



T.C.  
EGE ÜNİVERSİTESİ  
Fen Bilimleri Enstitüsü



**BİFOSFONAT GRUBU İLAÇLARIN UZUN  
DÖNEM KULLANIMINA BAĞLI YAN  
ETKİLERİN GİDERİLMESİNDE HYALURONİK  
ASİT YÜKLÜ KİTOSAN NANOPARÇACIKLARIN  
*İN VİTRO* YARA İYİLEŞTİRME POTANSİYELİ**

**Yüksek Lisans Tezi**

Gülistan ÖZDEMİR

Biyomedikal Teknolojiler Anabilim Dalı

İzmir  
2022



T.C.  
EGE ÜNİVERSİTESİ  
Fen Bilimleri Enstitüsü

BİFOSFONAT GRUBU İLAÇLARIN UZUN  
DÖNEM KULLANIMINA BAĞLI YAN  
ETKİLERİN GİDERİLMESİNDE HYALURONİK  
ASİT YÜKLÜ KİTOSAN  
NANOPARÇACIKLARIN *İN VİTRO* YARA  
İYİLEŞTİRME POTANSİYELİ

Gülistan ÖZDEMİR

Danışman: Doç. Dr. Emin İlker MEDİNE

2. Danışman: Prof. Dr. Sema ÇINAR BECERİK

Biyomedikal Teknolojiler Anabilim Dalı  
Biyomedikal Teknolojiler Yüksek Lisans Programı

İzmir  
2022



**Gülistan ÖZDEMİR** tarafından **YÜKSEK LİSANS** tezi olarak sunulan “Bifosfonat Grubu İlaçların Uzun Dönem Kullanımına Bağlı Yan Etkilerin Giderilmesinde Hyaluronik Asit Yüklü Kitosan Nanoparçacıkların *İn Vitro* Yara İyileştirme Potansiyeli” başlıklı bu çalışma E.Ü. Lisansüstü Eğitim ve Öğretim Yönetmeliği ile E.Ü. Fen Bilimleri Enstitüsü Eğitim ve Öğretim Yönergesi’nin ilgili hükümleri uyarınca tarafımızdan değerlendirilerek savunmaya değer bulunmuş ve 06 / 09 / 2022 tarihinde yapılan tez savunma sınavında aday oybirliği ile başarılı bulunmuştur.

**Jüri Üyeleri:**

**İmza:**

|                     |                                       |       |
|---------------------|---------------------------------------|-------|
| <b>Jüri Başkanı</b> | <b>: Prof. Dr. Sema ÇINAR BECERİK</b> | ..... |
| <b>Raportör Üye</b> | <b>: Doç. Dr. Çiğdem İÇHEDEF</b>      | ..... |
| <b>Üye</b>          | <b>: Doç. Dr. Emin İlker MEDİNE</b>   | ..... |
| <b>Üye</b>          | <b>: Doç. Dr. Banu ÖZVERİ KOYUNCU</b> | ..... |
| <b>Üye</b>          | <b>: Doç. Dr. Yasemin PARLAK</b>      | ..... |



# EGE ÜNİVERSİTESİ FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

## ETİK KURALLARA UYGUNLUK BEYANI

E.Ü. Lisansüstü Eğitim ve Öğretim Yönetmeliğinin ilgili hükümleri uyarınca Yüksek Lisans Tezi olarak sunduğum “Bifosfonat Grubu İlaçların Uzun Dönem Kullanımına Bağlı Yan Etkilerin Giderilmesinde Hyaluronik Asit Yüklü Kitosan Nanoparçacıkların *İn Vitro* Yara İyileştirme Potansiyeli” başlıklı bu tezin kendi çalışmam olduğunu, sunduğum tüm sonuç, doküman, bilgi ve belgeleri bizzat ve bu tez çalışması kapsamında elde ettiğimi, bu tez çalışmasıyla elde edilmeyen bütün bilgi ve yorumlara atıf yaptığımı ve bunları kaynaklar listesinde usulüne uygun olarak verdiğimi, tez çalışması ve yazımı sırasında patent ve telif haklarını ihlal edici bir davranışımın olmadığını, bu tezin herhangi bir bölümünü bu üniversite veya diğer bir üniversitede başka bir tez çalışması içinde sunmadığımı, bu tezin planlanmasından yazımına kadar bütün safhalarda bilimsel etik kurallarına uygun olarak davrandığımı ve aksinin ortaya çıkması durumunda her türlü yasal sonucu kabul edeceğimi beyan ederim.

06 / 09 / 2022

İmzası

Gülistan ÖZDEMİR



## **ÖNSÖZ**

Ege Üniversitesi Biyomedikal Teknolojiler Anabilim Dalı'nda tezli yüksek lisans programına başladıktan kısa bir süre sonra Diş Hekimliği Fakültesi'ndeki değerli hocalarım klinikteki bir sorun üzerine ortak çalışma yapmak istediklerini belirttiler ve değerli danışmanımın da kararıyla bu görevi üstlenmiş bulundum. Yapılan ön literatür çalışması neticesinde sorunun çözümüne dair hipotez oluşturuldu ve fon kaynağı olarak da BAP projesine başvuruldu. Projenin onayı akabinde malzeme tedariki süreci pandemi dönemine denk geldi, bu da tezin başından itibaren uzun ve zorlayıcı bir sürecin yaşanacağını habercisi oldu diyebilirim. Nanopartikül sistemini optimize etmek için verilen uğraş, hücrelerle çalışırken hiçbir zaman hiçbir şeyin net olamaması, bozulan analiz cihazları ve her şeyden önce beklemek, ne kadar yer yer üzücü ve bezdirici olsa pes etmeden tekrar tekrar denemenin ve sabretmenin önemini anlamamı sağladı. Klinikte henüz kesin bir tedavi yöntemi bulunmadığından, tez konumun orijinal olması benim için teşvikleyici unsurların başında geldi. Çok uzun araştırma ve uygulama isteyen bir tez olmasına karşın, projeyi kabul ederken verdiğim sözü yerine getirmiş ve sonuna kadar devam etmiş olmak kendim için bir başarı örneği olarak yerini aldı.

TGA-2019-21063 numaralı proje ile çalışmayı destekleyen Ege Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Koordinatörlüğü'ne teşekkürlerimizi sunuyoruz.

**İzmir**

**06 / 09 / 2022**

**Gülistan ÖZDEMİR**



**ÖZET****BİFOSFONAT GRUBU İLAÇLARIN UZUN DÖNEM  
KULLANIMINA BAĞLI YAN ETKİLERİN GİDERİLMESİNDE  
HYALURONİK ASİT YÜKLÜ KİTOSAN NANOPARÇACIKLARIN  
İN VİTRO YARA MODELİ**

ÖZDEMİR, Gülistan

Yüksek Lisans Tezi, Biyomedikal Teknolojiler Anabilim Dalı

Tez Danışmanı: Doç. Dr. Emin İlker Medine

2. Tez Danışmanı: Prof. Dr. Sema ÇINAR BECERİK

Eylül 2022, 79 sayfa

Bifosfonat kullanımına bağlı çene kemiği osteonekrozu son yıllarda özellikle kanser hastaları için ciddi bir sorun halini almaktadır. Tedavide kullanılan bifosfonat grubu ilaçların nitrojen içeren formları oldukça güçlüdür ve bunlar da akabinde yan etkileri getirmektedir. Önceden travmaya uğrayan çene bölgesinde, ilaçların uzun süreli kullanımda birikim göstermesi nekrozlara ve yaralara neden olmaktadır bu da kanser tedavisi gören hastaların sadece fizyolojik değil psikolojik olarak da etkilenmelerini sağlamaktadır. Yan etkileri önleyici bir tedavinin olmaması araştırmacıları yara iyileşme prosesini hızlandırıcı çalışmalara yöneltmiştir. Yara iyileştirmede kullanılan malzemelerin bölge ile penetrasyonunun yetersiz olması ve bölgeye ulaşana kadar degradasyona uğramasından dolayı nanopartikül sistemleri taşıyıcı olarak kullanılmaya başlanmıştır. Bu çalışmada, nitrojen içeren bifosfonat grubu ilaçlardan zoledronik asit, yara iyileştirmede aktif olarak kullanılan ve ortamın nemliliğini sağlayarak iyileşme prosesini hızlandıran hyaluronik asit ve antibakteriyel özelliklere sahip nanotaşıyıcı olarak kitosan kullanılmıştır. Hyaluronik asitin suda hızlı çözünmesini önlemek ve kitosanın hassas yapısını daha stabil hale getirmek amacıyla sentez koşulları optimize edilmiş ve kitosan-hyaluronik asit nanopartiküllerinin zeta potansiyeli +32,3 mV olarak bulunmuş, %61,63 oranında da yüklenme verimi elde edilmiştir. Oluşturulan nanotaşıyıcı sistemin ve zoledronik asitin HGF-1, Saos-2, HaCAT hücreleri üzerindeki *in vitro* etkisini

incelemek amacıyla sitotoksisite, apoptozis ve yara modeli çalışmaları gerçekleştirilmiştir.

**Anahtar kelimeler:** Bifosfonat, Kitosan Nanoparçacık, Hyaluronik Asit, Osteonekroz.



**ABSTRACT*****IN VITRO* WOUND HEALING POTENTIAL OF HYALURONIC  
ACID LOADED CHITOSAN NANOPARTICLES IN REMOVING LONG  
TERM USE SIDE EFFECTS OF BIPHOSPHONATES**

ÖZDEMİR, Gülistan

Master Thesis in Biomedical Technologies Department

Supervisor: Assoc. Prof. Dr. Emin İlker Medine

2. Supervisor: Prof. Dr. Sema ÇINAR BECERİK

September 2022, 79 pages

Bisphosphonate related osteonecrosis of the jaw (BRONJ) has become serious problem especially for cancer patients in recent years. The nitrogen-containing bisphosphonates are the most potent and widely-used form of these compounds. Even though benefits of therapy, long term use of bisphosphonates (BP) may have side effects. In the previously traumatized oral cavity, the accumulation of BPs in long-term use may cause non-healing wounds and exposure of necrotic bone which causes cancer patients to be affected not only physiologically but also psychologically. While there is no specific treatment for BRONJ, promoting the wound healing process and relieving inflammation may help reduce side effects. Nanoparticle systems designed as nanocarriers can be modified in wound healing for preventing degradation and increasing efficiency of pharmaceutical molecule. In this study we aim to produce nanoparticle system made from chitosan (CS) and hyaluronic acid (HA) for relieving side effects of zoledronic acid (ZOL) in wound healing. The synthesis conditions were optimized, the zeta potential of chitosan-hyaluronic acid nanoparticles was found to be +32.3 mV and, the loading efficiency was determined to be %61,63. In order to investigate *in vitro* effects of ZOL and CH-HA NPs on HGF-1, Saos-2, HaCAT cells, cytotoxicity, apoptosis and wound healing model studies were carried out.

**Keywords:** Bisphosphonate, Chitosan Nanoparticule, Hyaluronic Acid, Osteonecrosis.



**İÇİNDEKİLER**Sayfa

|                                                                 |       |
|-----------------------------------------------------------------|-------|
| İÇ KAPAK .....                                                  | i     |
| KABUL ONAY SAYFASI .....                                        | iii   |
| ETİK KURALLARA UYGUNLUK BEYANI.....                             | v     |
| ÖNSÖZ.....                                                      | vii   |
| ÖZET .....                                                      | ix    |
| ABSTRACT .....                                                  | xi    |
| İÇİNDEKİLER DİZİNİ.....                                         | xiii  |
| ŞEKİLLER DİZİNİ .....                                           | xvi   |
| TABLolar DİZİNİ.....                                            | xviii |
| SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ .....                            | xix   |
| 1. GİRİŞ.....                                                   | 1     |
| 2. GENEL BİLGİLER.....                                          | 4     |
| 2.1 Bifosfonatlar.....                                          | 4     |
| 2.1.1 Tarihçesi .....                                           | 4     |
| 2.1.2 Kimyasal yapıları.....                                    | 5     |
| 2.1.3 Klinik uygulamaları.....                                  | 7     |
| 2.1.4 Etki mekanizması.....                                     | 8     |
| 2.2 Bifosfonat Kullanımına Bağlı Çene kemiği Osteonekrozu ..... | 9     |

## İÇİNDEKİLER(devam)

### Sayfa

|                                                                                     |    |
|-------------------------------------------------------------------------------------|----|
| 2.2.1 Tedavi yöntemleri .....                                                       | 11 |
| 2.3 Nanoteknoloji .....                                                             | 13 |
| 2.3.1 Nanoteknolojide yara iyileştirme uygulamaları .....                           | 14 |
| 2.4 Kitosan .....                                                                   | 16 |
| 2.4.1 Kitosan nanoparçacıklarının karakterizasyon yöntemleri .....                  | 19 |
| 2.5 Hyaluronik Asit .....                                                           | 23 |
| 2.6 Kitosan ve Hyaluronik Asitin Bu Çalışmadaki Yeri .....                          | 25 |
| 2.7 Hücre Kültürü .....                                                             | 26 |
| 3. GEREÇ VE YÖNTEM .....                                                            | 27 |
| 3.1 Kullanılan Kimyasallar .....                                                    | 27 |
| 3.2 Kullanılan Cihazlar .....                                                       | 28 |
| 3.3 Kitosan ve Kitosan-Hyaluronik Asit nanopartiküllerinin Sentezi .....            | 29 |
| 3.3.1 Kitosan ve kitosan-hyaluronik asit nanopartiküllerinin karakterizasyonu ..... | 30 |
| 3.3.2 Sentez ürününün nicel analizi .....                                           | 30 |
| 3.3.3 Yapısal analiz çalışmaları .....                                              | 31 |
| 3.4 Hücre Kültürü Çalışmaları .....                                                 | 31 |
| 3.4.1 Sitotoksosite çalışması .....                                                 | 32 |
| 3.4.2 Apoptozis çalışması .....                                                     | 33 |

## İÇİNDEKİLER(devam)

|                                                                                              | <u>Sayfa</u> |
|----------------------------------------------------------------------------------------------|--------------|
| 3.4.3 Yara modeli çalışması.....                                                             | 33           |
| 3.4.4 İstatistiksel analizler .....                                                          | 34           |
| 4. BULGULAR VE TARTIŞMA.....                                                                 | 35           |
| 4.1 Kitosan ve Kitosan-Hyaluronik Asit Nanoparçacıklarının Özelliklerinin<br>İncelemesi..... | 35           |
| 4.1.1 DLS analiz sonuçları.....                                                              | 35           |
| 4.1.2 SEM analiz sonuçları .....                                                             | 38           |
| 4.1.3 Sentez ürününün nicel analiz sonuçları .....                                           | 39           |
| 4.1.4 Yapısal analiz sonuçları.....                                                          | 40           |
| 4.2 Hücre Kültürü Çalışmaları.....                                                           | 42           |
| 4.2.1 Sitotoksikite çalışması sonuçları .....                                                | 42           |
| 4.2.2 Apoptozis çalışması sonuçları .....                                                    | 50           |
| 4.2.3 Yara modeli çalışması sonuçları .....                                                  | 54           |
| 5. SONUÇ VE ÖNERİLER.....                                                                    | 58           |
| KAYNAKLAR DİZİNİ.....                                                                        | 60           |
| TEŞEKKÜR .....                                                                               | 78           |
| ÖZGEÇMİŞ.....                                                                                | 79           |

## ŞEKİLLER DİZİNİ

| <u>Şekil</u>                                                                                                                                           | <u>Sayfa</u> |
|--------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|--------------|
| Şekil 2.1 Prifosfonat ve bifosfonatın kimyasal yapıları .....                                                                                          | 6            |
| Şekil 2.2 Kitin ve kitosanın prosesi .....                                                                                                             | 17           |
| Şekil 2.3 DLS çalışma mekanizması.....                                                                                                                 | 20           |
| Şekil 2.4 FTIR çalışma mekanizması .....                                                                                                               | 21           |
| Şekil 2.5 SEM çalışma mekanizması .....                                                                                                                | 22           |
| Şekil 2.6 Hyaluronik asit molekülünün yapısı .....                                                                                                     | 24           |
| Şekil 4.1 Kitosan nanoparçacık boyut dağılım grafiği.....                                                                                              | 35           |
| Şekil 4.2 Kitosan-hyaluronik asit nanoparçacıklarının boyut dağılım grafiği .....                                                                      | 35           |
| Şekil 4.3 CS nanopartiküllerinin zeta potansiyel dağılımı grafiği .....                                                                                | 37           |
| Şekil 4.4 CS-HA nanopartiküllerinin zeta potansiyel dağılımı grafiği .....                                                                             | 37           |
| Şekil 4.5 CS nanopartiküllerinin SEM analizi .....                                                                                                     | 38           |
| Şekil 4.6 CS-HA nanopartiküllerinin SEM analizi .....                                                                                                  | 39           |
| Şekil 4.7 Hyaluronik asitin kalibrasyon eğrisi .....                                                                                                   | 40           |
| Şekil 4.8 FTIR spektrumları. Kitosan nanoparçacıkları (A), kitosan (B),<br>hyaluronik asit (C), kitosan ve hyaluronik asit nanoparçacıkları (D). ..... | 41           |
| Şekil 4.9 HA örneği uygulanan Saos-2 ve HaCaT ve HGF-1 hücrelerinin 24., 48.<br>ve 72. saat % canlılık değerleri .....                                 | 45           |

## ŞEKİLLER DİZİNİ

### Şekil

### Sayfa

|                                                                                                                         |    |
|-------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|----|
| Şekil 4.10 CHA örneği uygulanan Saos-2 ve HaCaT ve HGF-1 hücrelerinin 24., 48. ve 72. saat % canlılık değerleri.....    | 47 |
| Şekil 4.11 ZA örneği uygulanan Saos-2 ve HaCaT ve HGF-1 hücrelerinin 24., 48. ve 72. saat % canlılık değerleri.....     | 49 |
| Şekil 4.12 ZA+HA ve ZA+CHA örnekleri uygulanan Saos-2 ve HaCaT ve HGF-1 hücrelerinin 72. saat % canlılık sonuçları..... | 50 |
| Şekil 4.13 ZA, ZA+HA ve ZA+CHA örneklerinin Saos-2 hücreleri üzerinde 72. saatteki apoptozis sonuçları .....            | 51 |
| Şekil 4.14 ZA, ZA+HA ve ZA+CHA örneklerinin HaCaT hücreleri üzerinde 72. saatteki apoptozis sonuçları .....             | 52 |
| Şekil 4.15 ZA, ZA+HA ve ZA+CHA örneklerinin HGF-1 hücreleri üzerinde 72. saatteki apoptozis sonuçları .....             | 53 |
| Şekil 4.16 Saos-2 hücreleri üzerinde ZA, ZA+CHA, ZA+HA, CHA ve HA örnekleri ile yara modeli çalışması sonuçları .....   | 56 |
| Şekil 4.17 HaCaT hücreleri üzerinde ZA, ZA+CHA, ZA+HA, CHA ve HA örnekleri ile yara modeli çalışması sonuçları .....    | 57 |
| Şekil 4.18 HGF-1 hücreleri üzerinde ZA, ZA+CHA, ZA+HA, CHA ve HA örnekleri ile yara modeli çalışması sonuçları .....    | 57 |

## TABLolar DİZİNİ

| <u>Tablo</u>                                                                                                                                       | <u>Sayfa</u> |
|----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|--------------|
| Tablo 3.1 HPLC analizi koşulları .....                                                                                                             | 31           |
| Tablo 4.1 HA örneği uygulanan Saos-2 ve HaCaT ve HGF-1 hücrelerinin 24., 48. ve 72. saat % canlılık değeri .....                                   | 44           |
| Tablo 4.2 CHA örneği uygulanan Saos-2 ve HaCaT ve HGF-1 hücrelerinin 24., 48. ve 72. saat % canlılık değeri .....                                  | 46           |
| Tablo 4.3 ZA örneği uygulanan Saos-2 ve HaCaT ve HGF-1 hücrelerinin 24., 48. ve 72. saat % canlılık değeri .....                                   | 48           |
| Tablo 4.4 72. saat sonunda ZA'nın Saos-2, HaCaT ve HGF-1 hücreleri üzerindeki IC50 değeri .....                                                    | 49           |
| Tablo 4.5 ZA+HA ve ZA+CHA örnekleri uygulanan Saos-2 ve HaCaT ve HGF-1 hücrelerinin 72. saat % canlılık değeri.....                                | 49           |
| Tablo 4.6 ZA, ZA+HA ve ZA+CHA örneklerinin Saos-2, HaCaT ve HGF-1 hücreleri üzerinde 72. saatteki % apoptozis değeri.....                          | 54           |
| Tablo 4.7 ZA, ZA+HA ve ZA+CHA, CHA ve HA örneklerinin Saos-2, HaCaT ve HGF-1 hücreleri üzerinde 0, 4, 24 ve 28. saatteki % hücre göçü değeri ..... | 56           |

## SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ

### Simgeler

### Açıklama

|         |            |
|---------|------------|
| $\mu$ l | mikrolitre |
| $\mu$ g | mikrogram  |
| nm      | nanometre  |
| mg      | miligram   |
| mM      | milimolar  |

### Kısaltmalar

|        |                                                 |
|--------|-------------------------------------------------|
| BRONJ  | Bisphosphonate Related Osteonecrosis of the Jaw |
| BP     | Bisphosphanate                                  |
| CS     | Chitosan                                        |
| HA     | Hyaluronik Asit                                 |
| ZOL/ZA | Zoledronik Asit                                 |
| NBP    | Nitrojen içeren bifosfonat                      |
| ATP    | Adenozin Trifosfat                              |
| FBS    | Fetal Bovine Serum                              |
| DLS    | Dinamik Işık Saçılım Spektrometresi             |
| ZP     | Zeta Potansiyeli                                |
| IR     | Kızılötesi Işık                                 |

**SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ (devam)**

| <u>Kısaltmalar</u> | <u>Açıklama</u>                                       |
|--------------------|-------------------------------------------------------|
| FTIR               | Fourier Dönüşümlü Kızılötesi Spektrofotometresi       |
| SEM                | Taramalı Elektron Mikroskobu                          |
| ECM                | Ekstraselüler Matriks                                 |
| GAG                | Glukozaminglukogan                                    |
| PBS                | Phosphata Buffered Saline                             |
| DMEM               | Dulbecco's Modified Eagle Medium                      |
| MTT                | 3-4,5-dimetil-tiyazolil-2,5-difeniltetrazolyum bromür |
| HPLC               | High Pressure Liquid Chromatography                   |
| NaOH               | Sodyum Hidroksit                                      |
| DMSO               | Dimetil Sülfoksit                                     |
| CS-HA/CHA          | Chitosan- Hyaluronik Asit                             |
| PDI                | Polidispersity Index                                  |
| UV-VIS             | Ultraviolet Visible                                   |
| LMW                | Low Molecular Weight                                  |
| DMEM/F-12          | Dulbecco's Modified Eagle Medium/Nutrient Mixture     |

## 1. GİRİŞ

Çene kemiği osteonekrozu, son zamanlarda, bifosfonatları tedavi amaçlı uzun süreli kullanan hastalarda ciddi bir sorun halini almıştır (Acil et al., 2012). Hastalık patolojik olarak dental ve bilimsel literatürde 100 yıldan fazladır yer almaktadır ve tıbbi müdahale akabinde veya kendiliğinden oluşabilmektedir (Tipton et al., 2011). İlaç tedavisi sonucu ortaya çıktığı şekli, en yaygın olarak bifosfonat kullanımında görülmüştür (Akdeniz et al., 2018). Hastalığın temel belirtisi, çene veya çene kemiği bölgesinde, iyileşmeye direnç gösteren yaralar ve açık nekroz kemiklerin ortaya çıkmasıdır. Bu hastalık, özellikle kanser nedeniyle tedavi görmekte olan hastaların yaşam kalitesini negatif yönde etkilemektedir (Zafar et al., 2014). Nekroz, nitrojen içeren bifosfonat türlerinin kullanımında yan etki olarak ortaya çıkmaktadır ve son zamanlarda hastalığın görülme oranının %8'den %12'ye çıktığı rapor edilmiştir (Anitua et al., 2016). Nitrojen içeren türleri içermeyen türlerine göre daha kuvvetlidir ve hidroksiapatite olan yüksek afinitesi mineralize dokular tarafından adezyonunu arttırmaktadır (Bassa et al., 2013). NBP' ler hidroksiapatite güçlü bir şekilde bağlanmakta ve kullanıldıkça bölgede birikmektedirler (Tanaka et al., 2013). 8 haftadan uzun süren ilaç kullanımında diş eti açılmakta ve çene kemiği ortaya çıkmaktadır. Kemik açıldıkça, dokudan gelen bir kan akışı olmadığı için kemik ölümü gerçekleşmeye başlamaktadır (Borsani et al., 2018).

Bifosfonatlar, pirofosfat benzerleridir ve osteoklast aktivitesini inhibe ederek kemik erimesini önleme özellikleriyle bilinirler (Komatsu et al., 2016). Bifosfonatlar osteoporoz, kemik, tümörü, metastaz, Paget hastalığı, çoklu miyelom gibi kemik hastalıklarının tedavisinde kullanılmaktadır (Komatsu et al., 2016, Pansani et al., 2014). 19. yüzyıldan beri sentezlenmektedir ve ilk olarak endüstriyel amaçlarla kullanılmaya başlanmıştır. Temel çalışma mekanizmaları, kemik erimesini ve mineralizasyonu engellemektedir. Bu mekanizma bifosfonat yapısında nitrojen yan zincirinin varlığına bağlıdır (McLeod et al., 2014). Osteoklast ve osteoblast üzerindeki etkilerinin yanı sıra, özellikle yüksek miktarda nitrojen içeren türleri, fibroblast proliferasyonunu önleyebilmektedir ve apoptozu arttırabilmektedir (Hu et al., 2013). Metastatik kanser hastalığının tedavisinde kullanılan nitrojen içeren türlerinin yol açtığı bu yan etkilerin ortaya çıkma

mekanizması, birçok çalışma yapılmasına rağmen hala net olarak anlaşılamamıştır (Açıl et al., 2018).

Bifosfonat ile tedavi gören hastalarda yara gecikmesinin olduğu bilinmektedir (Basso et al., 2013). Yaranın epitel hücreleri ve dış eti fibroblastları ile kapanması sadece başarılı bir yara iyileşmesinin gerçekleşmesi açısından değil, dış kökünde dış ekstraksiyonu sonucu oluşabilecek bakteri enfeksiyonunu önlemesi nedeniyle de önemlidir. Çünkü bakteri enfeksiyonu, nekrozun sigara, protezin yol açacağı travmalar vb. diğer risk faktörleriyle de iş birliği içinde olmasında neden olabilir (Komatsu et al., 2016). Fibroblastlar ve endotel hücreleri doku onarım prosesinde önemli bir rol oynamaktadırlar ve bu hücrelerin spesifik fonksiyonlarının aktifleştirilmesi yaranın kapanma sürecini geliştirebilir (Prosdocimi & Bevilacqua, 2012).

Hyaluronik asit, 1934 yılında keşfedildiğinden beri üzerinde çalışılan, deri içerisinde üretilen doğal bir polimerdir. Medikal alanda, ortopedide ve estetik operasyonlarda çokça yer almıştır. Tedavi amaçlı olarak kullanımı ilerlediğinden beri doku mühendisliği ile ilgili yapılan çalışmalarda öncelikli olarak yer almaktadır (Price et al., 2007).

Endojen HA plazma membranında üretilmektedir ve ekstraselüler dokularda da farklı konsantrasyonlarda yer alabilmektedir. Doku yapısında kayganlaştırma, nemlendirme ve onarım özellikleriyle yer almaktadır (Roehrs et al., 2016). Doku onarımında ve yara iyileşmesinde, fibrinlerle birlikte, fibroblast ve endotel hücrelerin yaralanmış bölgede organize olmasını sağlamaktadır. Hyaluronik asitin hidrofilik özelliği pıhtının yumuşamasına neden olduğundan, hücrelerin bölgede kolonileşmesini kolaylaştırır (Longinotti, 2014).

Doğal bir hemostatik polimer olan kitosan, keşfedildiği günden bu yana, biyouyumlu, biyobozunur, non-toksik, antimikrobiyal özellikleriyle birlikte yara iyileşme sürecini de tetiklediği için, pansuman malzemesi olarak yaygınca kullanılmıştır (Dai et al., 2011). Hassas bir yapıya sahip olması ise, yara iyileştirme alanında yetersiz kalmasına sebep olacağından, diğer polimerlerle birlikte kullanılmasının, sorunu giderebileceği düşünülmüş ve bu alanda çalışmalar

yürütölmüştür (Sanad&Abdel-Bar, 2017). Hyaluronik asitin de vücutta absorbsiyonu çok hızlı olduğu için modifikasyonu kaçınılmaz bir hal almaktadır (Gokila et al., 2018). Bu dezavantajları ortadan kaldırmak ve avantajlarından faydalanmak için, iki maddenin beraber kullanılması düşünölmüş ve yara iyileştirme, ilaç taşınımı gibi birçok çalışmada konjugasyonları yer almıştır.

Bu çalışmada yara iyileştirme özelliği bulunan antimikrobiyal kitosan nanoparçacıkları ve hyaluronik asit konjugasyonunun, bifosfonatların diş eti fibroblastları üzerinde yarattığı etkilerini azaltmak için, in vitro koşullarda yara modeli oluşturularak etkinliğinin incelenmesi hedeflenmektedir.



## 2. GENEL BİLGİLER

### 2.1 Bifosfonatlar

#### 2.1.1 Tarihçesi

Bifosfonatlar kimyasal olarak ilk 1800'lü yıllarda sentezlenmiştir fakat kalsiyum metabolizmasıyla ilgili hastalıklarda tedavi amaçlı kullanımı son 50 yıldır literatürde yerini almaktadır. İnsanlarda ilk kullanılan bifosfonat türü olan etidronatın sentezlenmesi bile yüzyılı aşkın bir süre önce gerçekleşmiştir (Russell et al., 2011). İlk adları difosfonat olarak literatürde yerini, klinik çalışmalarda etidronatın Paget hastalığı tedavisinde kullanılmasıyla almıştır (Smith et al., 1971). Öncelikli olarak endüstrideki proseslerde kullanımı ve sadece bu alanla sınırlı kalması, klinikle ilişkisi ve sahip olduğu potansiyelin üzerinde durulmaması, yapılan çalışmaların gecikmesinin nedenlerini oluşturmuştur (Coleman, R., 2020).

İlk bifosfonatların sentezi 19. yüzyılda Menschutkin, Von Baeyer ve Hofmann tarafından gerçekleştirilmiş ve sanayide kireç çözücü ve korozyon önleyici ajanlar olarak, çamaşır deterjanları ve yıkama sularındaki ayrıca yağ üretimi sonucu ortaya çıkan salamura sularındaki kalsiyum karbonatın çökelti oluşturmasını önlemek amacıyla kullanılmaya başlanmıştır (Watts, N. B., 1998).

Prifosfonatların kalsiyum fosfatın *in vitro* oluşumunu ve çözünürlüğünü önlediği bilinmektedir, *in vivo* olarak da idrar ve plasmada bulunarak, anomali bir şekilde kireçlenme oluşumunu önlemektedir lakin minerilizasyona ve kemik erimesine etki etmemektedir, hızlı bir şekilde hidrolize uğraması tedavi amaçlı kullanımının önünde bir engel teşkil etmiştir. Bu durum da araştırmacıları prifosfonatlarla aynı fizikokimyasal özellikteki lakin enzimatik hidrolize dirençli analog yapıları bulmaya itmiştir (Fleisch et al., 2002).

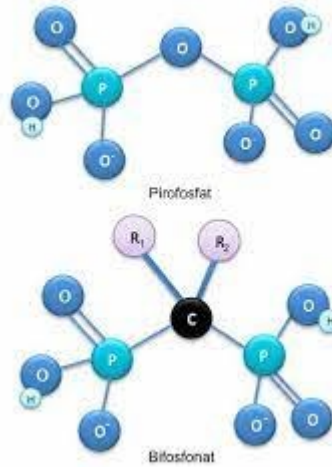
Bifosfonatlar, doğada bulunan inorganik prifosfonatların analoglarıdır, üzerinde yapılan çalışmalar, kalsiyum fosfatın *in vitro* çökmesini, *in vivo* da kireçlenmeyi inhibe ettiğini göstermiştir (Rogers et al., 1997). *In vivo* yapılan deneylerde oral olarak alındığında da aynı etkiyi göstermesi, prifosfonatların aksine

kimyasal ve enzimatik reaksiyonlara karşı daha dirençli olduğunu göstermiştir (Fleisch et al., 1970). İlk başta kireç çözücü olarak Alman bilim adamları tarafından üretilen bifosfonatların biyolojik etkilerinin ortaya çıkmasının ve yayınlanmasının akabinde geçen 50 yılda, dünyada en çok kullanılan ve en etkili ilaçlar arasındaki yerini, birçok kemik hastalığının tedavisinde kullanılarak almıştır (Cremers et al., 2019).

Sentetik olarak üretilen bifosfonatların, prifosfonatların analogu olduğu ve kemik erimesini önlediğinin keşfinden sonra, yeni bifosfonat türleri üretilmeye başlamış ve *in vivo* kemik erimesinde 100 kat daha etkili potansiyele sahip türevleri sentezlenmiştir (Rogers et al., 2000).

### 2.1.2 Kimyasal yapıları

Bifosfonatlar, prifosfonat benzeri yapılardır, adenosin trifosfatın (ATP) metabolizma ürünü olan prifosfonatlar hızlı enzimatik degradasyona maruz kalması nedeniyle hiçbir biyolojik aktiviteye katılmadan parçalanırlar (Dima et al., 2013), yapılarında bulunan ve birçok varyasyona izin veren P-O-P yapısının oksijen atomu yerine karbon atomu konumlandırılmış hali de bifosfonatları oluşturur (H. Fleisch, 2004). P-C-P şeklinde basit bağ yapısındaki bifosfonatlar ısıya ve birçok kimyasal reaktife karşı dayanıklıdır aynı zamanda enzimatik hidrolize de direnç göstermektedir (Anke et al., 2008). Bütün bifosfonatlar bu temel bağ yapısını içerir ama farklı R grupları da karbon atomuna bağlanmaktadır (Şekil 2.1), bunlardan en belirgin olan R1, reçetelenen ilaç formlarının hepsinde bulunan hidroksil grubudur, R2 ise bileşimi bifosfonatın potansiyelini etkileyen gruptur ve bu etki nitrojen atomunun varlığına ve bağ yerleşimine bağlıdır. Nitrojen içeren bifosfonatlar; alendronat, risedronat, pamidronat, ibandronat ve zoledronat, nitrojen içermeyen bifosfonatlar veya basitçe bifosfonatlar; klodronat, etidronat ve tiludronat olarak adlandırılmıştır (Partha et al., 2019). R1 pozisyonunda hidroksil grubunun bulunması kemik mineraline olan afiniteyi arttırmaktadır, bu bifosfonatların kalsiyum iyonunu şelatlaması üçlü yapısında ikili yapısına göre daha etkilidir (Russell et al., 1999).



Şekil 2.1 Prifosfonat ve bifosfonatın kimyasal yapıları

Bifosfonatlar sentetik yapılardır doğal olarak insan veya hayvan vücudunda üretilen bileşikler değildir, P-C-P bağına açabilecek herhangi bir enzim henüz keşfedilmemiştir (Papapoulos, S. E., 1995).

Geminal bifosfonatlarda bulunan ve asıl atomların yerini alan R1 ve R2 gruplarının modifiye edilmesiyle birçok farklı bifosfonat türü sentezlenebilir (Shinoda et al., 1983). Analogları olan prifosfonatlar gibi bifosfonatların da kemik mineraline olan afiniteleri yüksektir çünkü hidroksiapatit kristallerine bağlanırlar, bu yüzden kemiğe tutunumları hidroksiapatite bağlanan kısmın mevcudiyetine bağlıdır (Drake et al., 2008).

Bütün bifosfonatlar, fosfonat gruplarını hidroksiapatite bağlayarak faaliyete geçerler. P-C-P formundaki bifosfonatlarda C karbon atomunu, P de fosfonat grubunu temsil eder. 2 fosfonat grubunun moleküldeki varlığının nedeni, kemik kancası formuyla asıl görevi olan kemiği hedef alıp kendi moleküler mekanizmasını harekete geçirmektir (Russell, R. G. G., 2007).

Nitrojen içeren bifosfonatlarda, R2 zincirindeki en ufak değişimin bile kemik erimesini *in vivo* ve *in vitro* önlemedeki potansiyelini etkilediği uzun zamandır bilinmektedir ve bu etkinin farmakolojik amacı henüz tam anlamıyla açıklanamamıştır (Dunford et al., 2001).

Birincil nesil bifosfonatlar 1960'ların sonlarında sentezlenmiştir ve kısa alkilerden veya halejonür yan zincirlerinden oluşur ve bu sınıfın en bilinenleri 1-hydroxyethane-1,1-bifosfonat (etidronat) ve dikloromethanbifosfonattır (klodronat). İkincil nesil bifosfonatlar amino terminal grup tarafından karakterize edilirler ve bunları 3-amino-1-hidroksipropan-1,1-bifosfonat (pamidronat) ve 4-amino-1-hidroksibütan-1,1-bifosfonat oluşturur. Üçüncü nesil bifosfonatları ise dairesel zincirler (Sietsama et al., 1989) ve nitrojen içeren güçlü ilaçlar olan zoledronat, ibandronat oluşturur (Broom et al., 2009).

Bütün bifosfonatlar benzer fizikokimyasal yapılaraya sahip olmasına karşın etkinlikleri birbirlerinden farklıdır (Lin, J. H., 1996). Bifosfonatlar temel olarak nitrojen içeren ve içermeyen olarak iki gruba ayrılırlar ve etkinlikleri de buna göre değişmektedir, bağırsaktan emilim alendronat, ibandronat, and risedronat için %1'den daha düşük, etidronat için %3 ve %7 aralığındadır, kullanım talimatına uygun bir şekilde alınmadığında bu değerler daha da düşmektedir. Bir kere emildiğinde kemik tarafından hızlı bir şekilde, hidroksiapatite olan yüksek afinitesi nedeniyle tutunmaktadır ve yarılanma ömürleri 10 yılı aşmaktadır (Toussaint et al., 2008).

### 2.1.3 Klinik uygulamaları

Bifosfonatlar kemik hastalıklarını kontrol altına almak için yaygın bir şekilde kullanılmaktadırlar. Bu hastalıklara osteoporoz, Paget hastalığı ve tümöre bağlı hiperkalsemi örnek verilebilir. Bifosfonatlar kemik yıkımına neden olan osteoklast hücrelerini, tümör hücrelerinin proliferasyonunu ve anjiyogenezi inhibe etmektedir. Bifosfonatların bu özellikleri, onları kemik metastazını kontrol etmede kullanışlı bir hale getirmiştir. Yapılan klinik denemelerin çoğunluğunda, prostat, meme kanseri ve miyelom hastalığına sahip hastalarda, iskeletsel tümörün yükünü hafiflettiği görülmüştür bu da metastatik hastalıklarla yapılan çalışmalarda bifosfonat kullanımının arttırılmasına öncülük etmiştir (Melo et al., 2005). Bifosfonatın etkinitesi için yapılan ilk klinik çalışmalarda, miyeloma hastalığına sahip hastalarda klodronatın iskeletteki kalsiyum miktarının aşırı bir şekilde mobilizasyonunu bastırmasını belirlemek olmuş ve akabinde tümör hastalarıyla yapılan çalışmalar takip etmiştir (Van Acker et al., 2016).

Osteoporozun tedavisinde temel sınıf ilaçlar sınıfında yer alan bifosfonatlar, osteoklasta bağlı kemik yıkımını ve kemik turnover markerlarını azaltarak, kemik mineral yoğunluğunu arttırmaktadır. Yapılan geniş çaplı klinik çalışmalarda osteoporotik kırıkların riskini azalttığı da belirlenmiştir. Bifosfonatların kemik mineraline olan yüksek afinitesi, bağlandıktan sonra da iskelette yerleşimini sağlamakta ve ilaç alımı durmasına rağmen, etkinliğini ve iskeleti koruma görevini uzun yıllar boyunca yerine getirmektedir (Shane, E., 2010).

