamında gerçekleştirilen bu çalışma, literatür ile tutarlıdır.

Çalışma kapsamında elde edilen bu sonuçlar üretilen inklüzyon kompleksinin melatonin miktarını arttırdığını göstermiştir. Böylelikle aynı salım süresi içerisinde daha fazla miktarda melatonin salımı gerçekleştirilmiştir. Sonuç olarak, melatonin ve melatonin/HP β CD inklüzyon komplekslerinin iskelelerden difüzyon kontrolünde salım gerçekleşmesi nedeniyle hızlı bir salım profili görülmüştür.

4.5. Hücre Kültür Çalışmaları

4.5.1. MTT analizi

Boş, melatonin ve melatonin/HP β CD inklüzyon kompleksi yüklü kitosan doku iskelelerinin MG-63 hücreleri ile etkileştirmek suretiyle gerçekleştirilen çalışmada, tez kapsamında kullanılan bileşenlerin MG-63 hücreleri üzerindeki dolaylı etkileri incelenmiştir. Bu hücrelerin canlılıkları MTT testi ile analiz edilmiş ve elde edilen MTT sonuçları günlere karşılık gelen optik yoğunluk değeri olarak Şekil 4.20’de sunulmuştur.



Şekil 4.20. TCPS, boş kitosan, melatonin/HP β CD kompleks yüklü ve melatonin yüklü kitosan doku iskeleleri ile doğrudan etkileşen MG-63 hücrelerinin MTT sonuçlarını gösteren grafik. (İstatistiksel olarak anlam farklılığı, TCPS kontrol grubu iken, * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$; boş kitosan doku iskelesi kontrol grubu iken; # $p < 0.05$, ## $p < 0.01$, ### $p < 0.001$)

Herhangi bir kitosan doku iskelesi içermeyen TCPS yüzeyi ile boş kitosan doku iskeleleri kontrol grupları olarak seçilmiştir. Şekil 4.20’de yer alan sonuçlara göre, boş kitosan doku iskelesi ile etkileşen hücrelerin aktivitesinde 1. günde azalma görülmüş ve 2. günde bu azalma istatistiksel olarak anlamlı bir fark olarak ifade edilmiştir ($p < 0.005$). Bu azalmanın nedeninin, boş kitosan doku iskelesinin hücreler üzerinde yarattığı mekanik etkilerden dolayı hücrelere yeterli besin ve oksijen sağlanamamasından kaynaklı olduğu düşünülmektedir. Melatonin/HP β CD inklüzyon kompleksi içeren kitosan doku iskelesi grubu ele alındığında, bu gruptaki hücrelerin canlılığının ilk günden itibaren anlamlı bir biçimde azaldığı tespit edilmiştir ($p < 0.01$). Bu azalma ikinci ve üçüncü günlerde artarak devam etmiş ve kontrol grubuna göre istatistiksel olarak anlamlı bir fark gözlenmiştir ($p < 0.001$). Böylelikle inklüzyon kompleksi yüklü iskelelerin MG-63 hücreleri üzerinde inhibe edici etkiye sahip olduğu sonucuna varılmıştır.

Birinci güne ait MTT değerleri incelendiğinde, melatonin yüklü kitosan doku iskelelerinin bulunduğu gruptaki hücre canlılığının kompleks yüklü iskele grubuna göre daha düşük olduğu görülmüştür. Melatonin yüklü iskelenin yer aldığı grubun çalışmanın ikinci ve üçüncü günlerinde kontrol gruplarına göre anlamlı bir azalma görülmüştür ($p < 0.001$). Ancak, melatonin içeren bu grubun birinci gündeki hücre canlılığı ile kıyaslandığında, ikinci ve üçüncü gündeki hücre canlılığındaki artış dikkat çekmiştir.

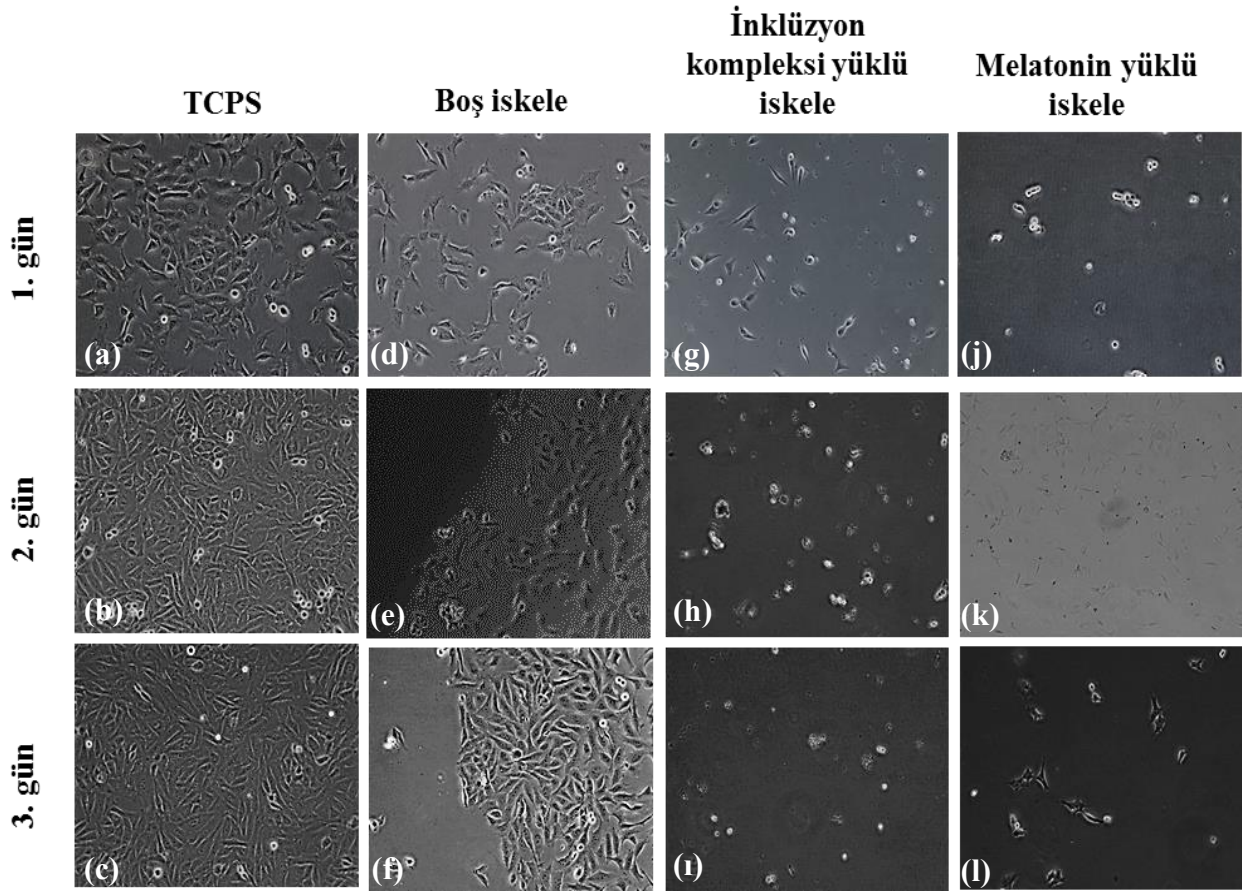
Liu ve arkadaşları (2013) tarafından gerçekleştirilen çalışmada, serbest melatonin doğrudan MG-63 hücreleri ile etkileştirilmiştir. Melatoninin 4 ile 10 mM konsantrasyon aralığında bu hücreler üzerinde apoptotik etkiye sahip iken, 1 nM ile 2 mM konsantrasyon aralığında bu hücrelerin çoğalmalarını desteklediği görülmüştür [4]. MG-63 hücrelerinin aynı zamanda osteoblastik hücre özelliği gösterdiği bilinmektedir, bu nedenle bazı çalışmalarda bu hücreler osteoblastik hücre olarak kullanılmıştır [140, 141]. Melatoninin düşük konsantrasyonlarında MG-63 hücrelerinin çoğaltmasının nedeninin de bu hücrelere osteoblast hücresi gibi etki etmesidir.

Sunulan tez çalışmasında ilk gün salınan melatonin konsantrasyonlarının inklüzyon kompleksi ve melatonin yüklü iskeleler için sırasıyla 9.40 mM ve 4.75 mM olduğu hesaplanmıştır. Elde edilen MTT sonuçlarına göre, melatonin yüklü iskelenin ilk gün hücrelerin bir kısmını inhibe ettiği, ancak ilerleyen günlerde bu hücrelerin çoğalmasına neden olduğu göze çarpmıştır. Kompleks yüklü iskele grubunun ise, ilk günden itibaren hücreleri inhibe ettiği fark edilmiştir. Bunun nedeni, ilk anda hızlıca salınan melatoninin konsantrasyonunun hücreler üzerinde apoptotik etki yapacak kadar yüksekken, ilerleyen günlerde iskeleden daha az salınarak hücrelerin çoğalmasını durduracak konsantrasyona erişememesinden kaynaklı olduğu düşünülmüştür.

Sonuç olarak, kompleks yüklü iskelenin içerdiği melatonin konsantrasyonu kanser hücreleri için hücreleri öldürecek kritik konsantrasyondayken, melatonin yüklü iskeledeki melatonin konsantrasyonu bu hücrelerin çoğalmalarını uzun süre inhibe edemeyecek bir değerdedir.

4.5.2. Invert mikroskop ile analiz

Boş, melatonin ve melatonin/HP β CD inklüzyon kompleksi yüklü kitosan doku iskelelerinin MG-63 hücrelerinin canlılığı ve morfolojileri üzerindeki etkilerinin takibi için alınan optik mikroskop görüntüleri Şekil 4.21'de verilmiştir.



Şekil 4.21. Boş ve yüklü kitosan doku iskeleleri ile etkileştirilen MG-63 hücrelerine ait optik mikroskop görüntüleri: TCPS grubu: (a) 1.gün, 20X; (b) 2.gün, 20X; (c) 3. gün, 20X; boş kitosan doku iskelesi grubu: (d) 1. gün, 20X, (e) 2.gün, 20X; (f) 3. gün, 20X; inklüzyon kompleksi yüklü kitosan doku iskelesi grubu: (g) 1. gün, 20X; (h) 2.gün, 20X; (i) 3. gün, 20X; melatonin yüklü kitosan doku iskelesi grubu: (j) 1. gün,20X; (k) 2. gün, 10X ve (l) 3. gün, 20X.

MG-63 hücreleri yüzeye tutunarak çoğalan fibroblastik hücrelerdir. Şekil 4.21 incelendiğinde, 24 gözlü TCPS kaplarına ekilen MG-63 hücrelerinin üç gün boyunca düzgün bir morfolojide olduğu ve hücrelerin homojen bir şekilde çoğaldığı görülmüştür ve bu grup kontrol grubu olarak belirlenmiştir (Şekil 4.21 (a), Şekil 4.21 (b), Şekil 4.21 (c)). Kontrol grubu ile karşılaştırıldığında, boş kitosan doku iskelesinin bulunduğu kültür kabının ortasında MG-63 hücrelerinin sayıca daha az olduğu dikkat çekmiştir. Bunun nedeninin boş kitosan doku iskelesinin mekanik etkiyle MG-63 hücrelerine oksijen ve besin aktarımlarını engellenmesinden kaynaklı olduğu düşünülmüştür. Diğer bölgedeki hücrelerse morfolojik olarak düzgün, TCPS yüzeyine tutunmuş olduğu gözlenmiştir (Şekil 4.21 (d), Şekil 4.21 (e), Şekil 4.21 (f)). Kompleks içeren doku iskelesinden ortama salınan melatoninin ise ilk günden itibaren hücrelerin morfolojilerini bozduğu anlaşılmıştır (Şekil 4.21 (g), Şekil 4.21 (h) ve Şekil 4.21 (i)). Melatonin içeren doku iskelesinden salınan melatoninin hücreleri ilk gün öldürdüğü

gözlenirken (Şekil 4.21 (j)) 2. ve 3. günlere ait optik mikroskop görüntülerinde ölü hücrelerle birlikte canlı hücrelerde göze çarpmıştır (Şekil 4.21 (k) ve Şekil 4.21 (l)). Elde edilen optik mikroskop görüntüleri MTT sonuçlarıyla uyumlu olduğu görülmüştür.

4.5.3. Akış sitometrisi ile hücre döngü analizi

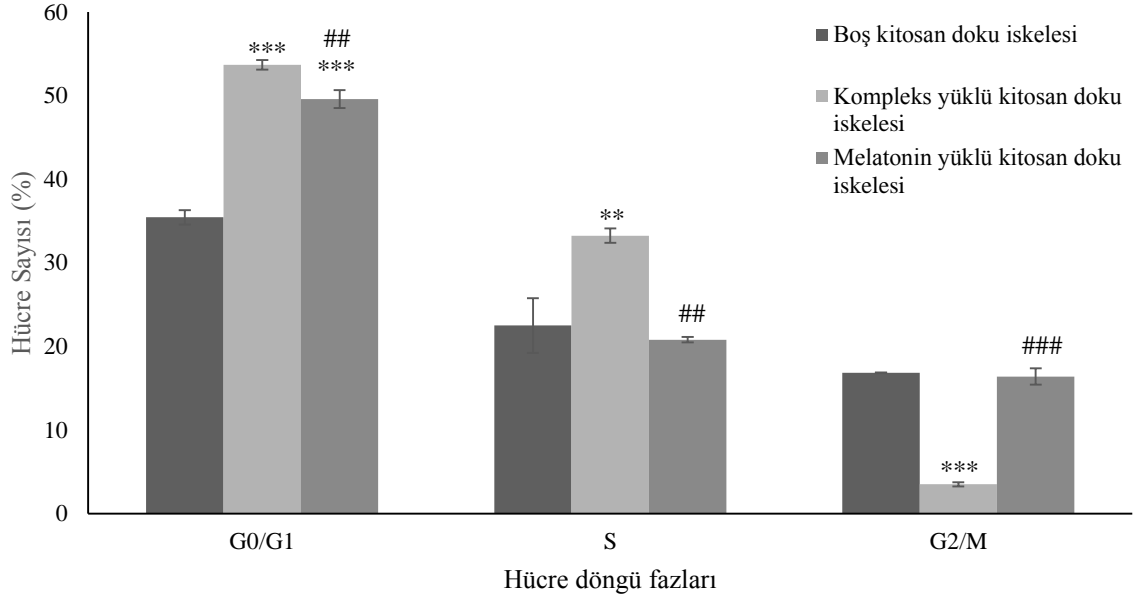
Boş kitosan doku iskelesi, melatonin ve melatonin/HP β CD inklüzyon kompleksi yüklü kitosan doku iskelelerinin MG-63 hücrelerini, hücre döngüsünün hangi fazında inhibe ettiğini belirlemek amacıyla akış sitometrisi cihazında hücre döngü analizi çalışması gerçekleştirilmiştir. Akış sitometrisinden elde edilen sonuçlar hücre döngü fazlarına karşılık gelen yüzde hücre sayısı olarak Çizelge 4.6'da ve Şekil 4.21'de verilmiştir.

Çizelge 4.6. Hücre döngü analizi sonucu elde edilen fazlara göre yüzde hücre sayı dağılımı.

Gruplar	Hücre Sayısı (%)		
	G ₀ /G ₁	S	G ₂ /M
Boş Kitosan İskele	35.45±0.85	22.50±3.26	16.85±0.041
Kompleks Yüklü Kitosan İskele	53.70±0.57	33.25±0.86	3.50±0.24
Melatonin Yüklü Kitosan İskele	49.60±1.06	20.80±0.33	16.40±0.98

Hücre döngü analizinde boş kitosan doku iskelesi grubu kontrol grubu olarak seçilmiştir. Çizelge 4.6'da yer alan hücre döngü analizi sonuçlarına göre; tüm grupların G₀/G₁ fazında bulunan hücre sayısı diğer fazlardaki hücre sayılarından daha yüksektir. Şekil 4.22 incelendiğindeyse, G₀/G₁ fazındaki kompleks ve melatonin içeren iskelelere ait hücre sayılarının kontrol grubundakilere göre önemli derecede anlamlı bir farka sahip olduğu görülmüştür (p<0.001). Ayrıca tüm grupların S ve G₂/M fazları incelendiğinde, kompleks içeren iskele grubunun boş kitosan doku iskelesine göre anlamlı bir fark içerdiği anlaşılmıştır. Kompleks yüklü iskelelerde G₀/G₁ fazına ait hücre sayısına göre S ve G₂/M fazlarına geçen hücre sayılarının az olduğu açıkça görülmüştür (p<0.01 ve p<0.0001). Sonuç olarak, kompleks içeren doku iskelelerinden salınan melatonin G₀/G₁ fazında hücre çoğalmasını inhibe etmiştir. Liu ve arkadaşlarının (2013) yaptığı çalışmanın hücre döngü kısmında apoptotik melatoninin konsantrasyonunda bu hormonun MG-63 hücrelerini G₀/G₁ fazında inhibe ettiği görülmüştür [4]. Reiter ve arkadaşları (2011) tarafından yapılan başka bir çalışmada, 1 mM melatonin

konsantrasyonuna sahip osteoblastik hücre hattının (hFOB) G₀/G₁ fazındaki hücrelerde anlamlı bir artış oluştururken G₂/M fazındaki hücrelerde eş zamanlı olarak düşüğe neden olduğu görülmüştür [142]. Tez kapsamında yürütülen hücre döngü analizi sonuçlarının literatürle uyumlu olduğu görülmüştür.