Damar yoluyla alınan bifosfonatların osteoporoz tedavisinde kullanıldığı ve hastalar için iyi bir alternatif olduğu bilinmektedir. Birinci jenerasyon bifosfonatların akut böbrek yetmezliği ile ilişkisi olduğu ortaya çıktıktan sonra yeni jenerasyon bifosfonatların kullanımı daha güvenli bulunulmuştur (Strampel et al., 2007).

#### **2.1.4 Etki mekanizması**

Kemik doku osteoblast, osteoklast ve osteositler olmak üzere 3 çeşit hücre içermektedir. Kemik doku sürekli olarak bu hücrelerin birlikte hareket etmesiyle şekillenir, bu hareketler osteoklastta kemik yıkımı, osteoblastta kemik yapımı ve osteositlerde mekanosensör ve şekil alma sürecinin planlayıcısı olarak yerini alır. Tekrar tekrar yeniden yapılanma süreci lokal ve sistemik faktörler tarafından kemik homeostasinin sağlanması için kontrol altındadır, bunlara büyüme faktörleri ve kalsitonin örnek verilebilir. Kemik yıkımı ve yapımı sürecünde ortaya çıkabilecek herhangi bir dengesizlik kemik rahatsızlıklarına yol açabilir (Florencio-Silva et al., 2015).

*In vivo* ve *in vitro* çalışmalar göstermiştir ki bifosfonatların temel görevi kemik yıkımını inhibe etmektir.

Bifosfonatların P-C-P yapısının,  $Ca^{2+}$  gibi iki değerlikli metal iyonlarına bağlanmasını sağladığı bilinmektedir bu etki de vücut içerisindeki sirkülasyondan ayrılmasını sağlamaktadır çünkü hızlıca kemik minerallerinin yüzeyine, özellikle osteoklastik yıkıma maruz kalan alanlarda, bağlanmaktadır (Roelofs et al., 2006). Yüzeye bağlanma yeteneği, bifosfonatların seçici bir şekilde kemik mineraline

doğru yönelimini sağlamakta bu da osteoklastlar nedeniyle gerçekleşen kemik yıkımını inhibe eden güçlü ilaçlar sınıfına girmesini sağlamaktadır.

Nitrojen içermeyen bifosfonatların çalışma mekanizması, metabolizmada ATP'nin hidrolize olmayan analoglarında birleşimiyle gerçekleşir bu da mitokondrial ADP/ATP translokazını inhibe etmesine ve osteoklastların apoptozuna yol açar (Clézardin, P., 2011).

Yapısında nitrojen içermeyen bifosfonatların kemik yıkımını önleme potansiyelleri düşüktür, osteoklastın fonksiyonelliğini, intrasellüler metabolizma yardımıyla ATP metabolitlerine toksik etki göstererek inhibe ederler. Nitrojen içeren bifosfonatlar osteoklastik kemik yıkımını önlemede daha güçlü inhibitörlerdir, mevalonat yolağı için anahtar rol oynayan FPPS enzimini inhibe ederek, osteoklastların apoptozuna kadar neden olan olaylar zincirine yol açar (Van Beek, 2003).

Bifosfonatlar etkili bir biçimde osteoklast nedeniyle oluşan kemik yıkımını inhibe etmektedir bu da osteoporozda iskeletsel korumayı sağlaması amacıyla kullanımını mantıklı kılmaktadır, aynı zamanda çeşitli evrelerdeki tümör tiplerinde de kullanılmaktadır. Bifosfonatların kimyasal yapısındaki çeşitlilik fizikokimyasal ve biyolojik özelliklerinin hatta potansiyellerinin değişkenliğine de yansımaktadır. Yeni nesil nitrojen içeren bifosfonatlar nitrojen içermeyenlerine göre kat be kat daha güçlü etkinliğe sahiptirler. Nitrojen içermeyen bifosfonatlar ATP içeren bileşenler içine yerleşerek hücre fonksiyonelliğini inhibe ederken, nitrojen içeren bifosfonatlar hücre sinyalizasyonuna müdahale ederek hücre fonksiyonelliği ve canlılığı için gerekli olan küçük sinyal moleküllerinin prenilizasyonunu önlemektedirler. Önceki çalışmalar nitrojen içeren türlerin ana hedefinin farnesil prifosfat sentezi olduğunu gösterse de son çalışmalar mevalonat yolundaki GGOH proteini olduğunu göstermiştir (Aapro et al., 2008.)

## **2.2 Bifosfonat Kullanımına Bağlı Çene Kemiği Osteonekrozu**

Çene kemiği osteonekrozu, tedavi sürecinde bifosfonat kullanan kanser hastalarında ortaya çıkmaya başlamıştır. Vakalara ve yayınlara bakıldığında,

hastaların büyük çoğunluğunun antineoplastik tedavi (kemoterapi, steroid tedavisi veya boyun ve baş bölgesine radyoterapi) sürecindeyken, bifosfonat ilaçlarının da kanser tedavisi için verilmesiyle beraber, çene kemiği osteonekrozu semptomlarının görüldüğü rapor edilmiştir (Bagán et al., 2007).

İlk ortaya çıkışı 2003 yılında olan çene kemiği osteonekrozunun, osteoporoz hastalarında görülüş sıklığı oldukça düşüktür, 100.000 hastada 1-90 hasta aralığında görülmektedir. Vakaların %90 ının, yüksek dozda damar yoluyla bifosfonat veya deri altı yoluyla denosumab ilaçlarını alan kanser hastalarında görüldüğü rapor edilmiştir (Khan et al., 2016).

Çalışma mekanizması, osteoklast aktiviteyi baskılayarak kemik yıkımını inhibe etmek ve osteoklast apoptozunu tetiklemek olan, oldukça tesirli olduğu yapılan birçok çalışmada ve de tedavide kanıtlanmış olan bifosfonatların, yan etkileri de bulunmaktadır ve bunlardan başlıcası bifosfonat tedavisi gören hastalarda kullanıma bağlı ortaya çıkan çene kemiği osteonekrozudur (Fliefel et al., 2015).

Bifosfonatların kemik metastazını azaltmanın yanında, patolojik kırıkları önleme, ağrıyı azaltma ve hayat kalitesini artırma gibi yararları da bulunmaktadır lakin bu tedavi şeklinin avasküler nekrozla olan ilişkisi rapor edilmiştir. Osteonekroza bağlı lezyonlar protez, diş çekimi veya oral bölgeye cerrahi müdahaleler gibi kemiği bakterilerin kolonizasyonuna maruz bırakmayacak olaylar gerçekleşmediği sürece ortaya çıkmayabilir (Agrillo et al., 2012). Bu lezyonlar semptomatik olmaya, bölge eğer ikincil etkenlerden dolayı enfekte olmuşsa veya sağlıklı dokunun yakınında ve/veya karşısında, açığa çıkmış olan kemikten kaynaklanan düzensiz yüzeyin yarattığı travma bulunursa, başlamaktadır. Çene kemiği osteonekrozunun belirtileri; bölgesel ağrı, yumuşak dokuların şişmesi ve iltihaplanması, iltihabın akıtılması, sağlıklı diş kaybı, açığa çıkan diş olarak belirtilmektedir. Bu semptomlar çoğunlukla önceden çekilmiş olan dişin bulunduğu bölgede veya diğer cerrahi işlemlerin yarattığı etkilerle ortaya çıkmaktadır lakin spontan bir şekilde de gerçekleşebilmektedir (Silverman et al., 2009).

Damar yoluyla alınan bifosfonatların oral yolla alınanlara göre çene kemiği osteonekrozuna neden olma sıklığı daha yüksektir. BRONJ'un damar yoluyla bifosfonat alan kanser hastalarında görülme oranı kabaca %1-3 aralığında olduğu bilinmektedir (Bagan et al., 2009).

Çene kemiği osteonekrozunun patofizyolojisi hala tam olarak netliğe kavuşmamıştır, nekrozun önceden mi yoksa enfeksiyonla beraber mi olduğu bilinmemektedir lakin enfeksiyon ve iltihaplanmanın nekrozun gelişiminde önemli bir rol oynadığı açıkça ortadadır. Bifosfonatlar lokal enfeksiyon oluşum riskini arttırabileceği ve oral mukozanın iyileşme sürecini bozduğu ayrıca makrofaj ve monositlerin fonksiyonelliğini etkiledikleri de düşünülmektedir, kemik yenilenmesini baskılaması da nekroz oluşumunu geliştirebilmektedir (Khan et al., 2017). Bilinen vakalarda nekroz, açıkta kalan çene kemiğinin iyileşme sürecinin 6-8 hafta boyunca gerçekleşmemesi üzerine sağlık çalışanları tarafından tanımlanmaktadır (Aragon-Ching et al., 2009). Nekrozun tanımlanması açısından varılan ortak kararlar neticesinde gereken şartlar; oral boşlukta sürekli bulunan açıkta bir kemik, 8 haftalık uygun bir tedaviye karşın hala varlığının devam etmesi, tümöre dair bölgede herhangi bir kanıt olmaması ve önceden bölgenin radyoterapiye maruz bırakılmaması olarak yer almıştır (Van den Wyngaert et al., 2009).

### 2.2.1 Tedavi yöntemleri

BRONJ'un kontrol altına alınması, semptomların elimine edilmesi ve azaltılmasına yönelik ilerleme üzerine kurulmuştur, hastalığın ilerlemesini yavaşlatma veya önleme, hastalıklı kemiği ortadan kaldırmaya yönelik tedavi yöntemleri oluşturulmaktadır çünkü henüz cerrahi veya cerrahi olmayan hiçbir yöntemin nekrozun tedavisinde başarıya ulaştığı onaylanmamıştır bu yüzden tedavi önleme ve korumaya yöneliktir.

Tedavi stratejileri antibiyotiklerin, antibakterial ağız çalkalayıcılarının kullanımını, mümkünse bifosfonat kullanımının durdurulmasını, ağrıyı kontrol altına almayı, uzun süreli olarak ağrıyı ve enfeksiyonu hafifletmek için hasarlı dokuya ait tüm bölgenin tamamen alınması veya kesilmesini, nekroza uğramış

kemiğin alınmasını, çene kemiğinin kaval kemiğiyle yeniden oluşturulmasını ve açıkta kalan bölgenin de dokularla kapatılmasını içermektedir (Fliefel et al., 2015).

Bu stratejilerin yanısıra, bifosfonatların karmaşık çalışma mekanizmasına yönelik bazı önleme stratejileri de düşünülmüştür. Bunlardan biri de hiperbarik oksijen kullanımıdır, bifosfonatların osteoklast aktiviteyi inhibe etmesinin yanısıra apoptozunu da tetiklediği bilinmektedir, osteoklast apoptozu da osteoklastojenik sitokinler (tümör nekroz faktörü, makrofaj koloni uyarıcı faktörü ve RANKL) tarafından baskılanabilir ve bu sinyallerin oksijene karşı duyarlı olduğu bilinmektedir (Freiberger et al., 2007) ayrıca bifosfonatların yara iyileşmesini geciktirdiği de bilinmektedir, basınçla dokulardaki oksijen difüzyonunun arttırımıyla bu soruna da çözüm getirmek amaçlanmıştır (Freiberger, J. J., 2009). Fakat bu da kesin bir çözüm olmamakla birlikte orta kulak, iç kulak, dişler, sinüsler ve ciğerlerde barotravmatik bozukluklara, merkezi sinir sistemi ve ciğerlerde oksijen toksisitesine, anksiyete ve göz bozukluklarına neden olacak yan etkilere sahiptir (Plafki et al., 2000).

Erbium: YAG lazer terapi, su ve hidroksiapatit tarafından emilimi nedeniyle kemik doku için iyi bir tedavi olarak gösterilmektedir, Er: YAG lazer terapi ve düşük seviye lazer terapiyle dokulara yapılan uyarının mukozal iyileşmeyi tetikleyeceği, mikrobiyal yükü azaltacağı ve birleşik yöntemlerin kullanılmasının hastanın gösterdiği semptomları azaltıp hayat kalitesini arttıracacağı düşünülmüştür (Weber et al., 2016).

Ozon terapi yapılan bir çalışmada doku yenileyici faktör olarak BRONJ tedavisinde kullanılarak hastaların %90'ında etkinliği gözlenmiştir, endojen antioksidanların uyarımını sağlayarak dokular üzerinde pozitif etkisi olduğu bilinen ozon, dokudaki kırmızı kan hücreleri ve hemoglobinin konsantrasyonunu da arttırmaktadır. Ozon terapisi hücre proliferasyonunu tetikleyerek yumuşak doku iyileşmesini sağlamaktadır, bu özelliği de diğer tedavi yöntemleriyle birlikte kullanıldığında BRONJ'un semptomlarının başarılı bir şekilde azalmasını ve hastanın yaşam kalitesinin artmasını sağlamaktadır (Goker et al., 2020).

### 2.3 Nanoteknoloji

Nanoteknoloji dünya genelinde araştırma ve geliştirme alanında en dikkat çeken konulardan biri olmuş ve bütün fiziksel materyallerin yeni yollarla yeniden yaratımını, kontrolünü sağlamayı, dizayn edilen ve yapılan nerdeyse her şeyi değiştirme fırsatı sağlamış ve 2000' li yıllarla birlikte hükümetlerin yüksek mevlada fonlarını bu alana yönlendirmesine ve birçok büyük şirketin yatırımlarını nanoteknolojiyle ilgili araştırmalara harcamalarına yol açmıştır (Zhu et al., 2004).

Nanoteknolojinin açılımı, bölgeden bölgeye değişmesine rağmen, genel olarak ortak paydada nanometre boyutundaki materyalleri (100 nm altındaki) kavramak, kontrol edebilmek ve yeniden yapılandırmak bu sayede de temelden yeni özelliklere ve fonksiyonelliğe sahip maddelerin yaratımını sağlamak olarak tanımlanmıştır (Sanchez et al 2010). Nano kelimesi Yunanca kökenlidir ve cüce anlamındadır, nanometre  $10^{-9}$  metreye tekabül etmektedir. Bir nanometre insan saçından çap olarak 60.000 kez daha küçüktür ve nanopartiküller için genellikle 100 nanometrenin altı eşsiz özelliklerini gösterme açısından kabul edilmektedir (Sekhon, B. S., 2010). Doğadaki tek bir atomun veya molekülün davranışlarıyla, farklı atom ve molekül birleşimlerinin toplamının davranışları arasındaki değişimin doğada bulunan örnekleri, nanoteknolojiye bu doğal geçişten yararlanma fırsatı vermiştir (Raco, M. C., 2011). Biyolojik sistemlerin aşırı derecede küçük olabilmesi, özellikle hücrelerin çok küçük olmasına rağmen çok aktif olması, üretimde olmaları, bilgi depolamaları gibi özellikleri bilim dünyasında da küçük ölçekte istediklerimizi yapabilecek ve üretecek materyallere sahip olma isteğini uyandırmıştır ve nanoteknoloji de eşsiz fiziksel ve kimyasal özelliklere sahip nanomateriyallerin toplum yararına istenilen uygulamalarda kullanılmak üzere üretiminin yolunu açmıştır (Bhushan, B., 2017).

Nanoölçekteki yapılar insan hücrelerinden ve organellerinden daha küçük olmasıyla birlikte enzim ve reseptörler gibi biyolojik makromoleküllerle yakın ölçülerdedir, örneğin hemoglobin yaklaşık olarak 5 nm, hücreleri çevreleyen 2 katmanlı lipid yapı 6 nm çap kalınlığına sahiptir ve 20 nm'den daha küçük olan nanopartiküller damar duvarından geçebilirler (McNeil, S. E., 2005). Nano boyuttaki partiküllerin biyomoleküllerle konjuge olup hedefe yönelik ilaç

taşıyımını sağlama ve olası yan etkileri minimize etme, benzer boyuttaki reseptör benzeri biyomoleküllere bağlanma, optik özellikleri neticesinde biyogörüntüleme de kullanılma avantajları bulunmaktadır (Shwetha, K., & Deveswaran, R., 2019).

Biyolojik hedefe yönelik olması için, biyolojik ya da moleküler kaplamanın veya biyoinorganik arayüz işlevi görecektir bir katmanın nanopartiküle eklenmesi gerekmektedir. Kaplamalar antikoru veya kolajen gibi biyopolimerleri ya da nanopartikülü biyoyumlu hale getirecek küçük moleküllerden oluşan tek katmanları içerebilmektedir. Nanopartiküller genellikle çekirdekte nano-biyomateryal olacak şekilde, moleküler formlar için uygun bir yüzey, inorganik ve polimerik materyallerin birleşimi olarak ya da vezikül şeklinde membran veya katmanla kaplı halde kullanılmaktadırlar. Çekirdek madde genellikle iç materyaller veya birçok tek katmanla korunmaktadır (Salata, O. V. (2004).

Nanopartiküller basit moleküller değildir ve genel olarak üç katmandan oluşmaktadır; birincisi yüzeyde küçük moleküllerle, metal iyonlarıyla, sürfaktanlarla, polimerlerle fonksiyonel hale getirilmiş tabaka, ikincisi kabuk kısmında merkez kısmından kimyasal olarak tamamen farklı materyalden oluşan tabaka ve üçüncü olarak merkezde nanopartikül kendisi bulunmaktadır (Khan, I., Saeed, K., & Khan, I., 2019).

### **2.3.1 Nanoteknolojide yara iyileştirme uygulamaları**

Yaralar, normal anatomik epital doku bariyerlerinin incinmesi, dokunun kesilmesi veya yanması gibi sebeplerden oluşan bozulmalar sonucu meydana gelmektedir. Bazı yaralar zamanında iyileşme göstermeyerek kronik hale gelebilmektedir, bunun nedeni diyabet, çevresel damar hastalığı veya enfeksiyonlardan kaynaklanabilmektedir. En iyi tedavi yöntemi yaralı bölgeye yeni dokunun nakledilmesidir fakat bu da donör yönünden sıkıntılı olabilmektedir, bu şartlarda doku yerine geçecek tasarlanmış dokular alternatif olabilmektedir lakin her halükârda doku iyileşmesi için tedavi strajelerinin geliştirilmesi gerekmektedir (Naderi et al., 2018).

Yara iyileşmesi karmaşık bir süreçtir ve iltihaplaşma, proliferasyon ve yeniden yapılanma fazlarından oluşmaktadır, fazlar arası ilerleme ise büyüme faktörleri, sitokinler ve hücresel elementlerle sağlanmaktadır (Blecher et al., 2012). İyileşmenin karmaşık sürecinin arasına ise geciktirmek için birçok faktör dahil olabilmektedir bu da hastalık oranını ve ölümü arttırabilmekte, görünüş açısından da hastalardaki stresi beraberinde getirmektedir. Daha büyük bir pencereden baktığımızda ise iyileşme; yara boyutu, derinliği, bölgesi, hastanın yaşı, bölgesel veya sistemsel hastalığın varlığı gibi çeşitli faktörlere de bağlıdır. Diğer faktörler ise; beslenme şekli, bağışıklık sisteminin seviyesi, sigara kullanımı, diyabet, obezite, hipertansiyon olabilmektedir, yaşlı ciltlerde ise mikrosirkülasyonun düşük olması iltihaplaşmaya verilen tepkiyi geciktirebilmektedir (Paladini, F., & Pollini, M., 2019).

Etkili ve kontrollü yara iyileşme sürecinde çok sayıda hücre sinyal olayının gerçekleşmesi gerekmektedir, hasar sonrası verilen tepkiyi başlatma, destekleme ve düzenlemede sitokinler çok önemli bir yere sahiptir, sitokin IL-6'nın da fibroblast proliferasyonunu desteklediği bilinmektedir, T lenfositleri tarafından üretilen interferonlar da yara bölgesinin yeniden yapılanmasında önemli bir rol oynamaktadır (Tian et al., 2007).

Nanoteknolojinin malzeme alanında kullanımıyla birlikte biyolojik uygulamalarda kullanımı da oldukça yaygın bir hal almıştır. Eşsiz yüzey, optik ve elektronik özellikleri nedeniyle biyomedikal alanlar için gen transferinde ve ilaç taşınımında kullanılan altın nanoparçacıkların deri lipitleriyle olan nano-biyo etkileşimi sayesinde deri bariyerleriyle penetrasyonu da son zamanlarda kanıtlanmıştır bu da antioksidanlarla birleştirilerek bölgesel uygulamalarda absorpsiyonu arttırmasına yönelik çalışmalarda kullanılmasına yol açmıştır (Leu et al., 2012).