Şekil 4.22. Boş kitosan, melatonin/HP β CD kompleks yüklü ve melatonin yüklü kitosan doku iskeleleri ile doğrudan etkileşen MG-63 hücrelerinin hücre döngü analizi sonuçlarını gösteren grafik. (İstatistiksel olarak anlam farklılığı, boş kitosan doku iskelesi kontrol grubu iken, * p<0.05, ** p<0.01, *** p<0.001; boş kitosan kontrol grubu iken; # p<0.05, ## p< 0.01, ### p<0.001)

5.GENEL SONUÇLAR

Sunulan tez çalışmasının amacı; melatonin/HP β CD inklüzyon kompleksi yüklü kitosan doku iskelelerinin üretilmesi ve oluşturulan bu yüklü iskelelerin kanserli bölgeye uygulanmasına bağlı olarak melatoninin lokal olarak salımının gerçekleştirilmesidir. Bu amaç doğrultusunda; öncelikle melatonin ve HP β CD'lerin mikrodalga yöntemi ile inklüzyon kompleksleri oluşturulmuş, sonrasında melatonin/HP β CD inklüzyon kompleksinin salım profili incelenmiştir. Üretilen iskelenin, insan kemik kanser hücreleri (MG-63) üzerindeki etkileri belirlenmiş ve elde edilen sonuçlar aşağıda özetlenmiştir.

- Melatonin/HP β CD inklüzyon komplekslerinin oluşturulması amacıyla uygulanan mikrodalga yönteminin optimum koşulları 900 Watt, 60°C ve 90 saniye olarak belirlenmiştir. Bu yöntem oda koşullarında 3 günde elde edilen inklüzyon kompleksinin 90 saniyede oluşturulmasını sağlamıştır. Çalışmada mikrodalga yöntemi ile üretilen inklüzyon komplekslerinin içerdiği maksimum melatonin konsantrasyonu 0.043 M olarak bulunurken oda koşullarında üretilen inklüzyon komplekslerinin içerdiği maksimum melatonin konsantrasyonu 0.036 M olarak bulunmuştur
- Kurutularak katı hale getirilen melatonin/HP β CD inklüzyon komplekslerinin karakterizasyon çalışmaları FTIR, DSC, TGA, XRD ve NMR kullanılarak yapılmıştır. Inklüzyon kompleksin varlığı ifade edilen bu yöntemlerle kanıtlanmıştır.
- Melatoninin HP β CD boşluğuna giriş yönü ve oluşan fiziksel bağların çeşidinin belirlenmesi için gerçekleştirilen ¹H ve ¹³C NMR analizleri sonucunda melatoninin siklodekstrin boşluğuna geniş kısımdan girdiği anlaşılmıştır. Ayrıca melatonin ve siklodekstrin arasında hidrofobik etkileşim görüldüğü tespit edilmiştir.
- Elde edilen melatonin/HP β CD inklüzyon komplekslerinin içerdiği melatonin miktarı UV spektrofotometre yardımıyla belirlenmiş ve kompleks oluşum verimi yaklaşık %90 olarak hesaplanmıştır.
- Inklüzyon kompleksinin ve melatoninin hazırlanan kitosan doku iskelelerine yükleme yönteminin seçimi için denenen yöntemler arasından, iskelelerin yapısal bütünlüğünün korunduğu daldırma yönteminin kullanılmasına karar verilmiştir. Ayrıca, yüklü iskelelerin kurutulması için gerçekleştirilen yöntemler arasından, gözenek çapı korunduğundan dondurarak-kurutma yöntemi seçilmiştir.
- Hazırlanan kitosan doku iskelesine yüklenen melatonin ve melatonin/HP β CD inklüzyon kompleksi miktarları UV spektrofotometre kullanılarak ölçülmüştür. Kitosan doku iskelesine yüklenen melatonin miktarı iskele başına 1.53±0.211 mg ve yüklenen

melatonin/HP β CD inklüzyon kompleksi içeren melatonin miktarıysa 2.58 ± 0.0064 mg olarak belirlenmiştir. Yüklü kitosan doku iskelelerinden melatoninin *in vitro* salım çalışmaları 4 gün boyunca devam etmiştir. Yüklü doku iskelelerden ilk 5 saatte melatoninin hızlı bir şekilde salındığı görülmüştür. Bununla birlikte, ilk 5 saatte kompleks ve melatonin yüklü iskelelerden sırasıyla miktarca 2.16 ve 1.08 mg; yüzdece %83 ve %71 olarak bulunmuştur.

- Yapılan üç günlük MTT çalışmasında, melatonin/HP β CD inklüzyon kompleksleri yüklü kitosan doku iskelelerinin ilk günden itibaren MG-63 hücreleri üzerinde apoptotik etki göstermiştir. Kompleks yüklü iskelelerin etkileştiği bu hücrelerin inhibisyonunun 2. ve 3. günlerde artarak devam ettiği görülmüştür. Melatonin yüklü kitosan doku iskeleleri ilk gün hücrelere apoptotik etki yapmış, ancak ilerleyen günlerde hücre canlılığında artış görülmüştür. Bunun nedeninin iskeleden ortama salınan melatonin konsantrasyonundan kaynaklandığı düşünülmüştür.
- Melatonin ve melatonin/HP β CD inklüzyon kompleksi yüklü iskelelerin MG-63 hücre döngüsünde fazlara olan inhibisyon etkisinin incelenmesi amacıyla gerçekleştirilen akış sitometrisi analizinde, tüm grupların G₀/G₁ fazında durdurduğu görülmüştür. Ancak kompleksin hücreler üzerindeki etkisinin diğer gruplara göre oldukça yüksek olduğu görülmüştür.

Tez kapsamında gerçekleştirilen çalışmalarda, 2.58 mg melatonin içeren melatonin/HP β CD inklüzyon kompleksi bulunan, 9 mm çapında ve 2 mm kalınlığındaki kitosan doku iskelesi sisteminin, *in vitro* koşullarda insan kemik kanser hücrelerini öldürücü ve çoğalmalarını inhibe edici özellikleri olduğu görülmüştür. Verilen bu bilgiler ışığında, bu sistemin uzun süreli insan kemik kanseri tedavisi için kullanılabilir alternatif bir yöntem olduğu gösterilmektedir.