Büyüme faktörlerinin yaralarda lokal uygulanması, sızıntılar ve kısa yarılanma ömürleri nedeniyle verimli olamamakta bu da araştırmacıları terapötik ajanları taşıyan ve kontrollü salınımlarını sağlayarak matriksteki enzimatik degradasyondan ve inaktivasyondan koruyan nanopartikül sistemlerine yönlendirmiştir. Kontrollü salımın bazen mümkün olamaması veya salımın henüz

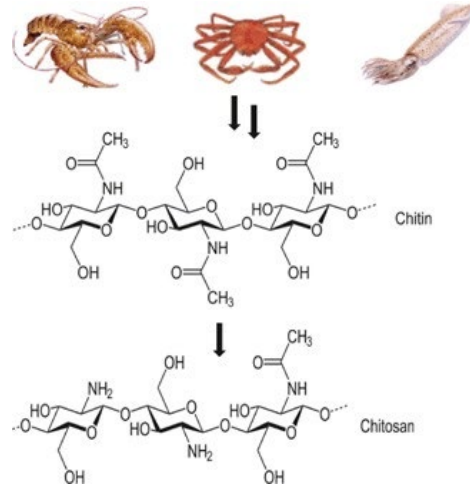
ilk aşamada patlayarak gerçekleşmesi nedeniyle büyüme faktörleri yüklenmiş nanopartiküllerin fibrin bazlı polimerik iskele üzerine inkorporasyonu ile yapılan çalışmada da polimerik nanopartiküllerin biyoaktif büyüme faktörlerini korumada güçlü bir araç olabileceği sonucuna ulaşılmıştır (Losi et al., 2013).

Yaranın, mikrobiyal büyüme ortamına yol açması, antimikrobiyal ajanların kullanımına yol açmış lakin bu ajanların toksik etkileri, eksik antimikrobiyal içeriği, yara ile yetersiz penetrasyonu ve gittikçe büyüyen bakteri direnciyle karşılaşılması nedeniyle faydalı olamamaları da nanopartiküllerle enkapsülasyonu ve etkili bir şekilde taşınımını sağlayarak elimine edilmeye çalışılmıştır. Nanopartiküllerin küçük boyutları ve yüksek yüzey-hacim oranları hücre bariyerlerini geçmesini ve bölgesel ilaç taşınımını kolaylaştırmaktadır. (Krausz et al., 2015).

## 2.4 Kitosan

Kitosanın tarihçesine baktığımızda deasetile formu karşımıza 1859 yılında çıkmakta ve doğada bulunan kaynaklardan elde edilen bu polimerle yapılan uygulamalar birçok yayında yer almaktadır. Son yıllarda ise farmasötik ve ilaç salımı alanındaki uygulamaları, absorpsiyonu arttırması, kontrollü salım ve biyoadezyon özellikleri nedeniyle dikkat çekmektedir (Dodane, V., & Vilivalam, V. D., 1998).

Kitin ve kitosan doğada bolca bulunan ve yenilenebilen polimerlerdir, biyobozunur, biyoyumlu, non-toksik, adsorbe etme vb. özelliklere sahiptirler. Kitin ve kitosan birçok canlı organizmayı destekleyen polisakkaritlerdir, kitin yengeç, ıstakoz, karides gibi omurgasız hayvanların iskelet maddesidir ve bunların kabuklarından elde edilir, su ürünleri, tekstil, gıda ve ekoloji sektörleri açısından yenilenebilir ve atık sıkıntısı olmayan bir kaynaktır (Kumar et al., 2004).



Şekil 2.2 Kitin ve kitosanın prosesi

Kitinin yapısında bulunan hidrojen bağlarının fazlalığı, bu yarı kristal maddenin inatçı ve çözilemeyen yapısını kanıtlar niteliktedir. Kitosan kitinin asetil grubu elimine edilmiş ve %7 daha fazla nitrojen içeren, asetilasyon derecesi 0,40'tan daha az olan formudur (Muzzarelli, R. A. A., & Muzzarelli, C., 2005). Kitinin deasetilasyonu ile elde edilen kitosan glukozamin ve N-asetilglukozaminden oluşan bir kopolimerdir (Şekil 2.2). Kitosanın fiziksel özellikleri; moleküler ağırlığı, amino ve asetomido gruplarının dizilimi, materyalin saflık oranı gibi parametrelere bağlıdır (Pillai et al., 2009).

Kitosan, poli-( $\beta$ -(1,4)-2-amino-2-deoksi- $\beta$ -D-glukopiranoz, kitinin {(1 $\rightarrow$ 4)-linked 2-acetamido-2-deoxy- $\beta$ -D-glucan} (Hirano et al., 1990) aksine birçok organik ve inorganik asitlerin sulu çözeltilerinde kolaylıkla çözünmektedir. Bu da dünya genelinde ilgi çekmesine neden olmuş, kimyasal ve biyokimyasal reaksiyonlara girme eğiliminin de kitinden daha fazla olmasıyla, endüstride; antimikrobiyal, biyomedikal materyal, kozmetik ürünü, gıda katkı maddesi, seperatör, ziraat malzemesi olarak kullanılmasına yol açmıştır (Ogawa et al., 2004).

Kitosanın eşsiz polikatyonik doğası, birçok alanda kullanımını sağlamaktadır, bunlardan biri de antibakteriyel ve antifungal aktivitelere kendisinin ve türevlerinin yol açmasıdır. Geniş aralıktaki bakteri ve maya türlerinin popülasyonlarının büyümesi ve yayılımını inhibe etmekte ve diğer dezenfektanlara göre yüksek bakteri aktivitesini baskılaması, yüksek ölüm oranını sağlaması ve memeli

hücrelerinde düşüş toksisite göstermesi avantaj sağlamaktadır (Fei Liu et al., 2001).

Nanopartiküllerin küçük boyutta ulaştıkları eşsiz özelliklerinin kitosanın nanopartikül formunda aktivitelerini genişletebileceği düşünülmüş ve çeşitli çalışmalarda kullanılmıştır (Qi et al., 2004).

Kitosan nanopartiküllerin sentezi aşağıdan yukarıya ve yukarıdan aşağıya teknikler olmak üzere iki gruba ayrılmıştır; aşağıdan yukarıya olan teknik molekül veya atomların büyük nano ölçekteki bileşimlerin içinde kendi kendilerine bağlanmasına, yukarıdan aşağıya olan teknik ise büyük bileşimlerin dış kaynaklı fiziksel veya kimyasal kuvvetle daha küçük ölçekteki bileşimlere ayrılmasına dayanır. Kitosan nanopartiküllerin güncel olarak sentezlenmesinde en çok kullanılan teknik aşağıdan yukarıya olan, anyonik çapraz bağlayıcı olan tripolifosfat (TPP) ile kitosanın kendi içlerinde bağ oluşturarak, kitosan nanopartiküllerine dönüştürülmesine dayanmaktadır (Sullivan et al., 2018).

Kitosanın katyonik aminogrupları, metal anyonlarıyla veya sülfat, sitrat ve fosfat gibi çoklu yüklenmiş küçük anyonik moleküllerle birleşebilmektedir. Partikülün bu formu iyonik jelleşme yönteminin kullanımına elverişli olmaktadır, bu prosesin basit olması, organik solventlerin ve yüksek sıcaklıkların kullanımından kaçınılması da protein gibi hassas maddelerin enkapsülasyonunu olanaklı hale getirmektedir (Rampino et al., 2013).

Nanopartiküllerin biyomedikal uygulamalarda sağladığı avantajlar ilaçların hedeflenen bölgedeki etkisini arttırmasıyla bilinmektedir, eşsiz fizikokimyasal özelliklere sahip olan kitosan nanopartiküllerine bu avantajı küçük partikül boyutu, yoğun yapısı ve geniş yüzey alanı sağlamaktadır. Kitosan nanopartiküllerinin sentezlenme yöntemlerine baktığımızda, iyonik jelatlama yöntemi, yapılışının kolaylığı ve partikül boyutunun optimize edilip epital membrana penetrasyonuna olanak sağlamasıyla bilinen, polimer bazlı nanopartiküllerin polimer zincirlerinin kovalent bağlarla çapraz bağlayıcı sayesinde bağlanması işlemidir (Anand et al., 2018).

## 2.4.1 Kitosan nanoparçacıklarının karakterizasyon yöntemleri

### 2.4.1.1 Dinamik ışık saçılımı

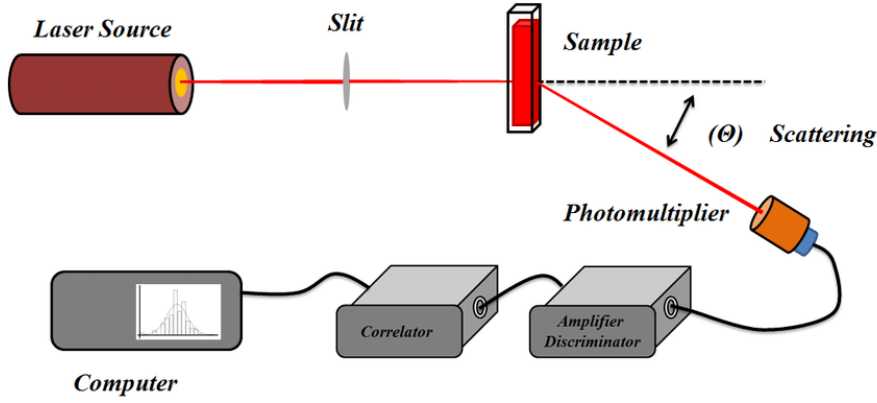
Dinamik ışık saçılım (DLS) metodu partikül boyutunu, solüsyon içindeki partikülün Brownian difüzyonu ile tahmin etmesine dayanmaktadır. Az miktarda örneğin yeterli olması, örneğin cihaz tarafından analizinin kısa sürede olması, 10 µm den başlayan dinamik aralığı kapsaması, çeşitli solventlerle tekniğin uyumlu olması DLS'yi rutinde kullanımda hızlı bir ölçüm karakterizasyon yöntemi yapmaktadır (Modena et al., 2019).

Nanopartikülün karakterizasyonunda boyut ve yüzey yükünün tanımlanması kaçınılmazdır. Zeta potansiyeli (ZP) elektrik alan altında hareket eden kolloid partikülün kayan yüzeyindeki elektrokinetik potansiyel olarak da bilenen potansiyel türüdür. ZP'nin en yaygın kullanımı kolloid partikülün stabilitesini öğrenmemizi sağlaması üzerinedir. Nanopartikülün ZP ölçümünde alınan sonuçların stabilitesi sınıflandırılmıştır;  $\pm 0-10$  mV aralığı stabil değildir,  $\pm 10-20$  mV stabiliteye yakındır,  $\pm 20-30$  mV aralığı stabildir,  $> \pm 30$  mV aralığı oldukça stabildir. Bu potansiyel, elektroforez ile mobil halde olan nanopartikülün elektrik çift tabakasıyla, onu çevreleyen dispersantın tabakası arasında kayan yüzeydeki potansiyel farkıyla oluşmaktadır (Bhattacharjee, S., 2016).

Foton korelasyon spektrometresi olarak da bilinen DLS, solvent moleküllerinin bombardımanı ortaya çıkan solüsyon içindeki makromoleküllerin Brownian hareketinin ölçülmesi tekniğidir ve bu hareket partikülün boyutuyla ilişkilidir, makromolekülün bu hareketi boyutuna, sıcaklığa ve solvent viskozitesine bağlıdır, doğru sıcaklık DLS ölçümlerinde önemlidir çünkü solventin viskozitesi de sıcaklığa bağlıdır. Partikülün hareketine bağlı olarak monitöre yansıtılarak, partikülün boyut bilgisi elde edilebilmektedir (Stetefeld et al., 2016).

DLS ölçümü sırasında süspansiyon içindeki nanopartikül ışık demetlerine (elektromanyetik dalga) maruz bırakılmakta ve ışığın nanopartiküle çarpma olayı gerçekleştiğinde ışık demetlerinin yönü ve yoğunluğu değişerek saçılım dediğimiz olay gerçekleşmektedir (Şekil 2.3), nanopartikülün kinetik enerjisinden kaynaklı

olarak sürekli rastgele hareketi ve yoğunluğunun zamanla değişimi, bu rastgele hareketin bize verdiği bilgiyle partikülün difüzyon katsayısının ölçümü mümkün olmaktadır. Stokes Einstein denklemiyle, küre şeklindeki partiküllerin hidrodinamik çapı, difüzyon katsayısıyla bulunabilmektedir.



Şekil 2.3 DLS çalışma mekanizması

Stokes Einstein denklemi;

$$Df = kBT / 6\pi\eta RH ,$$

kB : Boltzman sabiti

T : Süspansiyonun sıcaklığı

$\eta$  : Viskozite

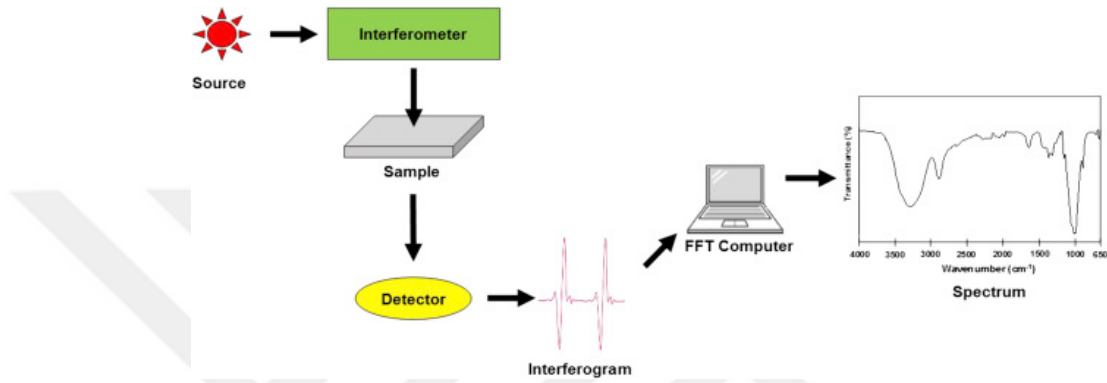
DLS ile ölçüm yönteminin basit olması ve otomatik bir şekilde gerçekleşmesi, koyulan örneğin tekrardan başka amaçlar için kullanılabiliyor olması avantaj sağlamaktadır (Lim et al., 2013).

#### **2.4.1.2 Fourier dönüşümlü kızılötesi spektrofotometresi**

Moleküler türlerin tanımlanması ve örnek içerisindeki konsantrasyonlarının belirlenmesi kızılötesi spektroskopi analizlerinin esas kısmıdır. Kızılötesi (IR) ışık bandının küçük absorpsiyon katsayısına sahip olması, tekniğin hassasiyetinin

genel olarak yüksek olmamasına ve sonuçlanan deteksiyon limitinin oldukça yüksek olmasına neden olmaktadır.

IR'nin diğer tekniklere göre en büyük avantajı homonükleer diatomik moleküllerin ( $N_2$ ,  $O_2$ ,  $H_2$ , vb.) hepsinin IR absorpsiyonu göstermesi ve analiz edilebilmesidir, ayrıca IR temassız, yıkıcı olmayan karakterizasyon tekniğidir, uzaktan ve yakından deteksiyon olanağı da mümkündür (Bacsik et al.,2004).



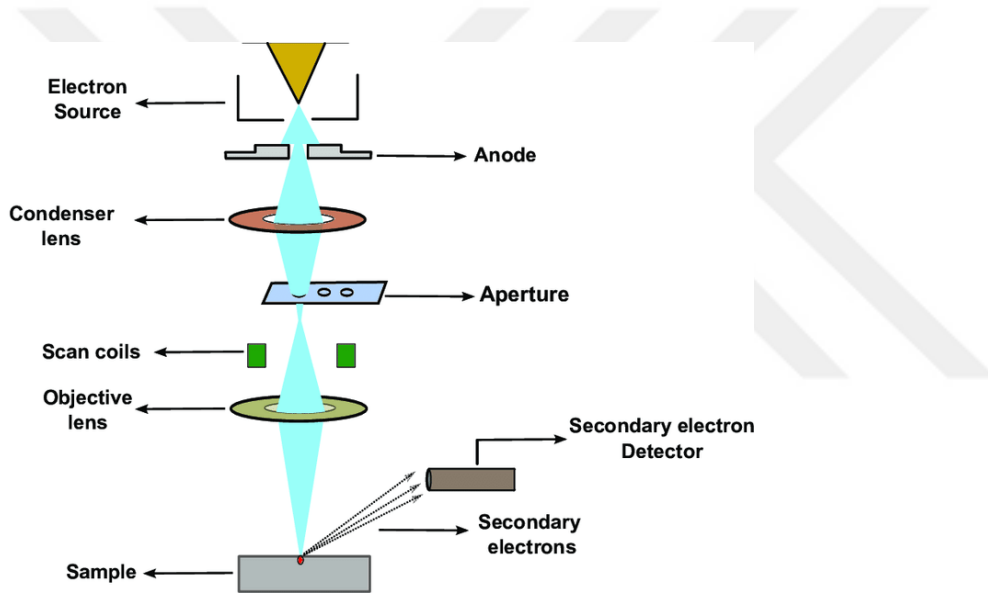
Şekil 2.4 FTIR çalışma mekanizması

Bileşiğin absorpsiyon spektrumunu tanımlayan karakterizasyon cihazlarına spektrofotometre denir, fourier dönüşümlü kızılötesi spektrofotometresi (FTIR) geleneksel spektrofotometreler ile kıyaslandığında daha hızlıdır. Şekil 2.4' te görüldüğü üzere cihazın ürettiği IR ışınlarından oluşan demet spektral kodlamanın yer aldığı interferometrenin içinden geçer ve içeride yol adıkları farklı uzunlukların rekombinasyonu, yapıcı ve yıkıcı interferanslar yaratarak interferogramları oluşturur, daha sonra örneğe yönlendirilir ve örnek bu demetlerden spesifik frekanstaki enerjiyi absorbe eder, bu frekans örneğin karakterine özgüdür, detektör bütün frekansları, enerji ve zaman karşılığına göre spesifik interferogram sinyallerini baz alarak ölçer. Bu sırada cihaz işlemleri için ışın demetleri birleştirilerek background oluşturulur. Sonuç olarak istenen spektrum, backgroundun spektrumu örneğin spektrumundan Fourier dönüşümlü bilgisayar yazılımı sayesinde çıkartılarak, elde edilir (Mohamed et al., 2017).

### **2.4.1.3 Taramalı elektron mikroskobu (SEM)**

Taramalı elektron mikroskobu (SEM), mikro yapıların morfolojisini ve kimyasal bileşimlerinin karakterizasyonunu analiz ve tetkik etmede en yaygın kullanılan çok amaçlı cihazlardan biridir (Zhou, W., & Wang, Z. L. (Eds.), 2007).

Elektron kaynağında oluşturulan elektron demetleri pozitif elektrik potansiyeli kullanılarak örneğe doğru ivmelendirilerek gönderilir, örneğin atomlarıyla etkileşime geçen elektronlar sinyal oluşturur (Şekil 2.5) ve bu sinyaller örneğin yüzey topografisi, bileşimi ve diğer elektriksel özellikleri hakkında bilgiler içerir, tespit edilen bilgiler görüntüye dönüştürülür (Kannan, M., 2018).



Şekil 2.5 SEM çalışma mekanizması

Birincil elektronların örnekle etkileşiminden ortaya çıkan sinyalden en çok kullanılanı, ikincil elektron emisyon sinyalidir, birincil elektron örnek yüzeyine çarpıp örneğin atomlarının iyonize olmasına yol açarken, gevşek bir şekilde saçılan elektronlar yayılarak ikincil elektronları oluşturur, düşük enerjiye sahip oldukları için örnek yüzeyinin içinden sadece birkaç nanometre uzağa kaçabilir, bu sayede elektron demetlerinin pozisyonunun belirlenmesinde ve iyi çözünürlükte topografik bilgi vermede kullanılır ve görüntü detektöre ulaşan ikincil elektronun miktarına bağlıdır (Zhou et al.,2006).