6. KAYNAKLAR

- [1] Ottoviani, G., The epidemiology of osteosarcoma, *Pediatric and Adolescent Osteosarcoma*, (eds: Jaffe, N., Oyvind, S., Bruland, S.B.), Springer, 5-13, **2009**.
- [2] Ottiviani, G., Jaffe, N., Etiology of osteosarcoma, *Clinical Orthopaedics and Related Research*, (eds: Jaffe, N., Bruland, Q.S., Bielack, S.), Springer, 15-32, **2010**.
- [3] Marina, N., Gebhardt, M., Teot, L., Gorlick, R., Biology and therapeutic advances for pediatric osteosarcoma, *The Oncologist*, 9, 422-41, **2004**.
- [4] Lifeng, L., Ying, X., Russel, J.R., Melatonin inhibits the proliferation of human osteosarcoma cell line MG-63, *Bone*, 55, 432-438, **2013**.
- [5] Cos, S., Garcia-Bolado, A., Sanchez-Barcelo, E.J., Direct antiproliferative effects of melatonin on two metastatic cell sublines of mouse melanoma (B16L6 and PG19), *Melanoma Research*, 11, 197-201, **2001**.
- [6] Petranka, J., Baldwin, W., Biermann, J., Jayadev, S., Barrett, J.C., Murphy, E., The oncostatic action of melatonin in an ovarian carcinoma cell line, *Journal Pineal Research*, 26, 129-136, **1999**.
- [7] Misiuk, W., Zalewska, M., Investigation of inclusion complex of trazodone hydrochloride with hydroxypropyl- β -cyclodextrin, *Carbohydrate Polymers*, 77, 482-488, **2009**.
- [8] Astray, G., Gonzalez-Barreiro, C., Mejuto, J.C., Rial-Otero, R., Simal-Gandara, J., A review on the use of cyclodextrins in foods, *Food Hydrocolloids*, 23, 1631-1640, **2009**.
- [9] Maeda, H., Ogawa, Y., Nakayama, H., Inclusion complexes of melatonin with modified cyclodextrins, *Journal of Inclusion Phenomena and Macrocyclic Chemistry* 78, 217-224, 2014.
- [10] Babu, R. J., Dayal, P., Singh, M., Effect of cyclodextrins on the complexation and nasal permeation of melatonin, *Drug Delivery*, 15, 381-388, **2008**.
- [11] Ruddon, R. W., Characteristics of Human Cancer, *Cancer Biology*, (eds: Ruddon, R. W.), Oxford University Press, 3-14, **2007**.
- [12] Casciato, D. A., Lowits, B.B., Principles, Definitions and Statistics, *Manual of Clinical Oncology*, (eds: Casciato D.A., T. M.), 2-18, **2009**.
- [13] Ulukaya, E., Hücre siklusu ve apoptozis, *Akciğer Kanseri Tanı ve Tedavide Temel İlkeler ve Uygulamalar*, (eds: Kayıhan, E., Özyardımcı, N.), 1-15, **2001**.
- [14] Israels, E. D., Israels, L.G., The cell cycle, *The Oncologist Fundamentals of Cancer Medicine*, 5, 510-513, **2000**.
- [15] Park, B. H., Vogelstein, B., Tumor-suppressor genes, *Cancer Medicine*, (eds: Kufe D.W., P. R. E., Weichselbaum R.R., et al.), BC: Decker Inc, 87-105, **2003**.

- [16] Hejmadi, M., How cancer arises, *Introduction to Cancer Biology*, (eds: Hejmadi, M.), 7-16, **2010**.
- [17] Lowe, S.W., Lin, W. A., Apoptosis in cancer, *Carcinogenesis*, 21, 485-495, **2000**.
- [18] Ghobrial, I. M., Witzig, T.E., Adjei, M.D., Targeting Apoptosis Pathways in Cancer Therapy, *CA: A Cancer Journal for Clinicians*, 55, 178-194, **2005**.
- [19] Okun, I., Balakin, K.V., Tkachenko, S.E., Ivachtchenko, A.V., Caspase activity modulators as anticancer agents, *Medical Chemistry*, 8, 322-341, **2008**.
- [20] Majo, J., Cubedo, R., Pardo, N., Treatment of Osteosarcoma a review, *Revista Espanola de Cirugia Ortopedica y Traumatologia*, 54, 329-336, **2010**.
- [21] Geller, D. S., Gorlick, R., Osteosarcoma: A review of diagnosis, management, and treatment strategies, *Clinical Advances in Hematology & Oncology*, 8, 705-718, **2010**.
- [22] Clarke, B., Normal bone anatomy and physiology, *Clinical Journal of American Society of Nephrology*, 3, S131-S139, **2008**.
- [23] Raggatt, L. J., Partridge, N., Cellular and molecular mechanisms of bone remodeling, *Journal of Biological Chemistry*, 285, 25103-25108, **2010**.
- [24] Kansara, M., Teng, M.W., Smyth, M.J., Thomas, D.M., Translational biology of osteosarcoma, *Nature*, 14, 722-735, **2014**.
- [25] Sakamoto, A., Iwamoto, Y., Current status and perspectives regarding the treatment of osteosarcoma: chemotherapy, *Reviews on Recent Clinical Trials*, 3, 228-231, **2008**.
- [26] Society, A. C., Osteosarcoma, *Cancer Facts & Figures*, 1, 1-52, **2015**.
- [27] Hattori, A., Migitaka, H., Masayake, R., Itoh, M., Yamamoto, K., Ohtani-Kaneko, R., Identification of melatonin in plants and its effects on plasma melatonin levels and binding to melatonin receptors in vertebrates., *International Journal of Biochemical and Molecular Biology*, 35, 627-634, **1995**.
- [28] Poeggeler, B., Balzer, I., Hardeland, R., Lerchl, A., Pineal hormone melatonin oscillates also in the dinoflagellate, *Gonyaulax polyedra Naturwissenschaften*, 78, 268-269, **1991**.
- [29] Reiter, R. J., Pineal melatonin: cell biology of its synthesis and of its physiological interactions, *Endocrine Reviews*, 12, 151-180 **1991**.
- [30] Lerner, A. B., Case, J.D., Takahashi, Y., Lee, T.H., Mori, W., Isolation of melatonin in the pineal gland factor that lightens the pinealocytes, *Journal American Chemical Society*, 80, 2587, **1958**.
- [31] Konturek, S. J., Konturek, P.C., Brzozowski, T., Melatonin in gastroprotection against stress-induced acute gastric lesions and in healing of chronic gastric ulcers, *Journal of physiology and pharmacology*, 57, 51-66, **2006**.

- [32] Reiter, R. J., Paredes, S.D., Manchester L.C., Tan, D.X., Reducing oxidative/nitrosative stress: a newly-discovered genre for melatonin, *Critical Reviews in Biochemistry and Molecular Biology*, 44, 175-200, **2009**.
- [33] Johns, J. R., Chenboonthai, C., Johns, N.P., Saengkrasat, A., Kuketpitakwong, R., Porasupatana, S., An intravenous injection of melatonin: formulation, stability, pharmacokinetics and pharmacodynamics, *Journal of Asian Association of School of Pharmacy*, 1, 32-43, **2012**.
- [34] Bongiorno, D., Ceraulo, L., Ferrugia, M., Filizzola, F., Ruggirello, A., Turco, Liveri, V., Inclusion complexes of cyclomaltooligosaccharides (cyclodextrins) with melatonin in solid phase, *Arkivoc*, xiv, 118-130, **2005**.
- [35] Bongiorno, D., Ceraulo, L., Mel, A., Panzeri, W., Selva, A., Turco, Liveri, V., Structural and physicochemical characterization of the inclusion complexes of cyclomaltooligosaccharides (cyclodextrins) with melatonin, *Carbohydrate Research*, 337, 743-754, **2002**.
- [36] Angerer, J., Bernauer, U., Chambers, C., Degen, G., Rastogi, S.C., Sanner, T., White, I.R., Waring R., Engelen, J., *Opinion on melatonin*, SCCS/1315/10, Brussels, **2010**.
- [37] Brown, E. N., Choe, Y., Shanahan, T.L., Czeisler, C.A., A mathematical model of diurnal variations in human plasma melatonin levels, *American Journal of Physiology*, 272, E506-516, **1997**.
- [38] Waldhauser, F., Dietzel, M., Daily and annual rhythms in human melatonin secretion: role in puberty, *Annual of New York Academic Science*, 453, 205-221, **1985**.
- [39] Waldhauser, F., Weiszenbacher, G., Frisch, H., Zeitlhuber, U., Waldhauser, M., Wurtman, R.J., Fall in nocturnal serum melatonin during prepuberty and pubescence, *Lancet*, 1, 362-365, **1984**.
- [40] Zhdanova I.V., L. H. J., Wurtman R.J., Melatonin: a sleep-promoting hormone, *American Sleep Disorders Association and Sleep Research Study*, 20, 899-907, **1997**.
- [41] Cajochen, C., Khalsa, S.B.S., Wyatt, J.K., Czeisler, C.A., Dijk, D.J., EEG and ocular correlates of circadian melatonin phase and human performance decrements during sleep loss, *American Journal of Physiology*, 277, R640-R649, **1999**.
- [42] Krauchi, K., Cajochen, C., Werth, E., Wirz-Justice, A., Functional link between distal vasodilation and sleep-onset latency, *American Journal of Physiology* 278, R741-R748, **2000**.
- [43] Krauchi, K., Cajochen, C., Werth, E., Wirz-Justice, A., Warm feet promote the rapid onset of sleep, *Nature*, 401, 36-37, **1999**.
- [44] Roth, J. A., Kim, B.G., Lin, W.L., Cho, M., Melatonin promotes osteoblast differentiation and bone formation, *The Journal of Biological Chemistry*, 274, 22041-22047, **1999**.

- [45] Sainz, R. M., Mayo, J.C., Reiter, R.J., Antolin, I., Estaban, M.M., Rodriguez, C., Melatonin regulates glucocorticoid receptor: an answer to its antiapoptotic action in thymus, *FASEB J* 13, 1547-1556, **2000**.
- [46] Lissoni, P., Rovelli, F., Frassinetti, A., Furnagalli, L., Oncostatic activity of pineal neuroendocrine treatment with the pineal indoles melatonin and 5-methoxytryptamine in untreatable metastatic cancer patients progressing on melatonin alone, *Neurologic Endocrinological Letters*, 21, **2000**.
- [47] Sainz, R. M., Mayo, J.C., Tan, DX., Reiter, R.J., Antolin, I., Estaban, M.M., Rodriguez, C., Melatonin reduces prostate cancer cell growth leading to neuroendocrine differentiation via a receptor and PKA independent mechanism, *Prostate*, 63, 29-43, **2005**.
- [48] Bella, G., Mascia, F., Gualano, L., Bella, L., Melatonin anticancer effects: review, *International Journal of Molecular Sciences*, 14, 2410-2430, **2013**.
- [49] Reiter, R. J., Tan, D., Mayo, J.C., Sainz, R.M., Leon, J., Czarnocki, Z., Melatonin as an antioxidant: biochemical mechanisms and pathophysiological implications in humans, *Acta Biochimica Polonica*, 50, 1129-1146, **2003**.
- [50] Stasica, P., Paneth, P., Rosiak, J.M., Hydroxyl radical reaction with melatonin molecule: A computational study, *Journal Pineal Research*, 29, 125-7, **2000**.
- [51] Rodriguez, C., Mayo, J.C., Sainz, R.M., Antolin, I., Herrera, F., Martin, V., Reiter, R.J., Regulation of antioxidant enzymes: A significant role for melatonin, *Journal Pineal Research*, 36, 1-9, **2004**.
- [52] Gitto, E., Tan, D.X., Reiter, R.J., Karbownik, M., Manchester, L.C., Cuzzocrea, S., Fulia, F., Barberi, I., Individual and synergistic actions of melatonin: Studies with vitamin E, vitamin C, glutathione and desferoxamine in liver homogenates, *Journal of Pharmacy and Pharmacology*, 53, 1393-401, **2001**.
- [53] Okatani, Y., Wakatsuki, A., Reiter, R.J., Miyahara, Y. , Acutely administered melatonin restores hepatic mitochondrial physiology in old mice, *International Journal of Biochemical Cell Biology*, 35, 367-75, **2003**.
- [54] Poeggeler, B., Saarela, S., Reiter, R.J., Tan, D.X., Chen, L.D., Manchester, L.C., Barlow-Walden, L., Melatonin — a highly potent endogenous scavenger and electron donor: New aspects of the oxidation chemistry of this indole assessed in vitro, *Annals of the New York Academy of Sciences*, 738, 419-420, **1994**.
- [55] Ekmekcioglu, C., Melatonin receptors in humans: biological role and clinical relevance, *Biomed Pharmacother*, 60, 97-108, **2006**.
- [56] Brzezinski, A., Melatonin in human, *The New England Journal of Medicine*, 336, 186-195, **1997**.

- [57] Zlotos, D. P., Jockers, R., Cecon, E., Rivara, S., Enderby, P.A.W., MT1 and MT2 Melatonin Receptors: Ligands, Models, Oligomers, and Therapeutic Potential, *Journal of Medical Chemistry*, 57, 3161-3185, **2014**.
- [58] Sanchez-Barcelo, E. J., Cos, S., Mediavilla, D., Martinez-Campa, C., Gonzalez, A., Alonso-Gonzalez, C., Melatonin-estrogen interactions in breast cancer, *Journal Pineal Research*, 38, 217-222, **2005**.
- [59] Smirnov, A. N., Nuclear melatonin receptors, *Biochemistry (Moscow)*, 66, 19-26, **2001**.
- [60] Calvo, J. R., Gonzalez-Yanes, C., Maldonado, M. D., The role of melatonin in the cells of the innate immunity: a review, *Journal of Pineal Research*, 55, 103-120, **2013**.
- [61] Cavanaugh, J., Witt-Enderby, P. A., CNS melatonin receptors and signaling: focus on aging-related diseases and future perspectives, *Journal of Open Neuroendocrinology* 3, 96-104, **2010**.
- [62] Gümüşderelioğlu, M., Çetin Altındal, D., Drakula hormonu: melatonin, *Bilim ve Teknik*, 562, 24-27, **2014**.
- [63] Panzer, A., Viljoen, M., The validity of melatonin as an oncostatic agent, *Journal Pineal Research*, 22, 184-202, **1997**.
- [64] Robinson, W. A., Dreiling, L., Gonzalez, R., Balmer, C., Treatment of human metastatic malignant melanoma with high dose oral melatonin, *The Pineal Gland and its Hormones*, 277, 219-225, **1995**.
- [65] Margeri, M., Pacini, N., Tani, A., Nosi, D., Squecco, R., Dama, A., Masala, E., Fracini, F., Formigli, L., Combined effects of melatonin and all-trans retinoic acid and somatostatin on breast cancer cell proliferation and death: Molecular basis for the anticancer effect of these molecules, *European Journal of Pharmacology* 681, 34-43, **2012**.
- [66] Trubiani, O., Recchioni, R., Moroni, F., Pizzicannella, J., Caputi, S., Di Primio, R., Melatonin provokes cell death in human B-lymphoma cells by mitochondrial-dependent apoptotic pathway activation, *Journal of Pineal Research*, 39, 425-431, **2005**.
- [67] Martin, V., Herrera, F., Carrera-Gonzalez, P., Garcia-Santos, G., Antolin, I., Rodriguez-Blanco, J., Rodriguez, C., Intracellular signaling pathways involved in the cell growth inhibition of glioma cells by melatonin, *Cancer Research*, 66, 1081-1088, **2006**.
- [68] Mediavilla, M. D., Winczyk, K., Pawlikowski, M., Melatonin increases p53 and p21WAF1 expression in MCF-7 human breast cancer cells *in vitro*, *Life Sciences*, 65, 415-420, **1999**.
- [69] Pizarro, J. G., Yeste-Velasco, M., Esparza, J.L., Verdaguer, E., Pallas, M., Camins, A., Folch, J., The antiproliferative activity of melatonin in B65 rat dopaminergic neuroblastoma cells is related to the downregulation of cell-cycle related genes, *Journal of Pineal Research*, 45, 8-16, **2008**.

- [70] Reiter, R. J., Mechanisms of cancer inhibition of melatonin, *Journal of Pineal Research*, 37, 213-214, **2004**.
- [71] Konakchieva, R., Kyurkchiev, S., Kehayov, I. , Selective effect of methoxyindoles on the lymphocyte proliferation and melatonin binding to activated human lymphoid cells, *Journal of Neuroimmunology*, 63, 125-132, **1995**.
- [72] Sharma, D., Soni, M., Kumar, S., Gupta, G.D., Solubility enhancement-eminent role in poorly soluble drugs, *Research Journal of Pharmacy and Technology*, 2, 41-51, **2009**.
- [73] Vogt, M., Kunath, K., Dressman, J.B., Dissolution enhancement of fenofibrate by micronization, cogrinding and spray-drying: comparison with commercial preparations, *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics*, 68, 283-288, **2008**.
- [74] Chiou, W. L., Riegelman, S., Pharmaceutical applications of solid dispersion systems, *Journal of Pharmaceutical Science*, 60, 1281-1302, **1971**.
- [75] Serajuddin, A. T. M., Solid dispersion of poorly water-soluble drugs: early promises, subsequent problems and recent breakthroughs, *Journal of Pharmaceutical Science*, 15, 1058-1066, **1999**.
- [76] Rainbow, B. E., Nanosuspensions in drug delivery, *Nature Reviews Drug Discovery*, 3, 785-796, **2004**.
- [77] Prabhakar, C., Krishna, K.B., A Review On Nanosuspensions In Drug Delivery *International Journal of Pharma and Bio Sciences*, 2, 550-558, **2011**.
- [78] Savjani, K., Gajjar, A.K., Savjani, J.K., Drug solubility: Importance and Enhancement Techniques, *ISRN Pharmaceutics*, 2012, 1-10, **2012**.
- [79] Szejtli, J., Introduction and general overview of cyclodextrin chemistry, *Chemical Reviews*, 98, 1743-1753, **1998**.
- [80] Loftsson, T., Brewster, M.E., Pharmaceutical applications of cyclodextrins: Drug solubilization and stabilization, *Journal of Pharmaceutical Science* 85, 1017-1025, **1996**.
- [81] Atwood, J. L., Davies, J.E.D., Macnicol, D.D., Vogtle, F., Supramolecular chemistry in cyanometallate systems, *Comprehensive Supramolecular Chemistry*, (eds: Iwamoto, T.), Pergamon Press, 643-690, **1996**.
- [82] Khan, A. R., Forgo, P., Stine, K.J., D'Souza, V.T., Methods for selective modifications of cyclodextrins, *Chemical Reviews*, 98, 1977-1996, **1998**.
- [83] Hattari, K., Ikeda, H., Modification reactions of cyclodextrins and the Chemistry of modified cyclodextrins, *Cyclodextrins and Their Complexes*, (eds: G, V.), Company of KGaA, 31280, **2006**.