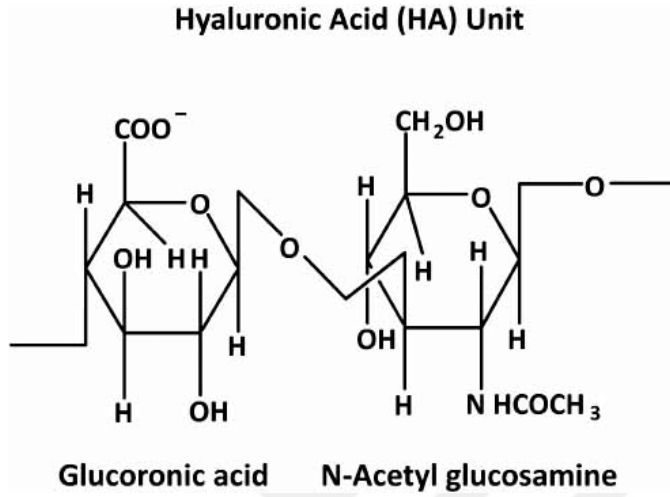
## 2.5 Hyaluronik Asit

Hyaluronik asit (HA) ilk olarak gözün retina ile çevrili olan boşluğunu dolduran pelte koyuluğundaki saydam ve renksiz sıvı içerisinde 1934'te keşfedilmiş, sonrasında *in vitro* olarak 1964 yılında sentezlenmeye başlamıştır. Hyaluronik asit temelde iki şeker bileşeninden oluşmaktadır (Şekil 2.6), bunlar; glukuronik asit ve N-asetilglukozamindir, bu iki yapının oluşturduğu birimin 3000000 tekrar yaparak polimerizasyonu ile daha büyük makromolekül haline gelmesi, ekstraselüler matriksin (ECM) en büyük bileşeni olan hyaluronik asiti oluşturur (Price et al., 2007). Mukopolisakkarit olan HA intraselüler matrikste de gözlenmiştir ve bütün canlı organizmalarda kendiliğinden üretilmektedir, başka bir moleküle bağlanmadığı takdirde suya bağlanarak aldığı vizkoz yapıyla jöle kıvamına yakın bir hale gelmektedir. Biyolojik yapılarıdaki fonksiyonları, göz ve eklemler gibi sıvıyla bağlı dokuların elastoviskoz davranışlarının korunmasında, doku hidrasyonun kontrolünde ve su transportunda, ECM içerisindeki proteoglikanların birleştirilmesinde, reseptör aracılı sayısız hücre ayrılmasında, mitozda, migrasyonda, tümör gelişimi ve metastazında, enfeksiyonlarda rol almaktır (Necas et al., 2008).

Polisakkarit olması, proteinlerin aksine non-antijenik özelliğe sahip olması potansiyel kullanımları açısından önem kazanmaktadır, fizyolojik koşullar altında negatif yüklü olması ve rastgele sarılı bir polimer olması, moleküler ağırlığı ve bileşiminin beklenenden bin kat daha fazla hacme ulaşabilmesini sağlayabilmektedir, yapısında bulunan çok sayıda negatif yük, su ve katyonları çekerek sulu jel formunu almasını sağlayarak yapısına viskoelastik ve şok emici özellikler kazandırmaktadır. HA'nın vücuttaki devinimi çok hızlıdır ve günde vücutta bulunan HA'nın üçte biri döngüsünü tamamlamaktadır, yarı ömrü bulunduğu dokuya bağlı olarak değişmektedir, epidermiste bir günden daha az, kanda birkaç dakika, kıkırdakta 2-3 haftadır (Ward et al., 2002).

D-glukoronik asit ve N-asetil-D-glukozaminin  $\beta$ -glikozidik bağlarla bağlanmasıyla oluşan HA, sellüler membranın iç yüzeyinde HA sentetaz tarafından sentezlenir ve ekstraselüler boşluğa doğru translokasyonu polimer zincirin uzamasıyla gerçekleşir, bu eşsiz sentez şekli HA'ya özgüdür, intraselüler

membranda sentezlenen diğer glukozomینگlukoganlarda (GAG) gözlenmez ayrıca merkez proteine bağlanmayan tek GAG'dır ve sentez sonrası modifikasyona uğramaz. Doğal halinde hyaluronik asit, yüksek moleküler ağırlıklı olarak bilinen uzun bir polimerdir fakat belirli koşullar altında düşük moleküler ağırlıklı olarak bilinen daha küçük birimlerine ayrılabilir (Litwiniuk et al., 2016).



Şekil 2.6 Hyaluronik asit molekülünün yapısı

Yetişkinlerde yara iyileşme prosesi fibrosis ve yara dokusunu kapsayarak deformasyonun yıkıcı sonuçlarına yol açabilmektedir lakin fetal yara iyileşmede bu kısımlar yoktur ve proses ekstrasellüler matris çevresinde şekillenir, fetal ECM, HA açısından zengindir ve herhangi hücre hareketinde veya proliferasyonunda yüksek konsantrasyonlarda bölgede bulunduğu tespit edilmiştir ayrıca HA'nın postnatal yara iyileşmesini arttırdığı ve tendon onarımından sonra adhezyonu düşürdüğü gözlenmiştir bu da ECM'in HA açısından zengin olmasının yara onarımında özellikle yara dokusu oluşmadan çok seçenekli olanakları sağlayan bir çevre yarattığını ve fetal yara iyileşmesinin eşsiz özelliklerinin buradan geldiği gerçeğini benimsetmiştir (Longaker et al., 1991).

İyileşmesi geciktiği gözlenen yaralar daha sonra akuta dönüşebilmekte ve bu istenmeyen durum yara dokusunun oluşmasına yol açmaktadır. Hyaluronik asit iyileşme prosesinin her basamağında rol almaktadır. İnflamasyon fazında lezyon bölgesine doğru hücre (lenfosit, fibroblast, polinükleer nötrofil) migrasyonunu aktive etmektedir, proinflamatuvar sitokinleri üreterek ve anjiyogenezi uyarak da

inflamasyonu kontrol etmektedir. Granülasyon fazında fibroblast, endotel hücrelerinin migrasyonunu ve proliferasyonunu, kolajenin sentezini sağlayarak onarım mekanizmasını hızlandırmaktadır (Voinchet, V., Vasseur, P., & Kern, J., et al 2006).

Eşsiz moleküler yapısı nedeniyle HA çeşitli molekül ağırlıkları içerisinde toplanabilir, liyofilize edilerek veya esterleştirilerek sünger ve membran gibi farklı yapıdaki konfigürasyonların içinde yer alabilir ve bu yapıların biyodegradasyonu liyofilize veya esterleşme derecelerinin değiştirilmesiyle manipüle edilebilir bu da yeniden emilebilir transplantasyon malzemesi olarak kullanılmasına olanak sağlayabilmektedir (Pirnazar et al., 1999).

## **2.6 Kitosan ve Hyaluronik Asitin Bu Çalışmadaki Yeri**

Kitosan biyobozunur ve biyouyumlu yapısıyla yara iyileşme ve kontrolü alanında yaygın bir şekilde kullanılmaktadır, özellikle yapısının diğer polimerlerle kombine olmaya elverişli olması kitosan bazlı malzemelerin dikkat çekmesini sağlamıştır. Diğer özellikleri bir yana antibakteriyel özelliğe sahip olması kitosanı yara iyileşme modellerinde kullanmak için gerekli hale getirmiştir. Hyaluronik asit, deri ECM'sinin majör yapılarından biridir ve su tutma kapasitesi ile nemli bir bölge sağlayarak yaralı dokunun kurumasını önleyerek iyileşmeyi destekler ayrıca yaralı bölgedeki fibroblast proliferasyonunu arttırarak kolejen salgılanmasını arttırır (Mohandas et al., 2015).

Hyaluronik asitin suda çözünabilir olması polimerin doku mühendisliği alanında geliştirilmesine engel olmaktadır, saflaştırılmış kâğıt HA bile en ufak suyla temasıyla sıvılaşmaktadır, bu problem nedeniyle HA'nin modifikasyonu kaçınılmazdır (Price et al., 2005). Kitosanın hassas bir yapıya sahip olması da diğer biyopolimerlerle konjuge edilerek kullanılmasını gerektirmektedir (Sanad&Abdel-Bar, 2017). Kitosan ve hyaluronik asit nanopartiküllerini sentezlemeyi hedeflememizdeki amaç, iki biyopolimerin eksik yönlerini elimine etmek ve daha stabil yapıda bir nanopartikül sistemi oluşturmaktır, bu şekilde antimikrobiyal ve biyouyumlu özelliklerinden yararlanarak bu çalışmadaki hipotezimizde, yara iyileştirme prosesini olumlu yönde tetikleyeceğini yaptığımız araştırmalar

neticesinde öngörerek, tez çalışma şemamız bu materyaller çerçevesinde oluşturulmuştur.

## **2.7 Hücre Kültürü**

Hayvan hücre kültürü, biyokimyasal ve fizyolojik proseslerin çalışmalarında gerekli olan bir laboratuvar tekniği haline gelmiştir. Aynı yapıdaki hücre popülasyonlarının çeşitli jenerasyonlardan kontrollü bir şekilde temin edilebiliyor olması, çalışmalarda hayvan dokularının kullanımına önemli bir alternatif olmaktadır (Butler, 2004).

Hücre kültürü, standart hücrelerin fizyoloji ve biyokimyasında çalışmalar yapılmasını sağlayan uygun bir model oluşturmaktadır, bu çalışmalara ilaçların ve toksik bileşenlerin hücreler üzerindeki etkisi örnek verilebilir (Antoni et al., 2015). Bu çalışmada da zoledronik asit, hyaluronik asit ve kitosan-hyaluronik asit nanopartiküllerinin hücreler üzerindeki etkileri incelenmiştir.

### 3. GEREÇ VE YÖNTEM

#### 3.1 Kullanılan Kimyasallar

- HGF-1 İnsan gingival fibroblast (American Type Culture Collection, Rockville, MD, ABD)
- HaCat İnsan keratinosit hücreleri (American Type Culture Collection, Rockville, MD, ABD)
- Saos-2 İnsan osteosarkoma hücreleri (American Type Culture Collection, Rockville, MD, ABD)
- Dulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM) (Cegrogen Biotech)
- Dulbecco's Modified Eagle Medium/Nutrient Mixture F-12 (DMEM/F-12) (Cegrogen Biotech)
- L-Glutamin (Cegrogen Biotech)
- Sodyum Pirüvat (Cegrogen Biotech)
- Fetal Bovin Serum (FBS) (Cegrogen Biotech)
- Penisilin/Streptomisin (Cegrogen Biotech)
- Trypan Blue (Cegrogen Biotech)
- Phosphate Buffer Saline (PBS) (Cegrogen Biotech)
- Tripsin-EDTA (Cegrogen Biotech)
- Chitosan (Sigma-Aldrich)
- Zoledronic acid monohydrate, 95% (Sigma-Aldrich)

- Hyaluronic acid sodium salt from *Streptococcus equi* (Sigma-Aldrich)
- Tripolifosfat (TPP) (Sigma-Aldrich)
- Acetic acid (CH<sub>3</sub>COOH) (Sigma-Aldrich)
- Sodium hydroxide (NaOH) (Sigma-Aldrich)
- Cell Counting Kit-8 (WST-8) (Sigma Aldrich)
- Muse Annexin V/Ölü Hücre Test Kiti (Muse Annexin V & Dead Cell Kit) (Millipore)

### 3.2 Kullanılan Cihazlar

- Taramalı Elektron Mikroskobu (SEM, Scanning Electron Microscopy) (Quanta 250FEG) [Izmir Yüksek Teknoloji Enstitüsü, Malzeme Araştırma Merkezi (IYTE-MAM)]
- Liyofilizatör (Ege Üniversitesi, Nükleer Bilimler Enstitüsü, Nükleer Uygulamalar Anabilim Dalı)
- Zetasizer (Malvern Nano-ZS) (Ege Üniversitesi, Nükleer Bilimler Enstitüsü, Nükleer Uygulamalar Anabilim Dalı)
- HPLC (Shimadzu SCL-10AVP) (LC-10Atvp quaterner pompalı, SPD-10AV UV dedektörlü) (Ege Üniversitesi, Nükleer Bilimler Enstitüsü, Nükleer Uygulamalar Anabilim Dalı)
- Multimode Mikroplaka Okuyucu (Thermo Varioscan Flash) (Ege Üniversitesi, Nükleer Bilimler Enstitüsü, Nükleer Uygulamalar Anabilim Dalı)
- Fourier Dönüşümlü Kızılötesi Spektroskopisi Cihazı (FTIR, Fourier Transform Infrared Spectroscopy) (Perkin-Elmer Spectrum 100 FT-IR)

(Ege Üniversitesi, Nükleer Bilimler Enstitüsü, Nükleer Teknoloji Anabilim Dalı)

- Işık Mikroskobu (Olympus) (Ege Üniversitesi, Nükleer Bilimler Enstitüsü, Nükleer Uygulamalar Anabilim Dalı)
- Inverted Mikroskop (Leica) (Ege Üniversitesi, Nükleer Bilimler Enstitüsü, Nükleer Uygulamalar Anabilim Dalı)
- Class II Laminar flow kabin (Thermo) (Ege Üniversitesi, Nükleer Bilimler Enstitüsü, Nükleer Uygulamalar Anabilim Dalı)
- CO<sub>2</sub> İnkübatörü (Sanyo) (Ege Üniversitesi, Nükleer Bilimler Enstitüsü, Nükleer Uygulamalar Anabilim Dalı)
- Soğutmalı Santrifüj (Hettich) (Ege Üniversitesi, Nükleer Bilimler Enstitüsü, Nükleer Uygulamalar Anabilim Dalı)
- Sıvı Azot Tankı (Thermo Scientific) (Ege Üniversitesi, Nükleer Bilimler Enstitüsü, Nükleer Uygulamalar Anabilim Dalı)
- Otoklav (Hirayama) (Ege Üniversitesi, Nükleer Bilimler Enstitüsü, Nükleer Uygulamalar Anabilim Dalı)
- Su Banyosu (Mettler) (Ege Üniversitesi, Nükleer Bilimler Enstitüsü, Nükleer Uygulamalar Anabilim Dalı)
- Muse Hücre Analiz Cihazı (Millipore) (Ege Üniversitesi, Nükleer Bilimler Enstitüsü, Nükleer Uygulamalar Anabilim Dalı)

### **3.3 Kitosan ve Kitosan-Hyaluronik Asit nanopartiküllerinin Sentezi**

Kitosan nanopartikülleri iyonik jelatlama yöntemiyle tripolifosfat anyonuyla birlikte sentezlendi. 3 mg/ml kitosan çözeltisi %2'lik asetik asit ile hazırlandıktan sonra manyetik karıştırıcıda 2 saat 480 rpm'de karıştırıldı akabinde 0,1 M NaOH

eklendi. Çözelti pH'ı ayarlandıktan sonra 0,6 mg/ml TPP çözeltisi damlalar halinde kitosan çözeltisine eklendi ve 1 saat karıştırıldı. Karıştırıcıdan alınarak 30 dakika ultrasonik banyoda sonikasyona maruz bırakıldı. Bu işlemten sonra santrifüjde 10.000 rpm'de yıkanarak süpernatantı uzaklaştırıldı, kalan çökelti liyafilizatörde kurutularak +4°C koşullarında saklandı. Kitosan-hyaluronik asit nanopartiküllerinin sentezlenmesinde de aynı yöntem kullanıldı. 1mg/ml HA çapraz bağlayıcı TPP ile birlikte kitosan çözeltisine eklenerek aynı aşamalar tekrarlandı.

### **3.3.1 Kitosan ve kitosan-hyaluronik asit nanopartiküllerinin karakterizasyonu**

Sentez ürünü olan kitosan ve kitosan-hyaluronik asit nanopartiküllerinin karakterizasyonu için nanopartiküller saf su ile seyreltilerek ependorf tüplere alındı ve ultrasonik banyoda oda sıcaklığında sonikasyona maruz bırakıldı. Ege Üniversitesi Nükleer Bilimler Enstitüsü'nde bulunan Zetasizer cihazı ile nanopartiküllerin boyutu, boyut dağılımları ve zeta potansiyeli ölçümleri kuvvet içinde 3 tekrarlı olmak üzere gerçekleştirildi. İzmir Yüksek Teknoloji Üniversitesi'nde bulunan Taramalı Elektron Mikroskobu ile de partüküllerin morfolojisi ve boyutu analiz edildi.

### **3.3.2 Sentez ürününün nicel analizi**

Son sentez ürünü olan kitosan-hyaluronik asit nanoparçacıklarında, senteze eklenen madde ile tepkimeye giren madde arasındaki farkı görebilmemiz açısından, 10.000 rpm'de santrifüj yapıldıktan sonra süpernatant ve yıkama çözeltisi alındı. HA'ya ait kalibrasyon eğrisinin oluşturulması amacıyla 5 farklı konsantrasyonda standart çözeltiler hazırlandı. Sentez ürünlerinin nicel analizinde Yüksek Performanslı Sıvı Kromatografisi (High Performance Liquid Chromatography, HPLC, Shimadzu SCL-10AVP) ve C-18 kolonu kullanıldı. Mobil faz A: %65 Asetonitril B: %35 Ultra Saf Su 1 mL/dakika akış hızında 24 °C'de, 62 bar koşulları altında HA için kalibrasyon eğrisi oluşturuldu, süpernatant ve yıkama sularındaki kitosan, TPP ve HA miktarı gözlemlendi, kalibrasyon eğrisinden faydalanılarak,

reaksiyona girmeyen HA miktarı, süpernatanttan kitosan ve TPP çıkarılarak tespit edildi.

Tablo 3.1 HPLC analizi koşulları

|                   |                                                             |
|-------------------|-------------------------------------------------------------|
| Kolon             | Nucleodur 100-5 RP-C18                                      |
| Sıcaklık          | 24°C                                                        |
| Akış Hızı         | 1 mL/dakika                                                 |
| Enjeksiyon Süresi | 10 dakika                                                   |
| Mobil Faz         | Solvent A (%65 Asetonitril)<br>Solvent B (%35 ultra saf su) |
| Enjeksiyon Hacmi  | 20 U1                                                       |
| Dalga Boyu        | 230 nm                                                      |

### 3.3.3 Yapısal analiz çalışmaları

Kitosan, kitosan nanopartikülü, hyaluronik asit ve kitosan-hyaluronik asit nanopartiküllerinin yapısal analizi, Ege Üniversitesi Nükleer Bilimler Enstitüsü'nde bulunan FTIR (Fourier Transform Infrared Spektroskopisi) (Perkin-Elmer Spectrum 100 FT-IR) cihazına örnekler yerleştirilerek elde edilen spektrumlar sayesinde gerçekleştirildi.

### 3.4 Hücre Kültürü Çalışmaları

Hücre kültürü çalışmalarında kullanılacak olan HaCaT ve HGF-1 hücreleri için %1 oranında L-glutamin, penisilin-streptomisin ve sodyum prüvat, %10 FBS (fetal bovin serum) içeren DMEM besiyeri, SaoS-2 hücreleri için aynı içerikteki DMEM-F12 besiyeri hazırlandı. Besiyerlerini içeren 75 cm<sup>2</sup> flasklarda, 37°C ve %5 CO<sub>2</sub> koşullarındaki inkübatörde bekletilen hücreler  $\frac{3}{4}$  oranında yüzeyi kapladıktan sonra, Thoma lamı ile hücre sayımı yapılarak çalışma için gereken hücre miktarı platelere ekildi.

Kalan hücreler inkübatöre kaldırılarak diğer çalışmalar için kullanıldı, kullanılmayan ve stoklanması gereken hücreler, %10 DMSO (dimetil sülfoksit)

içeren besiyerleri içerisinde kriyo tüplere alınarak -80°C'ye konuldu, uzun süre koruma için -196 °C sıvı azot tankı içine alındı.

### 3.4.1 Sitotoksisite çalışması

Hyaluronik asit ve kitosan-hyaluronik asit nanoparçacıklarının HaCat, Saos-2 ve HGF-1 hücreleri üzerindeki proliferasyonunu analiz etmek ve zoledronik asitin IC<sub>50</sub> değerini belirlemek amacıyla WST yöntemi kullanıldı. Proliferasyonu belirlemek için, kuyucuk başına 10<sup>5</sup> hücre/mL konsantrasyonunda olacak şekilde hücre süspansiyonu 96 well-platelere eklendi, kontrol grubu harici kuyucuklara çalışmalarda uygulanacak olan hyaluronik asit ve kitosan-hyaluronik asit nanoparçacık örnekleri eklendi ve her örnek 3 tekrarlı olacak şekilde hazırlandı. Hyluronik asit ve kitosan-hyaluronik asit nanoparçacıkları için 1, 3, 10, 30 ve 100 µg/mL konsantrasyonları kullanıldı. 24, 48 ve 72 saat olmak üzere plate setleri hazırlandı ve inkübe edildi.