- [84] Kandoth, N., Choudhury, S.D., Mukherejee, T., Pal, H., Host-guest interaction of 1,4-dihydroxy-9,10-anthraquinone (quinizarin) with cyclodextrins, *Photochemical & Photobiological Sciences*, 2009, 82-90, **2008**.
- [85] Loftsson, T., Jarho, P., Másson, M., Järvién, T., Cyclodextrins in drug delivery, *Expert Opinion Drug Delivery*, 2, 335-351, **2005**.
- [86] Valentino, J. S., He, Q., Cyclodextrins, *Toxicologic Pathology*, 36, 30-42, **2008**.
- [87] Schonbeck, C., Westh, P., Madsen, J.C., Larsen, K.M., Stade, L.W., Holm, R., Hydroxypropyl-Substituted β -Cyclodextrins: Influence of Degree of Substitution on the Thermodynamics of Complexation with Tauroconjugated and Glycoconjugated Bile Salt, *Langmuir*, 26, 17949-17957, **2010**.
- [88] Gould, S., Scott, R.C., 2-Hydroxypropyl- β -cyclodextrin (HP- β -CD): A toxicology review, *Food and Chemical Toxicology*, 43, 1451-1459, **2005**.
- [89] Nitalikar, M. M., Sakarkar, D., Parag, V.J., The cyclodextrins: a review, *Journal of Current Pharmaceutical Research*, 10, 01-06, **2012**.
- [90] Liu, L., Guo, Q.X., The driving forces in the inclusion complexation of cyclodextrins, *Journal of Inclusion Phenomena and Macrocyclic Chemistry*, 42, 1-14, **2002**.
- [91] Szejtli, i. J., Utilization of cyclodextrins in industrial products and processes, *Journal of Materials Chemistry*, 7, 575-587, **1997**.
- [92] Brewster, M. E., Loftsson, T., Cyclodextrins as pharmaceutical solubilizers, *Advanced Drug Delivery*, 59, 645-666, **2007**.
- [93] Duchene, D., Cyclodextrins and their inclusion complexes, *Cyclodextrins in Pharmaceuticals, Cosmetics and Biomedicine: Current and Future Industrial Applications*, (eds: Bilensoy, E.), John Wiley & Sons, 1-18, **2011**.
- [94] Del Valle, E. M., Cyclodextrins and their uses: a review, *Process Biochemistry*, 39, 1033-1043, **2004**.
- [95] Arias, M. J., Moyano, J.R., Gines, J.M., Investigation of the triamterene- β -cyclodextrin systems prepared by co-grinding, *International of Pharmaceuticals*, 153, 181-189, **1997**.
- [96] Otero-Espinar, F. J., Anguiano-Igea, S., Garcia-Gonzalez, N., Vila-Jato, J.L., Blanco-Mendez, J., Interaction of naproxen with β -cyclodextrin in solution and in the solution state, *Drug Delivery Industrial Pharmacy Journal*, 79, 149-157, **1992**.
- [97] Mura, P., Fauci, M.T., Parrini, P.L., Furlanetto, S., Pinzauti, S., Influence of the preparation method on the physicochemical properties of ketoprofen-cyclodextrin binary systems, *International Journal of Pharmacy*, 179, 117-128, **1999**.

- [98] Loftsson, T., Ölafsdóttir, Ö., Fridriksóttir, H., Gudmundsson, Ö., Cyclodextrin complexation of NSAIDs: physicochemical characteristics, *European Journal of Pharmaceuticals Science*, 1, 95-101, **1993**.
- [99] Pitha, J., Hoshino, T., Effects of ethanol on formation of inclusion complexes of hydroxypropylcyclodextrins with testosterone or with methyl orange, *International Journal of Pharmacy*, 80, 243-251, **1992**.
- [100] Doijad, R. C., Kanakal, M.M., Manvi, F.V., Effect of processing variables on dissolution and solubility of piroxicam: Hydroxypropyl- β -cyclodextrin inclusion complexes, *Short Communication*, 69, 323-326, **2007**.
- [101] Tayade, P., Rajendrakumar, K., Study of freeze-dried quercetin–cyclodextrin binary systems by DSC, FT-IR, X-ray diffraction and SEM analysis, *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analyses*, 34, 333-339, **2003**.
- [102] Patil, J. S., Kadam, D.V., Marapur, S.C., Kamalapur, M.V., Inclusion complex system; a novel technique to improve the solubility and bioavailability of poorly soluble drugs: A review, *International Journal of Pharmaceutical Sciences Review and Research* 2, 29-34, **2010**.
- [103] Szejtli, J., Davies, J.E.D., Cyclodextrins, *Cyclodextrin Technology* (eds: Davies, J. E. D.), *Inclusion Science*, 1-78, **1988**.
- [104] Wen, X., Tan, F., Jing, Z., Liu, Z. , Preparation and study of the 1:2 Inclusion Complex of Carvedilol with β -Cyclodextrin, *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, 34, 517-523, **2004**.
- [105] Higuchi, T., Connors, K., A phase solubility techniques, *Advanced Analytical Chemistry and Instrumentation*, 4, 117-212, **1965**.
- [106] Brochsztain, S., Politi, M.J., Solubilization of 1,4,5,8-naphthalenediimides and 1,8-naphthlimides through the formation of novel host-guest complexes with α -cyclodextrin, *Langmuir*, 15, 4486-4494, **1999**.
- [107] Valle, D., Cyclodextrins and their uses: a review, *Process Biochemistry*, 39, 1033-1046, **2004**.
- [108] Brewster ME, L. T., Cyclodextrins as pharmaceuticals solubilizers, *Advanced Drug Delivery Review*, 59, 645-666, **2007**.
- [109] Gao, S., Wang, L., Application of cyclodextrin in environmental science, *Huanjing Kexue Jinzhan*, 24, 67-70, **1998**.
- [110] Hedges, R. A., Industrial applications of cyclodextrins, *Chemical Reviews* 98, 2035-2044, **1998**.
- [111] Khaoulani, S., Chaker, H., Cadet, C., Bychkov, E., Cherif, L., Bengueddach, A., Fourmentin, S., Wastewater treatment by cyclodextrin polymers and noble metal/mesoporous TiO₂ photocatalysts, *Comptes Rendus Chimie*, 18, 23-31, **2015**.

- [112] Sumiyoshi, H., Utilization of inclusion complexes with plant components for food, *Nippon Shokukin Shinsozai Kenkyukaishi*, 2, 109-114, **1999**.
- [113] Szente, L., Szejtli, J., Cyclodextrins as food ingredients, *Trends in Food Science & Technology*, 15, 137-142, **2004**.
- [114] Buschmann, H. J., Schollmeyer, E., Applications of cyclodextrins in cosmetic products: A review, *Journal of Cosmetics Science*, 53, 185-191, **2002**.
- [115] Köhler, P., Petersen, R.D., Borchert, S., Stabilization of tea tree oil, *SÖFW Journal* 125, 10-12, **1999**.
- [116] Castillo, J. A., Canales, J.P., Garcia, J.J., Lastres, J.L., Bolas, F., Torrado, J.J., Preparation and characterization of albendazole beta-cyclodextrin complexes, *Drug Development and Industrial Pharmacy*, 25, 1241-1248, **1999**.
- [117] Yoo, S. D., Yoon, B.M., Lee, H.S., Lee, K.C., Increased bioavailability of clomipramine after sublingual administration in rats, *Journal of Pharmaceutical Sciences*, 88, 1119-1121, **1999**.
- [118] Miyake, K., Arima, H., Hiramaya, F., Yamamoto, M., Horikawa, T., Sumiyoshi, H., Noda, S., Uekama, K., Improvement of solubility and oral bioavailability of rutin by complexation with 2-hydroxypropylbeta-cyclodextrin, *Pharmaceutical Development and Technology*, 5, 399-407, **2000**.
- [119] Gümüşderelioğlu, M., Başbağ, B., Şimşek, M., Güner, A., Poly(HEMA)/Cyclodextrin-based hydrogels for subconjunctival delivery of Cyclosporin A, *Journal of Applied Polymers Science*, 40397, 1-9, **2014**.
- [120] Tiwari, G., Tiwari, R., Rai, A.K., Cyclodextrin in delivery systems: applications, *Journal of Pharmacy & Bioallied Sciences*, 2, 72-79, **2010**.
- [121] Thostenson, E. T., Chou, T.W., Microwave processing: fundamentals and applications, *Composites Part A*, 30, 1055-1071, **1999**.
- [122] Bogdal, D., Prociak, A., Microwave-Enhanced Polymer Chemistry and Technology, John Wiley & Sons, **2008**.
- [123] Gümüşderelioğlu, M., Kaynak, G., Mikrodalgalar ve uygulamaları, *Bilim ve Teknik* 536, 38-42, **2012**.
- [124] Zhao, D., Liao, K., Ma, X., Yan, X., Study of the supramolecular inclusion of β -cyclodextrin with andrographolide, *Journal of Inclusion Phenomena and Macrocyclic Chemistry*, 43, 259-264, **2002**.
- [125] Tıǧlı, R. S., Karakeçili A., Gümüşderelioğlu, M., In vitro characterization of chitosan scaffolds: influence of composition and deacetylation degree, *Journal of Material Science: Material in Medicine*, 18, 1665-1674, **2007**.

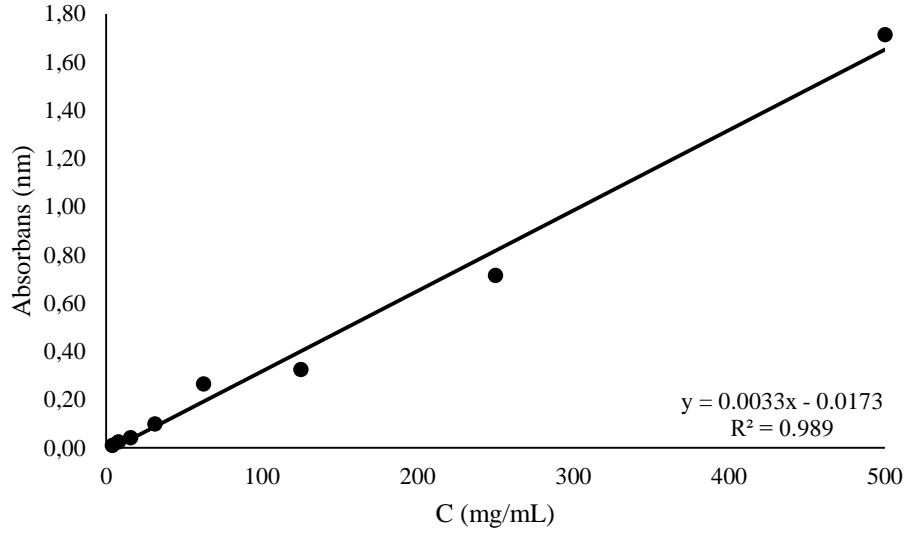
- [126] Cardinali, D. P., Ladizesky, M.G., Boggio, V., *et al*, Melatonin effects on bone: experimental facts and clinical perspectives, *Journal of Pineal Research*, 34, 81-87, **2003**.
- [127] Pose-Vilarnovo, B., Perdomo-López, I., Echezarreta-López, M., Schroth-Pardo, P., Estrada, E., & Torres-Labandeira, J. J., Improvement of water solubility of sulfamethizole through its complexation with β - and hydroxypropyl- β -cyclodextrin: Characterization of the interaction in solution and in solid state., *European Journal of Pharmaceutical Sciences*, 13, 325-331, **2001**.
- [128] Williams, I. I. I., Robert, O., Mahaguna, V., Sriwongjanya, M., Characterization of an inclusion complex of cholesterol and hydroxypropyl- β -cyclodextrin, *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics*, 46, 355-360, **1998**.
- [129] Lee, B. J., Choi, H.G., Kim, C.K., Parrott, K.A., Ayres, J.W., Sack, R.L., Solubility and stability of melatonin in propylene glycol and 2-Hydroxypropyl- β -cyclodextrin vehicles *Archives of Pharmacal Research*, 20, 560-565, **1997**.
- [130] Paula, D. D., Oliveira, D.C.R., Tedesco, A.C., Bentley, M.V.L.B., Enhancing effect of modified beta-cyclodextrins on *in vitro* skin permeation of estradiol, *Brazilian Journal of Pharmaceuticals Sciences*, 43, 111-120, **2007**.
- [131] Yang, B., Lin, J., Chen, Y., Liu, Y., Artemether/hydroxypropyl-beta-cyclodextrin host-guest system: Characterization, phase-solubility and inclusion mode, *Bioorganic and Mediclinal Chemistry*, 17, 6311-6317, **2009**.
- [132] Zheng, Y., Chow, A.H.L., Production and characterization of a spray-dried hydroxypropyl-beta-cyclodextrin/quercetin complex, *Drug Development and Industrial Pharmacy*, 35, 727-734, **2009**.
- [133] Araujo, M., Vieira, E., Lazaro, G., Conegero, L., Ferreira, O., Inclusion complexes of pyrimethanin 2-hydroxypropyl-beta-cyclodextrin: characterization, phase solubility and molecular modelling, *Bioorganic and Mediclinal Chemistry*, 15, 5752-5759, **2007**.
- [134] Yuan, C., Jin, Z., Xu, X., Inclusion complex of astaxanthin with hydroxypropyl-beta-cyclodextrin: UV, FTIR, ¹H NMR and molecular modelling studies, *Carbohydrate Polymers*, 89, 492-496, **2012**.
- [135] Fronza, G., Mele, A., Ventura, P., ¹H NMR and Molecular Modeling Study on the Inclusion Complex β -Cyclodextrin-Indomethacin, *The Journal of Organic Chemistry*, 61, 909-914, **1996**.
- [136] Chadha, R., Kashid, N., Saini, A., Account of analytical techniques employed for the determination of thermodynamics of inclusion complexation of drugs with cyclodextrins, *Journal of Scientific and Industrial Research*, 63, 211-229, **2004**.
- [137] Danciu, C., Soica, C., Oltean, M., Avram, S., Borcan, F., Csanyi, E., Ambrus, R., Zupko, I., Muntean, D., Dehelean, C.A., Craina, M., Popovici, R.A., Genistein in 1: 1 inclusion complexes with ramified cyclodextrins: Theoretical, physicochemical and biological evaluation, *International Journal of Molecular Science*, 15, 1962-1982, **2014**.

- [138] Qi, L., Xu, Z., Jiang, X., Hu, C., Zou, X., Preparation and antibacterial activity of chitosan nanoparticles, *Carbohydrate Research*, 339, 2693-2700, **2004**.
- [139] Zhang , Y., Cui, Y.L., Qi, A.D., Characterization of icarrin and icariin-2-hydroxypropyl- β -cyclodextrin inclusion complex loading poly (L-lactic acid) scaffolds *Bioinformatics and Biomedical Engineering, 2009. ICBBE 2009. 3rd International Conference on. IEEE*,1-4, **2009**.
- [140] Parreno, J., Buckley-Herd, G., de-Hemptinne, I., Hart, D.A. , Osteoblastic MG-63 cell differentiation, contraction and mRNA expression in stress-relaxed 3D collagen I gels, *Molecular and Cellular Biochemistry*, 317, 21-32, **2008**.
- [141] Tan, F., Naciri, M., Al-Rubeai, M., Osteoconductivity and growth factor production by MG-63 osteoblastic cells on bioglass-coated orthopedic implants, *Biotechnology and Bioengineering*, 108, 454-464, **2011**.
- [142] Liu, L., Zhu, Y., Xu, Y., Reiter, R., Melatonin delays cell proliferation by inducing G1 and G2/M phase arrest in human osteoblastic cell line hFOB 1.19, *Journal of Pineal Research*, 50, 222-31, **2011**.