İnkübasyon süreleri akabinde kuyucuklara 10 µL WST solüsyonu eklendi ve 4 saat inkübe edildi. Absorbans değerlerinin belirlenmesi için plateler 450 ve 690 nm dalga boyunda okutuldu ve elde edilen datalarda 3 tekrarlı her bir örneğin ortalaması alınarak kontrol grubuna göre proliferasyon oranı yüzdelik olarak hesaplandı.

Zoledronik asitin IC<sub>50</sub> değerinin hesaplanması için aynı prosedür uygulandı, ışığa hassas olduğu için sterilizasyon amacıyla filtreden geçirilen ZA' in 1, 3, 10, 30 ve 100 M'lık konsantrasyonları hazırlandı ve örnekler platelere eklendi. 24, 48 ve 72 saat inkübasyon sürelerinden sonra plateler okutuldu ve kontrol grubuna göre sitotoksisite yüzdesi hesaplandı.

Prolifesyonda kullanılan örnek konsantrasyonları incelendi ve proliferasyonun yüksek olduğu konsantrasyonlar belirlendi, her bir hücre için belirlenen IC<sub>50</sub> değerleriyle birlikte yüksek proliferasyon gösteren konsantrasyonlar birlikte hücrelere uygulandı ve WST analizleri gerçekleştirildi, alınan sonuçlar çerçevesinde apoptoz ve yara modelinde kullanılacak olan örnek konsantrasyonlar belirlendi.

### 3.4.2 Apoptozis çalışması

Kitosan-hyaluronik asit, hyaluronik asit ve zoledronik asit örneklerinin kombinasyonunun hücreler üzerindeki apoptotik etkileri Millipore Muse Hücre Analiz cihazı kullanılarak analiz edildi.

Canlı, erken/geç apoptotik ve ölü hücrelerin kantitatif analizi için Millipore Muse Hücre Analiz cihazında Muse Annexin V/Ölü Hücre Test Kiti (Millipore, Darmstadt, Almanya) kullanıldı.

Saos-2, HGF-1 ve HaCaT hücreleri apoptotik etkiyi belirlemek için 6 well-platelere  $5 \times 10^4$  hücre/3 mL olacak şekilde ekildi ve 24 saat inkübe edildi. Kontrol grubu, ZA, CHA+ZA ve ZA+HA olmak üzere 4 kuyuya örnekler eklendi ve 72 saat inkübe edildi. İnkübasyon sonunda hücreler üzerindeki besiyer kaldırıldı, PBS ile yıkandı, tripsinizasyon işlemi gerçekleştirildi ve yüzeyden alınan her bir hücre süspansiyonu falkon tüplere alınarak 1000 rpm'de 5 dakika santrifüj edildi. Üst faz uzaklaştırılarak geriye kalan hücre pelleti üzerine %1 FBS içeren 100 µL besiyer eklendi ve ependorf tüplerine aktarıldı. Muse Annexin V/Ölü Hücre Test Kiti reaktif maddesinden her bir tüpe karanlık koşullarda 100 µL eklendi ve oda sıcaklığında 20 dakika beklemeye bırakıldı ve ardından düşük hızda vortekslenerek cihazda analizi gerçekleştirildi. Kontrol grubu baz alınarak diğer grupların apoptotik etkileri belirlendi.

### 3.4.3 Yara modeli çalışması

Yara modeli çalışması için hücreler 24 well-platelere kuyu başı  $2.5 \times 10^3$  hücre/0.5 mL olacak şekilde eklendi ve 24 saat inkübe edildi. Plateler ışık mikroskopunda incelenerek %80 yüzeyi kapladığı emin olunduktan sonra kuyu tabanına yatay çizgi çekildi ardından örnekler eklenerek 30 dakika inkübe edildi. Smart fluorescent cell analyzer cihazında 3 tekrarlı her örneğin 0. Saatteki fotoğrafı çekilerek 4, 24, 28. saatler olmak üzere kontrol grubu kapanana kadar fotoğrafları çekildi. Görüntüler Image J programına aktarılarak, fotoğraflar üzerine ızgaralar eklendi ve yaranın zaman göre kapanma oranı hesaplandı.

### 3.4.4 İstatistiksel analizler

Hücre kültürü çalışmalarından elde edilen sonuçların istatistik analizleri GraphPad istatistik programı kullanılarak yapılmıştır. Her bir parametre için ortalama ve standart sapma değerleri hesaplanmıştır. Her bir parametre için elde edilen değerler arasında istatistiksel olarak anlamlı bir farkın olup olmadığını belirlemek için iki yönlü ANOVA analizi yapılmıştır. Analiz sonuçları değerlendirilirken değerler arasında 0,95 güven düzeyinde anlamlı bir farkın olup olmadığı P değerlerine bakılarak tespit edilmiştir. P değeri 0,05'den küçük olanlar anlamlı kabul edilmiştir.

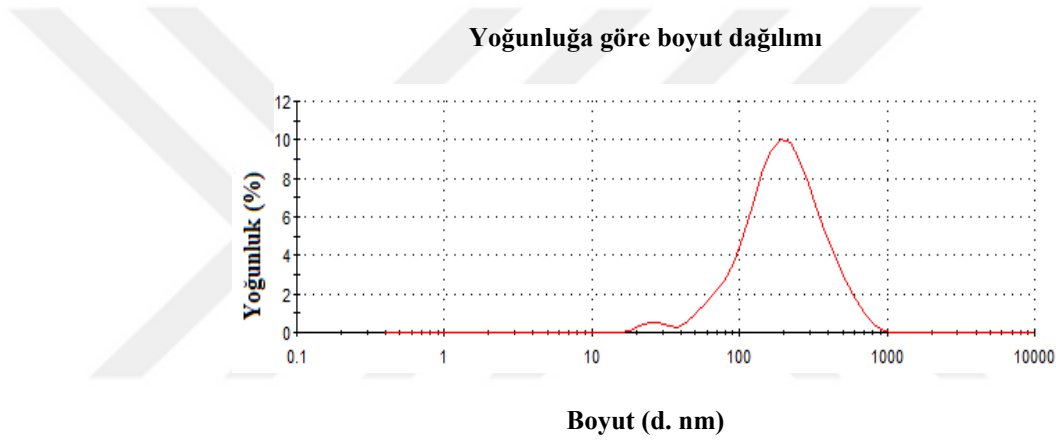


## 4. BULGULAR VE TARTIŞMA

### 4.1 Kitosan ve Kitosan-Hyaluronik Asit Nanoparçacıklarının Özelliklerinin İncelenmesi

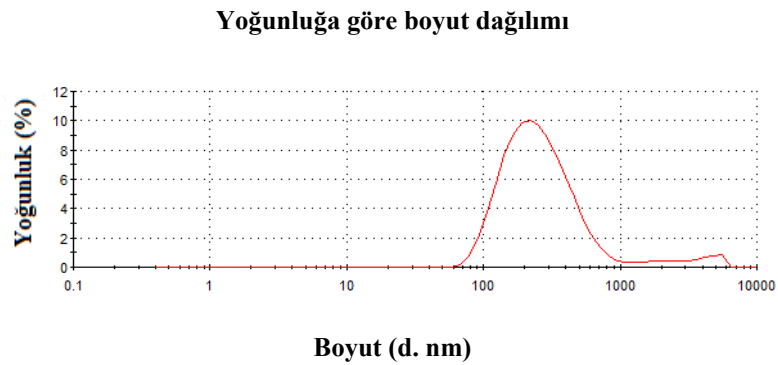
#### 4.1.1 DLS analiz sonuçları

Kitosan ve kitosan-hyaluronik asit nanoparçacıklarının boyutları ve zeta potansiyeli Zetasizer cihazında analiz edildi. Şekil 4.1’de kitosan nanoparçacıklarının boyut dağılım grafiğine göre, Z-average değeri  $154,1 \pm 22,18$  nm, PDI (polidispersite indeksi) değeri 0,325 olarak tespit edilmiştir.



Şekil 4.1 Kitosan nanoparçacık boyut dağılım grafiği

Kitosan-hyaluronik asit nanoparçacıklarının Z-average değeri  $224,1 \text{ nm} \pm 24,65$ , PDI (polidispersite indeksi) değeri 0,285 olarak tespit edilmiştir (Şekil 4.2).

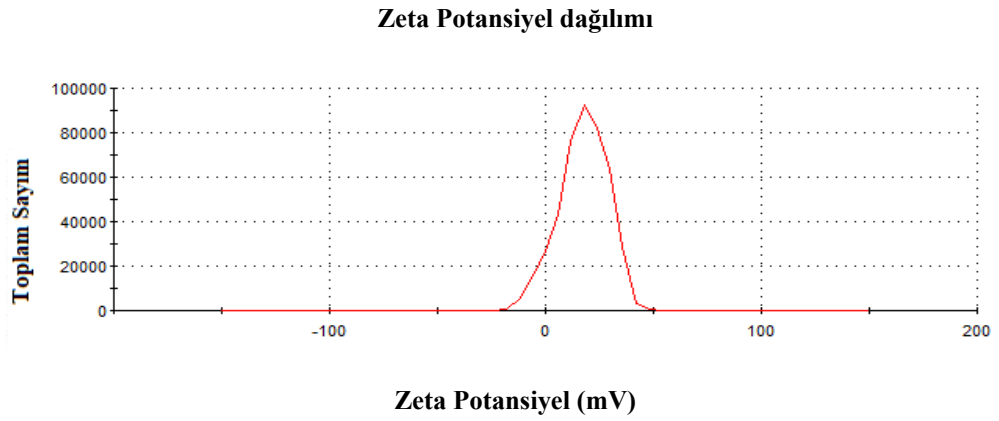


Şekil 4.2 Kitosan-hyaluronik asit nanoparçacıklarının boyut dağılım grafiği

Kitosan nanoparçacıklarının boyut dağılımında; ilk okumada dağılım alanı dar iken, ikinci ve üçüncü okumalarda agülasyonun artıp boyut dağılımı artmaktadır, kitosan ısıya hassas bir biyopolimer olduğu için ölçümler +4°C' de alınmış olmasına rağmen stabilitesini koruyamadığı sonucuna varıyoruz. Literatür bilgisine göre tek başına kullanılmadığı ve diğer maddelerle stabilitesinin arttırılması için beraber kullanıldığını da biliyoruz. Kitosan-hyaluronik asit nanoparçacıklarının boyut dağılımını incelediğimizde 3 tekrarlı okumada peak aralıklarında büyük farklılıklar bulunmadığını söyleyebiliriz, burdan kitosan-hyaluronik asit nanoparçacıklarının, kitosan nanoparçacıklarına göre daha stabil olduğu sonucuna varabiliriz.

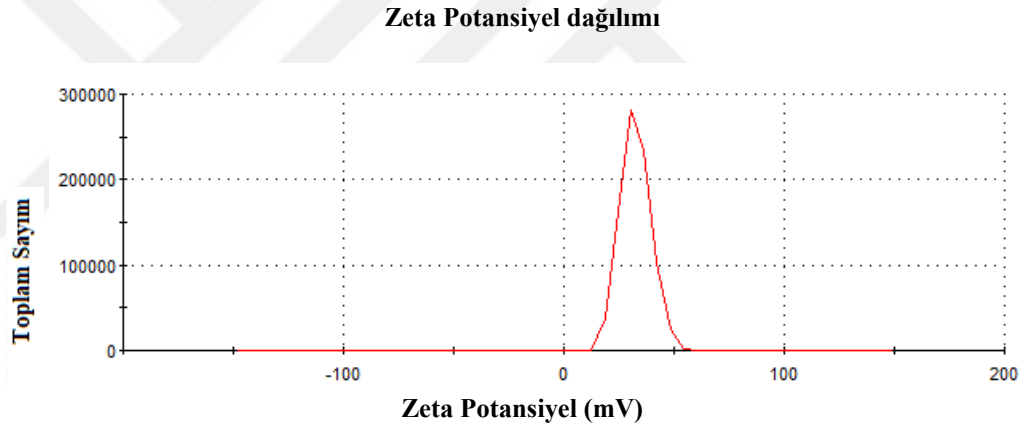
Kitosan nanopartiküllerinin boyutunu belirleyen faktörlerden biri kitosanın moleküler ağırlı iken diğeri, iyonik jelleşme yöntemiyle sentezlenen kitosan ve çapraz bağlayıcısının birbirine olan kütleli oranıdır (Rampino et al., 2013). Literatürde bu oran 5:1, 6:1 (CH: TPP) olarak verilmiş  $200 \pm 24$ ,  $193 \pm 28$  nm boyutlarında nanoparçacıklar elde edilmiş ve daha aşağı veya yukarı oranlarda, nanoparçacık boyutunda madde elde edilemediği, agregasyondan dolayı okumaların yapılamadığı bildirilmiştir. Bu çalışmada da 5:1 (CH: TPP) kütleli oran kullanılmış ve 154,1 nm boyutu elde edilmiştir.

DLS'nin prensibine göre PDI değeri 0.5'ten daha küçük olan değerler kabul edilebilirdir (Agarwal et al., 2018), polimer bazlı nanopartiküller için ise 0.2 ve çevresindeki değerler daha uygun görülmektedir, PDI kısaca boyut popülasyonlarının dağılımını temsil etmektedir (Danaei et al., 2018). CS ve CS-HA nanopartiküllerinin PDI değerlerini kıyasladığımızda, CS-HA nanopartiküllerinin PDI değeri CS'ye göre daha iyidir, bu çalışmada CS nanopartikülleri kullanılmamıştır, aynı teknikle sentezlenen CS ve CS-HA nanopartikülleri arasındaki farkların gözlemlenmesi ve elde edilebilecek en küçük nanopartikül boyutlarına ulaşmak amaçlanmıştır. CS sentezinde PDI'yı düşürmek için yapılabilecek değişiklikler boyutu yükseltecekti bu da CS-HA nanopartiküllerinin boyutunu etkileyecekti. CS ultrasonikasyon işlemi ile daha monodispers hale getirebilirdi (Tang et al., 2003) lakin bu da polimer yapıya zarar verebileceği için uygulamaktan kaçınılmıştır. Filtrasyon yöntemi ile büyük parçacıklar uzaklaştırabilir lakin bu da madde kaybına yol açardı.



Şekil 4.3 CS nanopartiküllerinin zeta potansiyel dağılımı grafiği

CS nanopartiküllerinin zeta potansiyel değeri 15 mV (Şekil 4.3), CS-HA nanopartiküllerinin zeta potansiyeli (Şekil 4.4) 32,3 mV olarak tespit edilmiştir.



Şekil 4.4 CS-HA nanopartiküllerinin zeta potansiyel dağılımı grafiği

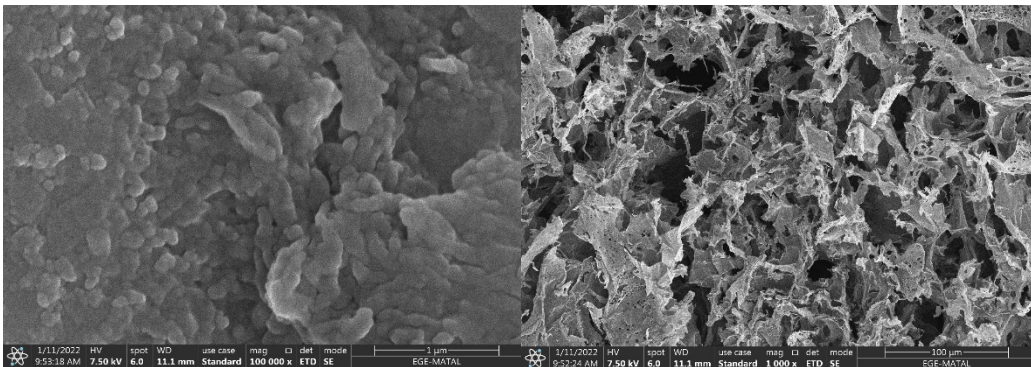
Nanopartiküllerin yüzey yük özellikleri zeta potansiyeli üzerinden değerlendirilmektedir, partikülün yüzey yük değeri nanosüspansiyonun stabilitesini belirlemektedir (Patel, V. R., & Agrawal, Y. K., 2011). Zeta potansiyeli değeri  $\pm 0-10$  mV aralığında ise stabil değildir,  $\pm 10-20$  mV aralığında stabiliteye kısmen yakındır,  $\pm 20-30$  mV aralığı orta seviyede stabildir,  $> \pm 30$  mV aralığı oldukça stabildir (Ardani et al., 2017). Bu sentez yöntemine göre CS nanopartikülleri stabiliteye kısmen yakındır, CS-HA nanopartikülleri ise oldukça stabildir, iki nanopartikül yüzeyi de pozitif yüküdür. CS nanopartiküllerinin zeta potansiyel değeri CS/TPP oranına göre CS'nın TPP'deki aminogruplarıyla nötralizasyonu nedeniyle değişmektedir fakat bu aynı zamanda nanopartikül boyutunu da etkilemektedir (Fan et al., 2012). Farklı oranlarla yapılan çalışmada

CS nanopartiküllerinin zeta potansiyeli +14 mV ve +53 mV aralığında değişiklik göstermiştir (Thakur, A., & Taranjit., 2011). CS nanopartiküllerinin zeta potansiyelini CS/TPP oranı ile daha katyonik hale getirmek daha büyük nanopartikül sistemleri elde etmemize neden olacağı için sentez en iyi sonuçlar alabileceğimiz oran ile optimize edilmiştir ve sonuç literatür ile uyumludur.

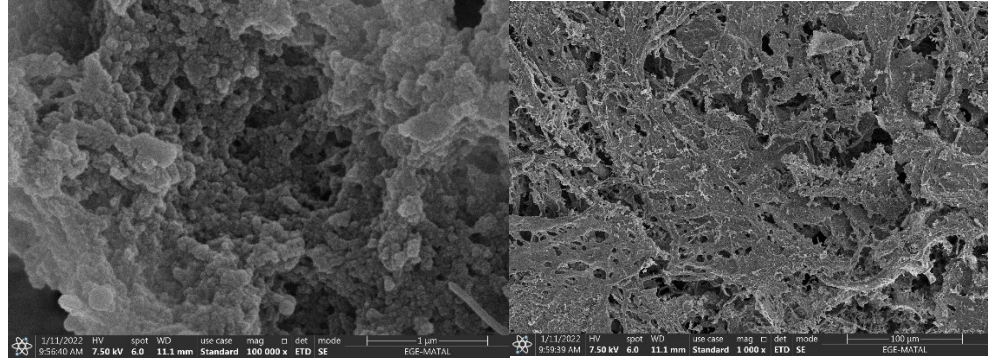
Genellikle yüzey yükü/zeta potansiyeli düşük makrofaj ile yüklenen nanopartiküllerin de bu özellikleri azalmaktadır (Taghipour-Sabzevar et al., 2020) ki bu durumda polianyon olan HA ile etkileşime giren polikasyon CS'nın zeta potansiyelinin, CS'a göre daha düşük olması beklenirdi. Fakat bu durum da bize CS/HA oranından kaynaklı olarak yüzeyde daha çok polianyon CS molekülünün var olmasından kaynaklı CS-HA nanopartikülünün zeta potansiyelinin pozitif artışını elde ettiğimizi göstermektedir (Nazeri et al., 2013). Sentezde 4:1 oranında CS: HA kullanıldığı için CS'nın yüzeyde daha çok yer alması anlamlı ve literatür verisi ile uyumludur.

#### 4.1.2 SEM analiz sonuçları

CS ve CS-HA nanopartiküllerinin morfolojisi SEM cihazında 1 ve 100  $\mu\text{m}$  ölçeğinde analiz edildi. CS nanopartiküllerinin SEM görüntülerini Şekil 4.5'te incelediğimizde küresel bir yapıya sahip olduğunu ve bu yapının jelatlama ajanının etkisinden kaynaklandığını, bu sayede de nanopartikül formasyonuna sahip olduğunun onaylandığı bilgisini literatür çalışmaları ışığında elde edebiliyoruz (Alarfaj, A. A., 2019).



Şekil 4.5 CS nanopartiküllerinin SEM analizi



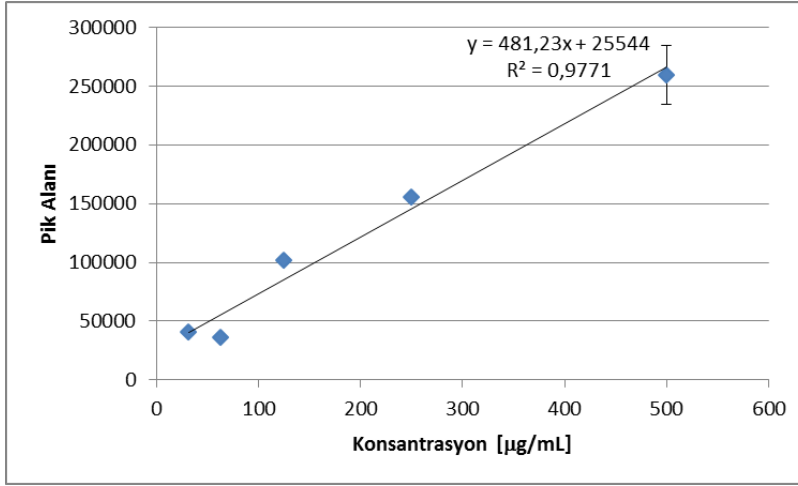
Şekil 4.6 CS-HA nanopartiküllerinin SEM analizi

CS-HA nanopartiküllerinin küresel morfolojik yapısı Şekil 4.6'da belirtilen SEM görüntüleri aracılığıyla gözlemlenmiştir.

#### 4.1.3 Sentez ürününün nicel analiz sonuçları

Sentez ürünü olan CS-HA nanopartikülünde, senteze eklenen HA'nın yüzde kaçının kitosanla tepkimeye girdiğini tespit etmek için HPLC analiz yöntemi kullanılmıştır. UV-VIS spektrofotometri cihazıyla da gerçekleştirebilecek olan bu analiz HA'nın dalga boyunun düşük olmasından ve daha sağlıklı sonuçlar vermesinden dolayı HPLC cihazı ile kantitatif analiz gerçekleştirilmiştir.

HA'nın 5 farklı konsantrasyonu (31,25, 62,5, 125, 250 ve 500  $\mu\text{g/mL}$ ) kalibrasyon eğrisinin oluşturulması amacıyla cihaza enjekte edilmiş ve 1,9 ve 3,7 dakikaları olmak üzere 230 nm dalga boyunda 2 peak gözlenmiştir. MS Excel programında peak alanları ve konsantrasyonlar arasındaki kalibrasyon eğrisi çıkarılmıştır. CS-HA sentezi sırasında santrifüj işleminden sonra geriye kalan süpernatant, yıkama solüsyonu ve ayrı olarak tepkimeye giren CS ve TPP miktarları da enjekte edilerek peak alanları elde edilmiştir. Süpernatanttan CS ve TPP çıkarılarak tepkimeye giren HA miktarı hesaplanmıştır. HA'nın bağlanma verimi %61,63 olarak tespit edilmiştir.

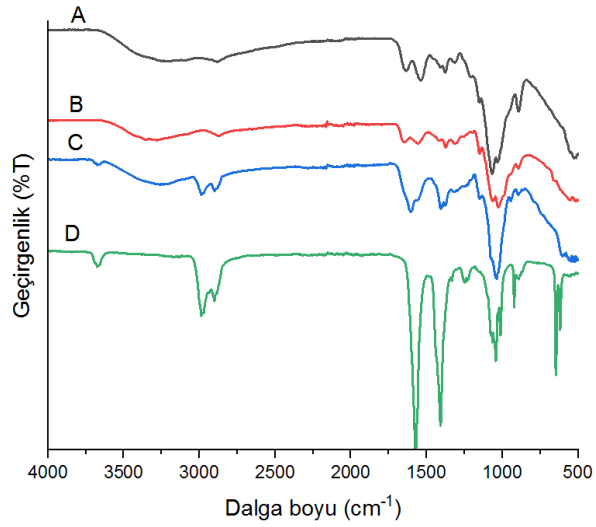


Şekil 4.7. Hyaluronik asitin kalibrasyon eğrisi

Bir polianyonun pozitif yüklü nanopartikülle olan etkileşiminin sonucu aglomerasyon veya flokülasyon ile sonuçlanabilmektir, final ürün, nanopartikül ve polyanyonun konsantrasyonlarına, boyutlarına ve etkileşim gücüne bağlıdır (Nasti et al., 2009). Bu çalışmada CS-HA nanopartikül sentezi için düşük moleküler ağırlıklı CS ve HA kullanılmıştır, pH ve karıştırma hızı istenilen boyut ve stabilite için sabitlenmiştir. Final ürün olan CS-HA'daki HA oranını arttırmak için bu parametrelerin değiştirilmesi gerekmektedir lakin bu sefer de ürünün stabilitesi konusunda kesin bir yargıya varmak söz konusu değildir. Bu çalışmada, hücre kültürü deneylerinde uzun süreli ve varyasyonlu denemeler yapılması planmış olduğundan, final ürünün stabilitesi daha öncelikli olduğu için %61,63'lik verim uygun görülmüş ve verim artırma çalışmaları yapılmamıştır.

#### 4.1.4 Yapısal analiz sonuçları

Düşük moleküler ağırlıktaki (lmw) CH, HA (lmw), CH VE CH-HA nanoparçacıklarının kimyasal yapı analizi FTIR cihazı ile gerçekleştirildi ve Şekil 4.8'de FTIR spektrumları gösterilmektedir.



Şekil 4.8 FTIR spektrumları. Kitosan nanoparçacıkları (A), kitosan (B), hyaluronik asit (C), kitosan ve hyaluronik asit nanoparçacıkları (D).

B bandındaki  $3287\text{ cm}^{-1}$  peaki  $\text{NH}_2$  ve OH gruplarının gerilim titreşimlerinin birleşiminin karşılığını belirtmektedir, banttaki  $1647\text{ cm}^{-1}$  peaki  $\text{CONH}_2$  grubunu temsil etmektedir ve A bandında bu peak yok olup  $1634/\text{cm}$  olarak ortaya çıkmaktadır,  $\text{NH}_2$  eğilme titreşimlerinin  $1556/\text{cm}^{-1}$  den  $1534\text{ cm}^{-1}$  olarak değişerek keskinleşmesi deasetilasyonun gerçekleştiğini göstermektedir (Qi et al., 2004). A bandında  $3287$ 'den  $3217/\text{cm}^{-1}$ 'e dönüşmesi ve aralığın daha genişlemiş olması hidrojen bağının arttığını simgelemektedir (Xu, Y., & Du, Y., 2003). Kitosan ve kitosan nanopartiküllerinin spektrumlarını kıyasladığımızda ulaştığımız bu sonuçlar, kitosanın TPP ile çapraz bağlandığını göstermektedir ve sonuçlar belirtilen önceki çalışmalar ile uyumludur.

Kitosan (B) ve hyaluronik asit (C) bantlarının her ikisi de benzer karakteristik özellikler göstermektedir,  $3217\text{-}3675/\text{cm}$  peakleri içerdikleri  $\text{NH}_2$  ve OH gruplarının geriliminden kaynaklanmaktadır,  $1647\text{-}1603/\text{cm}$  amit grubuna bağlı  $\text{C=O}$  gerilimini,  $1026\text{-}1038/\text{cm}$  ise  $\text{C-O-C}$  gerilimini temsil etmektedir (Anisha et al., 2013). Bu band aralıkları CH-HA nanopartikülünde (D) daha yoğun gözlenmektedir, HA (C)'da karboksil grubu temsil eden  $1377\text{-}1406/\text{cm}$  peak aralığı, CH-HA (D)'da  $1333\text{-}1408$  olarak ortaya çıkmıştır (Iacob et al., 2018). Buradan da CH ve HA'nın yapısal olarak birleşerek CH-HA nanopartiküllerini oluşturduğu sonucuna varabiliriz.

## 4.2 Hücre Kültürü Çalışmaları

HGF-1, Saos-2 ve HaCaT hücreleri üzerinde CS-HA, HA ve ZA'nın etkilerini incelemek ve karşılaştırmak amacıyla farklı konsantrasyonlarda ve kombinasyonlarda sitotoksosite deneyleri yapılmış, optimize edilen konsantrasyonlarla da apoptoz ve yara modeli çalışmaları yapılmıştır.

### 4.2.1 Sitotoksosite çalışması sonuçları

Hyaluronik asit, hyaluronik asit-kitosan nanoparçacıklarının ve zoledronik asitin sitotoksosite çalışmaları HGF-1, Saos-2 ve HaCaT hücreleri üzerinde gerçekleştirildi. Çalışma sonucunda elde edilen veriler ile örneklerin 24, 48 ve 72. saatte hücreler üzerindeki % canlılık değerleri hesaplanmıştır. Zoledronik asitin 72. saatteki IC<sub>50</sub> değeri hesaplanmıştır.

HA'nın farklı konsantrasyonlarının (1, 3, 10, 30 ve 100 µg/mL) Saos-2 hücreleri üzerindeki etkisine baktığımız zaman, her zaman limitinde örneğin konsantrasyonu arttıkça % canlılık oranında artış olduğunu gözlemlemekteyiz. Burdan yola çıkarak HA'nın belirlenen konsantrasyon aralığında Saos-2 hücreleri üzerinde toksik etkisinin bulunmadığını söyleyebiliriz. Aksine zaman çizelgesi üzerinden maruziyet süresi arttıkça (24-48-72. saat) proliferatif etki görülmektedir (Tablo 4.1) ve canlılık oranları kabul edilebilir limitler dahilindedir.

Hyaluronik asitin hücre profilersiyonunu arttırdığı bilgisi birçok kaynak tarafından desteklenmektedir. Bazı kaynaklarda yüksek moleküler ağırlık HA'nın proliferasyonu arttırdığı iddia edilirken bazılarında inhibisyona neden olduğu bilgisi yer almaktadır. Aynı bilgilerin düşük molekül ağırlıklı HA için geçerli olmadığı öne sürülmektedir. Bu çalışmada düşük molekül ağırlıklı HA kullanılmıştır ve sonuçlar, HA çalışmalarında kabul edilebilir limit olan %72 hücre canlılığının üzerindedir (Boeckel, D. G., et al., 2016).

HA'nın farklı konsantrasyonlarının (1, 3, 10, 30 ve 100 µg/mL) HaCaT hücreleri üzerindeki etkisine baktığımız zaman, her zaman limitinde örneğin konsantrasyonu arttıkça % canlılık oranında artış olduğunu gözlemlemekteyiz. Burdan yola çıkarak HA'nın belirlenen konsantrasyon aralığında HaCaT hücreleri

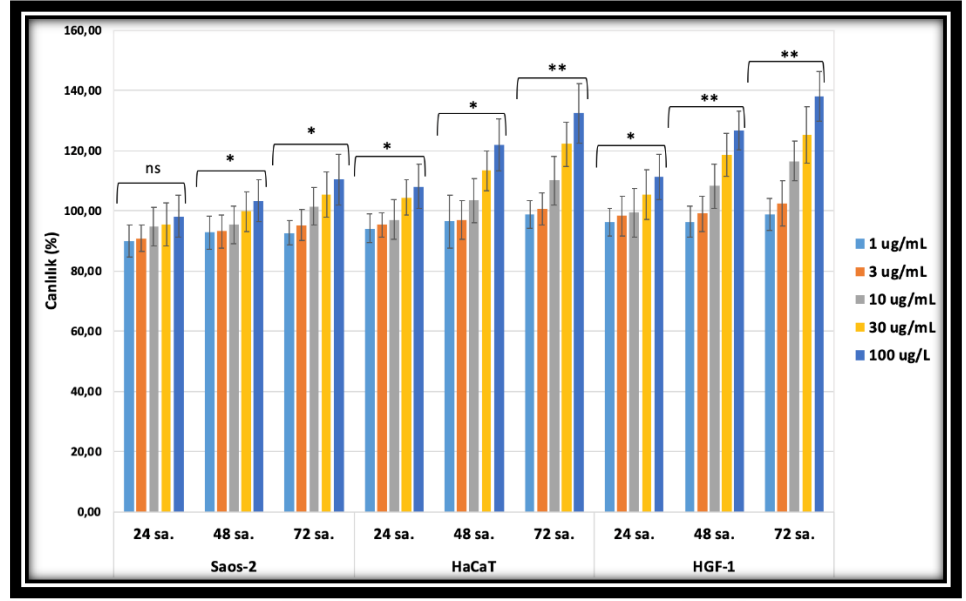
üzerinde toksik etkisinin bulunmadığını söyleyebiliriz. Aksine zaman çizelgesi üzerinden maruziyet süresi arttıkça (24-48-72. saat) proliferatif etki görülmektedir (Tablo 4.1) ve canlılık oranları kabul edilebilir limitler dahilindedir.

HA'nın farklı konsantrasyonlarının (1, 3, 10, 30 ve 100  $\mu\text{g/mL}$ ) HGF-1 hücreleri üzerindeki etkisine baktığımız zaman, her zaman limitinde örneğin konsantrasyonu arttıkça % canlılık oranında artış olduğunu gözlemlemekteyiz. Burdan yola çıkarak HA'nın belirlenen konsantrasyon aralığında HGF-1 hücreleri üzerinde toksik etkisinin bulunmadığını söyleyebiliriz. Aksine zaman çizelgesi üzerinden maruziyet süresi arttıkça (24-48-72. Saat) proliferatif etki görülmektedir (Tablo 4.1) ve canlılık oranları kabul edilebilir limitler dahilindedir.

HA'nın proliferatif etkisini Saos-2, HaCaT ve HGF-1 hücreleri arasındaki kıyaslayacak olursak (Şekil 4.9), Saos-2'de en az ve HGF-1'de en çok profilerasyona yol açtığı sonucuna varmaktayız. Hyaluronik asitin ECM yapısında bulunan bir biyopolimer ve yara iyileşmede rol alan bir yapı olduğunu göz önünde bulundurursak endotel ve fibroblast hücrelerinde daha çok profilerasyona neden olması osteoblastlara göre daha kaçınılmaz bir gerçektir.

Tablo 4.1 HA örneği uygulanan Saos-2 ve HaCaT ve HGF-1 hücrelerinin 24., 48. ve 72. saat % canlılık değerleri

| HA     | Madde miktarı (µg/mL) | 24          | 48          | 72          |
|--------|-----------------------|-------------|-------------|-------------|
| Saos-2 | 1                     | 90,02±5,37  | 92,78±5,52  | 92,65±4,08  |
|        | 3                     | 90,89±4,39  | 93,12±5,36  | 95,16±5,12  |
|        | 10                    | 94,76±6,55  | 95,41±6,30  | 101,48±6,32 |
|        | 30                    | 95,35±7,12  | 99,77±6,67  | 105,29±7,47 |
|        | 100                   | 98,23±6,89  | 103,33±7,01 | 110,37±8,36 |
|        |                       |             |             |             |
| HaCaT  | 1                     | 94,12±4,81  | 96,46±8,88  | 98,81±4,71  |
|        | 3                     | 95,35±3,91  | 96,87±6,34  | 100,67±5,43 |
|        | 10                    | 97,14±6,67  | 103,39±7,49 | 110,03±8,21 |
|        | 30                    | 104,41±5,89 | 113,34±6,56 | 112,15±7,41 |
|        | 100                   | 108,12±7,34 | 121,98±8,69 | 132,39±9,95 |
|        |                       |             |             |             |
| HGF-1  | 1                     | 96,19±4,45  | 96,26±5,11  | 98,72±5,32  |
|        | 3                     | 98,36±6,64  | 99,01±5,84  | 102,45±7,44 |
|        | 10                    | 99,49±8,06  | 108,29±7,33 | 116,52±6,52 |
|        | 30                    | 105,44±8,22 | 118,66±7,11 | 125,30±9,43 |
|        | 100                   | 111,23±7,57 | 126,71±6,42 | 137,91±8,22 |



Şekil 4.9 HA örneği uygulanan Saos-2 ve HaCaT ve HGF-1 hücrelerinin 24., 48. ve 72. saat % canlılık değerleri

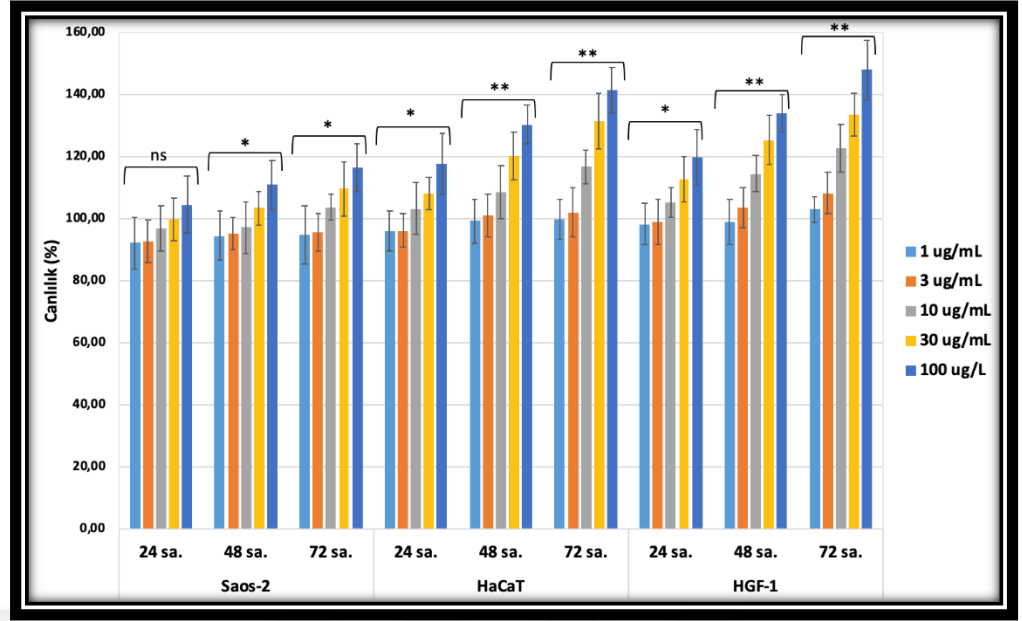
CHA nanopartiküllerinin Saos-2 hücreleri üzerindeki etkisine baktığımız zaman (Tablo 4.2) sitotoksik bir etki gözlemlenmemektedir. Doğal bir polimer olan kitosana hyaluronik asitin dahil edilmesinin hücre çoğalmasını arttırdığı gözlemlenmektedir. Konsantrasyonlar arttıkça % canlılık değerleri 3 zaman aralığında da artış göstermektedir. Kitosanın biyoyumlu olması ve hiçbir toksik etkiye sahip olmaması hyaluronik asit için taşıyıcı sistem olarak kullanılmasını uygun hale getirmekte ve profilerasyona yardımcı olmaktadır.

HaCaT ve HGF-1 hücreleri üzerinde CHA nanopartiküllerinin etkisine baktığımız zaman sitotoksik etki gözlenmemektedir aksine HA uygulanan değerlere göre daha çok proliferatif etki gözlenmektedir. İki hücreyi Saos-2 ye göre kıyaslayacak olursak daha fazla artış gözlenmektedir bu da hyaluronik asitin proliferatif etkisinin HaCaT ve HGF-1 hücrelerinde daha fazla olmasından kaynaklanmaktadır.

Hücre canlılık oranlarının 24. saatten itibaren kontrole göre artış göstermesi ve %80'den fazla olması, nanopartikül sisteminin biyoyumlu olduğunu ve polimerlerin hücreler üzerindeki proliferatif etkisini, literatürde geçtiği üzere göstermektedir ve elde edilen veriler literatür ile uyumludur (Chiesa, E. Et al.,2018).