7. EKLER

EK 1. Melatonin/HP β CD inklüzyon kompleksinin verim hesaplamasında kullanılan UV kalibrasyon grafiği

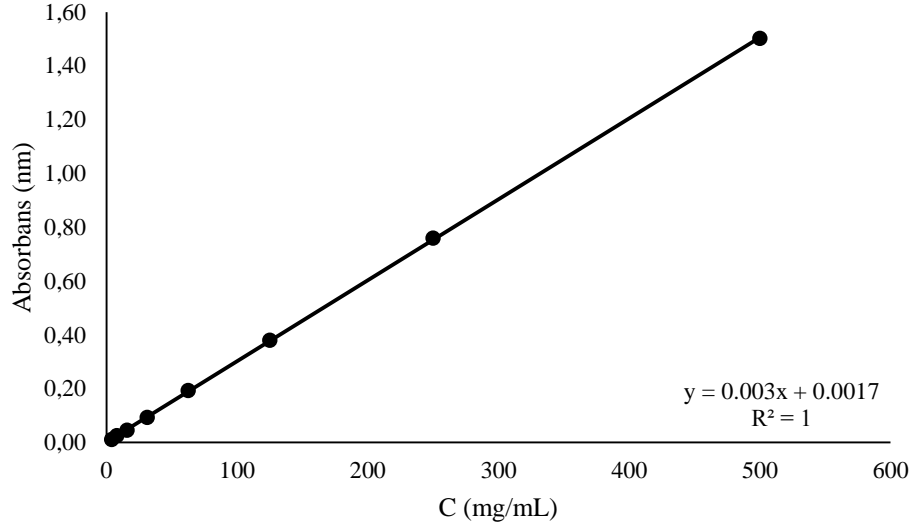
Bölüm 3.4.1’de anlatılan melatonin/HP β CD inklüzyon komplekslerinin oluşturma verimini hesaplamak için kullanılan UV absorbans kalibrasyon grafiği Şekil 7.1’de verilmiştir.



Şekil 7.1. Melatonin/HP β CD inklüzyon kompleksi oluşturma veriminin hesaplanmasında kullanılan UV kalibrasyon grafiği.

EK 2. Etanol içerisinde hazırlanan melatoninin UV kalibrasyon grafiği

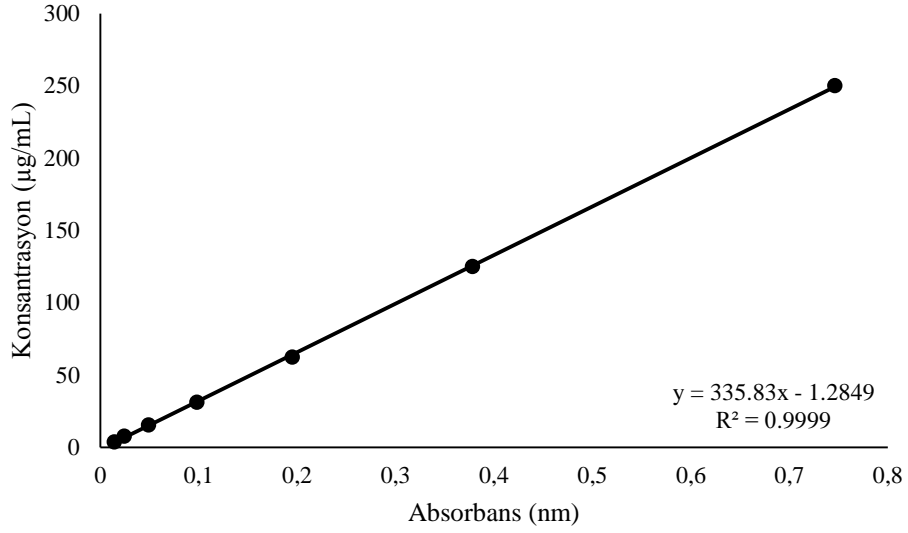
Bölüm 3.5.3'te anlatılan melatoninin kitosan doku iskelelerine yükleme miktarını hesaplamak için kullanılan UV absorbans kalibrasyon grafiği Şekil 7.2'de verilmiştir.



Şekil 7.2. Melatoninin etanol içerisindeki miktarının belirlenmesi için kullanılan kalibrasyon grafiği.

EK 3. *In vitro* salım çalışmasında salınan melatonin miktarının hesaplamasında kullanılan PBS kalibrasyon grafiği

Bölüm 3.5.3'te anlatılan *in vitro* salım çalışmasında salınan melatonin miktarının belirlenmesinde kullanılan PBS kalibrasyon grafiği Şekil 7.3'de gösterilmiştir.



Şekil 7.3. *In vitro* salım çalışmasında salınan melatonin miktarının belirlenmesinde kullanılan kalibrasyon grafiği.

EK 4. Melatonin ve melatonin/HPβCD inklüzyon kompleksinin kitosan doku iskelelerine yüklenme miktarının hesaplanması

Bölüm 3.5.3'te anlatıldığı gibi, iskelelere yükleme işleminden önceki ve sonraki melatonin ve melatonin/HPβCD inklüzyon komplekslerinin içerdiği melatonin miktarı hesaplanmıştır. Ayrıca emdirme işlemi öncesinde ve sonrasında ölçülen yükseklik değerleri yardımıyla hacim değerleri hesaplanmıştır. Bu veriler ışığında, aşağıda belirtilen hesaplama işlemi ile kitosan doku iskeleleri tarafından emilen kompleks içerisindeki melatonin miktarı bulunmuştur.

Başlangıç absorbans değeri: 1,152

Başlangıç melatonin miktarı:

$$M_A (\mu\text{g/mL}) = ((1,152-0,0473)/0,0028)$$

$$M_A (\mu\text{g/mL}) = 394.5 \mu\text{g}$$

4 mg inklüzyon kompleksinde ortalama 394 μg melatonin olduğu bilinmektedir. 200 mg inklüzyon kompleksinde; 19.72 mg melatonin içeren kompleks vardır.

Yüklemeden önceki melatonin miktarı (M_{A0}) = 19.72 mg melatonin içeren kompleks

Emilimden sonra ölçülen melatonin ortalama absorbans değeri: 2.025

Emilimden sonra 10 kat seyreltilmiş çözeltinin melatonin konsantrasyonu:

$$C_A (\text{mg/mL}) = (((2.025-0,0473)/0,0028)*10)/1000)$$

$$C_A (\text{mg/mL}) = 7.066 \text{ mg/mL}$$

Emilme işleminden sonra kalan çözelti yüksekliği (h): 0.3 cm

$$V (\text{mL}) = 0.3 \text{ cm} * 200 (\mu\text{L/cm})$$

$$V=0.6 \text{ mL}$$

Kitosan doku iskelelerince emilen çözelti miktarı : M_A

$$M_A = 7.066 \text{ mg/mL} * 0.6 \text{ mL}$$

$M_A = 4.24 \text{ mg}$ melatonin içeren kompleks

İskelelere yüklenen toplam melatonin miktarı:

$$\Delta M = M_{A0} - M_A$$

$$\Delta M = 19.72 - 4.24 = 15.48 \text{ mg melatonin}$$

Çözeltiyeye 6 iskele daldırılması nedeniyle iskele başına emilen melatonin miktarı;

$$\Delta M = 25.48 \text{ mg melatonin} / 6 \text{ iskele}$$

$$\Delta M = 2.58 \text{ mg melatonin} / \text{iskele}$$

ÖZGEÇMİŞ

Kimlik Bilgileri

Adı Soyadı : Bedriye TOPAL
Doğum Yeri : Denizli
Medeni Hali : Bekar
E-posta : bedriyetal@gmail.com
Adresi : Hastane Cad. Kuyumcu Apt. No: 25, Merkez / Denizli

Eğitim

Lisans : Hacettepe Üniversitesi, Kimya Mühendisliği Bölümü (2013)
Yüksek Lisans : Hacettepe Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Kimya Mühendisliği Anabilim Dalı

Yabancı Dil ve Düzeyi

İngilizce (ileri), Almanca (başlangıç)

İş Deneyimi

-

Deneyim Alanları

-

Tezden Üretilmiş Projeler ve Bütçesi

-

Tezden Üretilmiş Yayınlar

-

Tezden Üretilmiş Tebliğ ve/veya Poster Sunumu ile Katıldığı Toplantılar

1. Topal B., Çetin Altındal D., Gümüşderelioğlu M., “Investigation of melatonin/ β -cyclodextrin inclusion complexes in bone tissue engineering”, 4th International Conference on Tissue Science and Regenerative Medicine, 27-29 July 2015, Rome, ITALY (Poster presentation).