Tablo 4.2 CHA örneği uygulanan Saos-2 ve HaCaT ve HGF-1 hücrelerinin 24., 48. ve 72. saat % canlılık değeri

| CHA           | Madde miktarı (µg/mL) | 24          | 48          | 72          |
|---------------|-----------------------|-------------|-------------|-------------|
| <b>Saos-2</b> | 1                     | 92,15±8,33  | 94,55±7,98  | 94,72±9,33  |
|               | 3                     | 92,67±6,82  | 95,33±5,23  | 95,60±6,15  |
|               | 10                    | 96,89±715   | 97,20±8,29  | 103,67±4,20 |
|               | 30                    | 99,81±6,85  | 103,44±5,41 | 109,81±8,88 |
|               | 100                   | 104,55±9,11 | 110,93±8,09 | 116,53±7,84 |
| <b>HaCaT</b>  | 1                     | 96,18±6,41  | 99,30±7,16  | 99,89±6,44  |
|               | 3                     | 96,20±5,39  | 101,02±6,90 | 102,11±7,94 |
|               | 10                    | 103,36±8,19 | 108,55±8,42 | 116,74±5,62 |
|               | 30                    | 108,11±5,13 | 120,21±7,81 | 131,56±8,85 |
|               | 100                   | 117,67±9,73 | 130,43±6,18 | 141,45±7,39 |
| <b>HGF-1</b>  | 1                     | 98,36±6,52  | 99,01±7,16  | 103,12±4,10 |
|               | 3                     | 99,13±7,30  | 103,67±6,54 | 108,30±6,66 |
|               | 10                    | 105,34±4,66 | 114,57±5,77 | 122,89±7,73 |
|               | 30                    | 112,80±7,37 | 125,43±7,88 | 133,48±6,90 |
|               | 100                   | 119,88±9,11 | 134,01±5,98 | 148,03±9,57 |

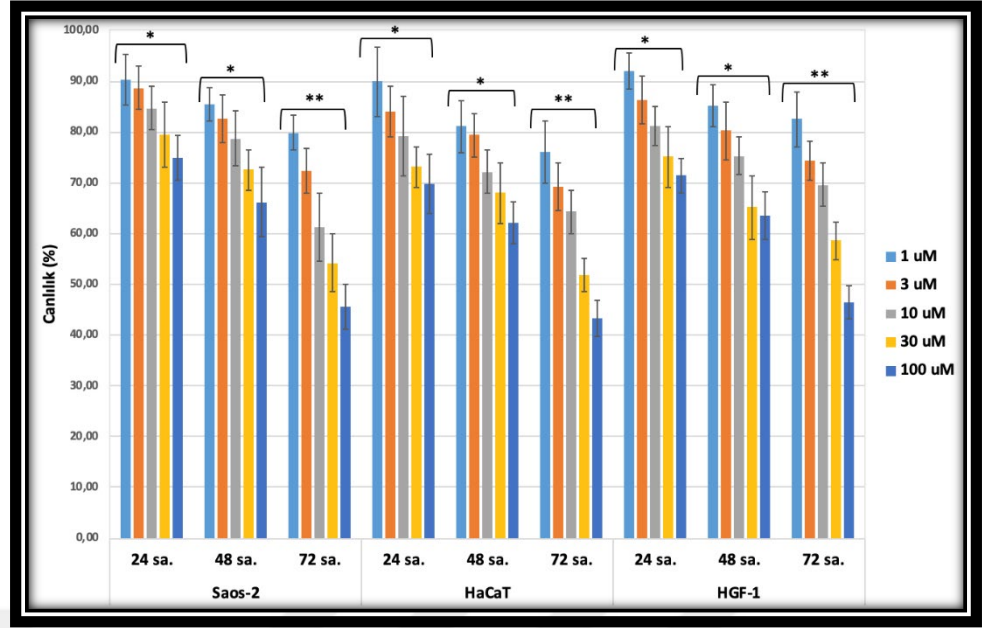


Şekil 4.10 CHA örneği uygulanan Saos-2 ve HaCaT ve HGF-1 hücrelerinin 24., 48. ve 72. saat % canlılık değerleri

Zoledronik asitin toksik etkisi literatürde kanıtlanmıştır. Saos-2, HaCaT ve HGF-1 üzerindeki sitotoksik etkilerine baktığımız zaman (Tablo 4.3) konsantrasyon arttıkça ve belirlenen zaman noktaları dahilinde, maruziyet süresi arttıkça toksik etkide artış gözlenmektedir. 72. Saatte canlılık oranının %50 nin altına düşmesiyle 72. Saate göre  $IC_{50}$  değerleri hesaplanmış ve Saos-2 için  $51,94 \pm 3,15$  µg/mL, HaCaT için  $44,12 \pm 2,87$  µg/mL ve HGF-1 için  $74,95 \pm 4,18$  µg/mL olarak bulunmuştur (Tablo 4.4). Literatür bilgisine baktığımız zaman ZA'nın konsantrasyonu arttıkça toksik etkisi artmaktadır ve Saos-2 hücresi üzerindeki aynı konsantrasyon ve zamanlardaki toksik etkisi fibroblastlardan daha fazladır (Dass, C. R., & Choong, P. F., 2007). Aynı zamanda HaCaT hücreleri üzerindeki toksik etkisi de insan gingival fibroblastlarına göre daha fazladır. Yine de her 3 hücre tipinde de anlamlı bir canlılık azalması gözlenmektedir ve HaCat ve HGF-1'lerde ortalama %70 ve %40 aralığında canlılık azalması görülmektedir (Basso F. G. Et al., 2013). Zoledronik asite maruziyet süresi, uygulanan konsantrasyonlar ve zoledronik asitin ışıktan etkilenen bir madde olduğu gerçeklerini göz önünde bulundurursak toksik yüzdelere değişebilmektedir fakat ortalama düzeyde benzerlik göstermekte ve anlamlı bir toksik etki görülmektedir.

Tablo 4.3 ZA örneği uygulanan Saos-2 ve HaCaT ve HGF-1 hücrelerinin 24., 48. ve 72. saat % canlılık değeri

| ZA            | Madde miktarı (µM) | 24         | 48         | 72         |
|---------------|--------------------|------------|------------|------------|
| <b>Saos-2</b> | 1                  | 90,38±5,03 | 85,43±3,37 | 79,91±,330 |
|               | 3                  | 88,71±4,26 | 82,63±4,77 | 72,35±5,53 |
|               | 10                 | 84,74±4,19 | 78,77±5,34 | 61,30±6,71 |
|               | 30                 | 79,47±6,39 | 72,51±4,09 | 54,23±5,78 |
|               | 100                | 74,92±4,50 | 66,14±6,84 | 45,66±4,38 |
| <b>HaCaT</b>  | 1                  | 89,92±6,87 | 81,08±5,20 | 76,13±6,14 |
|               | 3                  | 84,14±5,01 | 79,43±4,27 | 69,22±4,78 |
|               | 10                 | 79,19±7,85 | 72,18±4,22 | 64,27±4,31 |
|               | 30                 | 73,09±4,09 | 68,06±5,95 | 51,83±3,33 |
|               | 100                | 69,82±5,87 | 61,99±4,13 | 43,28±3,45 |
| <b>HGF-1</b>  | 1                  | 91,35±3,57 | 85,06±4,13 | 82,49±5,45 |
|               | 3                  | 86,23±4,69 | 80,22±5,68 | 74,36±3,81 |
|               | 10                 | 81,27±3,89 | 75,28±3,66 | 69,63±4,28 |
|               | 30                 | 75,09±5,92 | 65,16±6,33 | 58,56±3,62 |
|               | 100                | 71,39±3,49 | 63,54±4,71 | 46,44±3,40 |



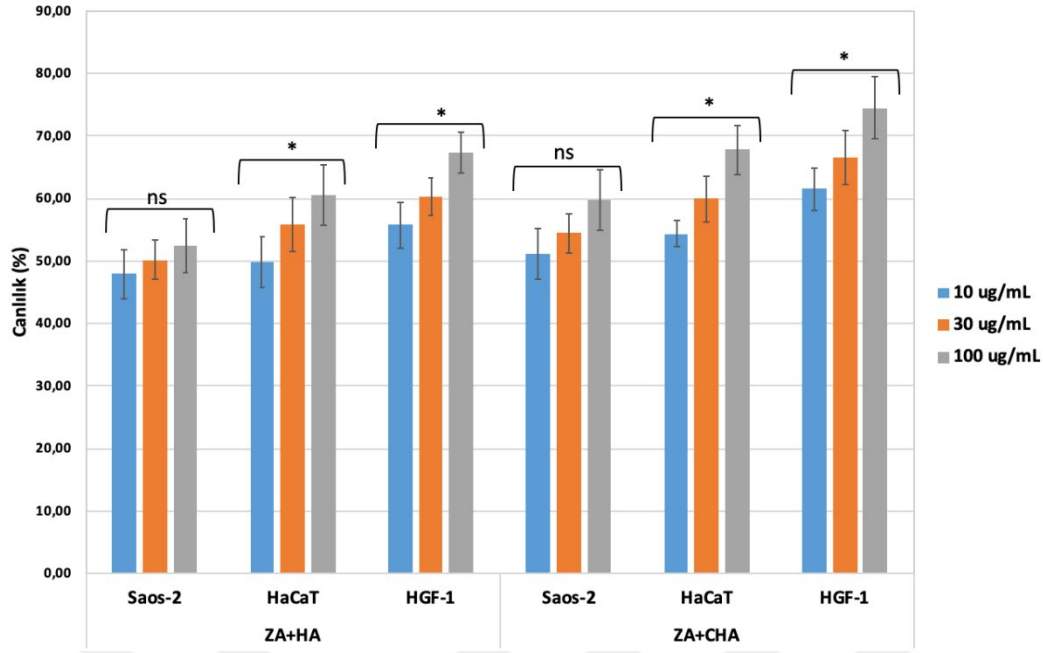
Şekil 4.11 ZA örneği uygulanan Saos-2 ve HaCaT ve HGF-1 hücrelerinin 24., 48. ve 72. saat % canlılık değerleri

Tablo 4.4 72. saat sonunda ZA'nın Saos-2, HaCaT ve HGF-1 hücreleri üzerindeki IC50 değerleri

|                                       | Saos-2     | HaCaT      | HGF-1      |
|---------------------------------------|------------|------------|------------|
| <b>ZA IC<sub>50</sub><br/>(µg/mL)</b> | 51,94±3,15 | 44,12±2,87 | 74,95±4,18 |

Tablo 4.5 ZA+HA ve ZA+CHA örnekleri uygulanan Saos-2 ve HaCaT ve HGF-1 hücrelerinin 72. saat % canlılık değerleri

| Madde miktarı (µg/mL) | ZA+HA      |            |            | ZA+CHA     |            |            |
|-----------------------|------------|------------|------------|------------|------------|------------|
|                       | Saos-2     | HaCaT      | HGF-1      | Saos-2     | HaCaT      | HGF-1      |
| 10                    | 47,94±3,95 | 49,77±4,06 | 55,73±3,59 | 51,14±3,97 | 54,37±2,06 | 61,51±3,48 |
| 30                    | 50,23±3,19 | 55,83±4,39 | 60,37±3,01 | 54,42±3,20 | 59,99±3,67 | 66,62±4,27 |
| 100                   | 52,51±4,38 | 60,59±4,91 | 67,34±3,23 | 59,71±4,88 | 67,79±3,98 | 74,45±4,96 |



Şekil 4.12 ZA+HA ve ZA+CHA örnekleri uygulanan Saos-2 ve HaCaT ve HGF-1 hücrelerinin 72. saat % canlılık sonuçları

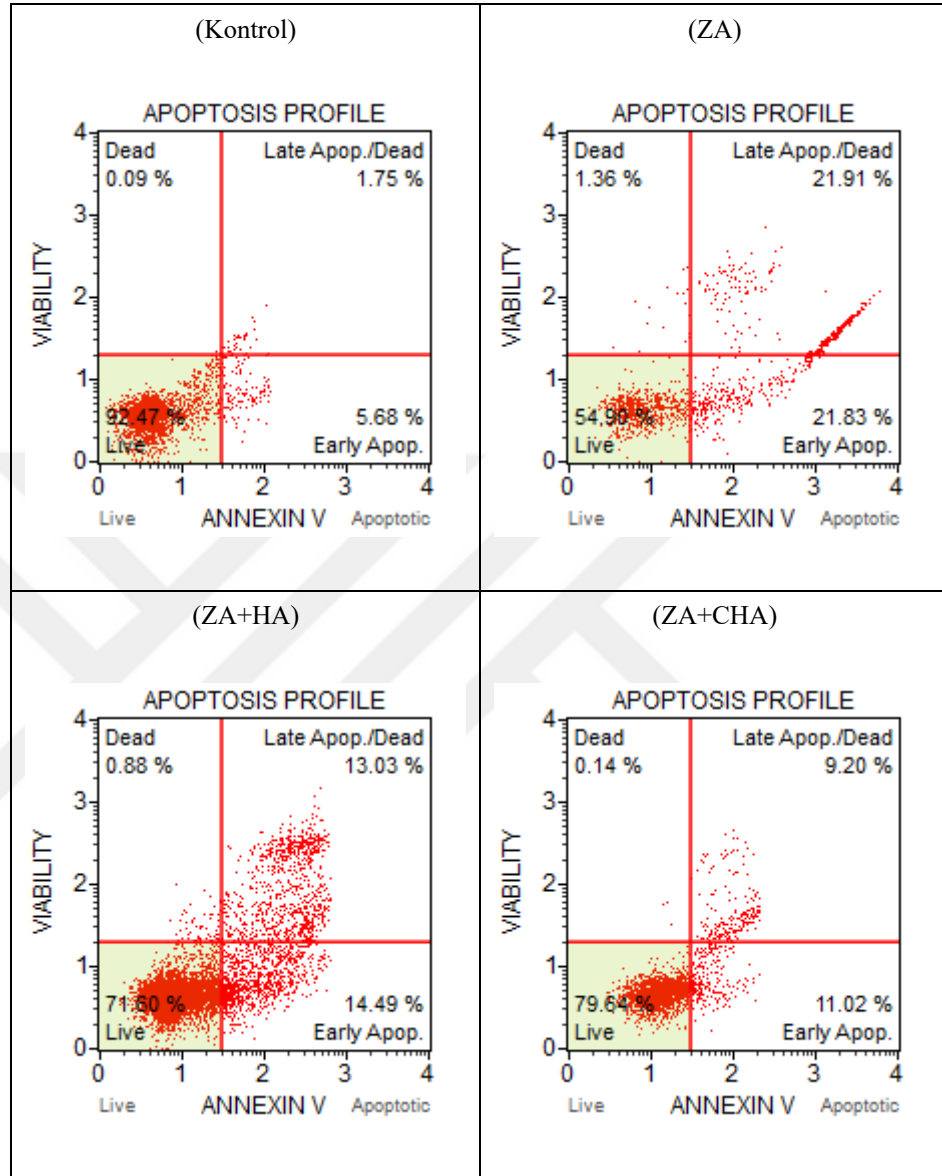
100 µM ZA ile birlikte 3 ayrı konsantrasyonda uygulanan HA ve CHA örneklerinin canlılık oranlarına baktığımız zaman (Şekil 4.12 ve Tablo 4.5), konsantrasyonlar arttıkça % canlılık değerinin arttığını gözlemlemekteyiz. Artış sıralamasının Saos-2, HaCaT ve HGF-1 şeklinde olması, hyaluronik asitin zoledronik asitin toksik etkisini minimize etmeye çalışmasıyla birlikte sitotoksikite verilerindeki proliferasyon oranıyla uyumlu olduğu görülmektedir. CHA'nın da bu proliferatif etkiyi desteklemesinin görülmesiyle nanoparçacık sisteminin ZA'nın toksik etkisini düşürmek üzere kullanılabilesine yönelik çalışmalar yapılabileceğini söyleyebiliriz.

#### 4.2.2 Apoptozis çalışması sonuçları

Zoledronik asitin ve zoledronik asitin hyaluronik asit ve hyaluronik asit-kitosan nanoparçacıkları ile kombinasyonlarının Saos-2, HaCaT ve HGF-1 üzerindeki apoptotik etkisine dair sonuçlar Millipore Muse Hücre Analiz cihazı kullanılarak elde edilmiştir.

Hyaluronik asit ve kitosan-hyaluronik asit nanoparçacıklarının apoptotik etkisi, literatür ve elde ettiğimiz sonuçlardan vardığımız kanıyla, bulunmadığından,

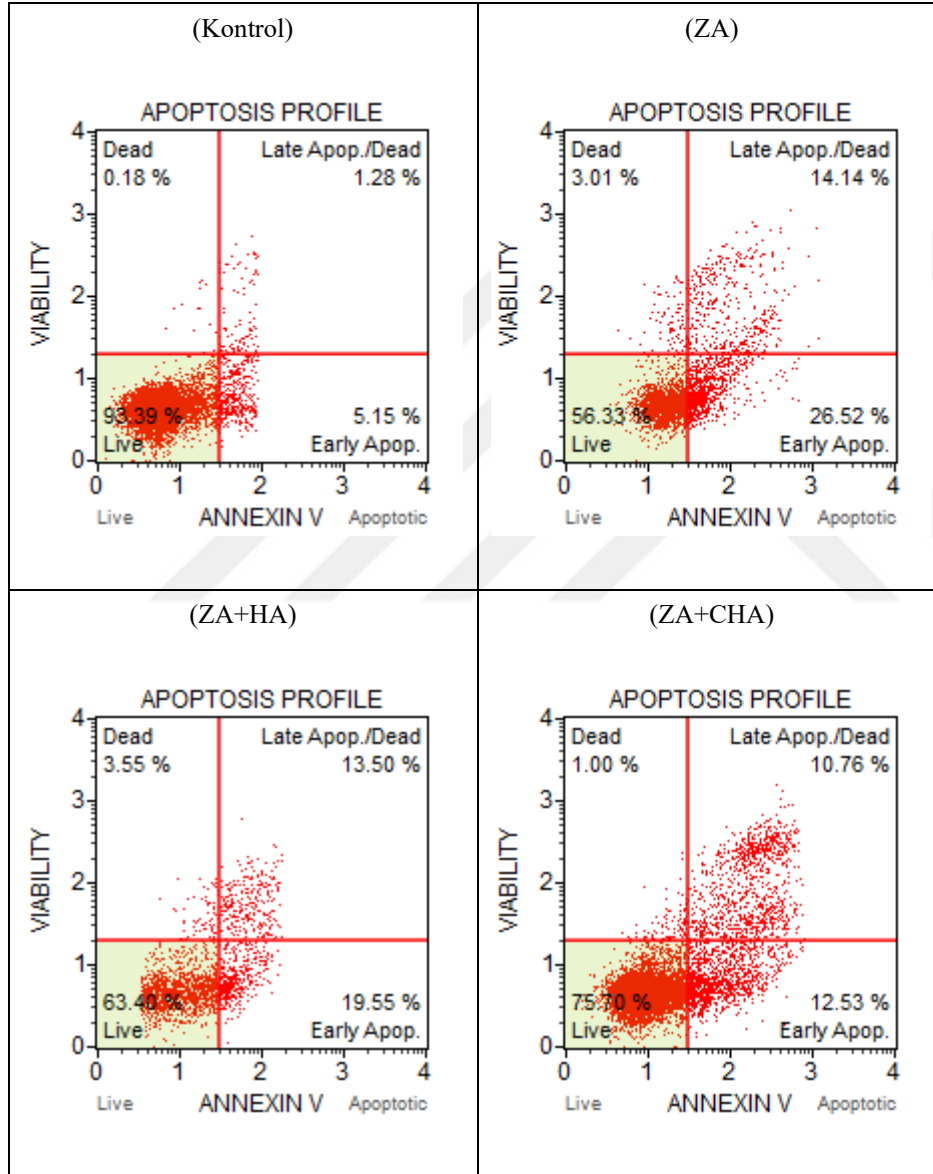
test edilmemiştir, HA'nın ve CHA'nın, ZA'nın apoptotik etkisini ne derece elimine ettiğini incelemek üzere sitotoksitede olduğu gibi kombinasyonlar kullanılmıştır.



Şekil 4.13 ZA, ZA+HA ve ZA+CHA örneklerinin Saos-2 hücreleri üzerinde 72. saatteki apoptozis sonuçları

Zoledronik asitin apoptotik etkisi 3 hücre hattında da görülmektedir. Anlamlı bir şekilde hücre ölümü gözlenen hücre hatlarını birbiriyle ve sitotoksitede verileriyle kıyasladığımızda, apoptozisde Saos-2 ve HaCaT sonuçlarının birbirine yakın olduğunu ve HGF-1 hücrelerindeki ölüm oranının biraz daha fazla olduğunu gözlemlemekteyiz (Tablo 4.4, Şekil 4.13, Şekil 4.14 ve Şekil 4.15). Bunun nedeni apoptoz deneyi başlangıcında hücre popülasyonunun platelere eşit bir şekilde

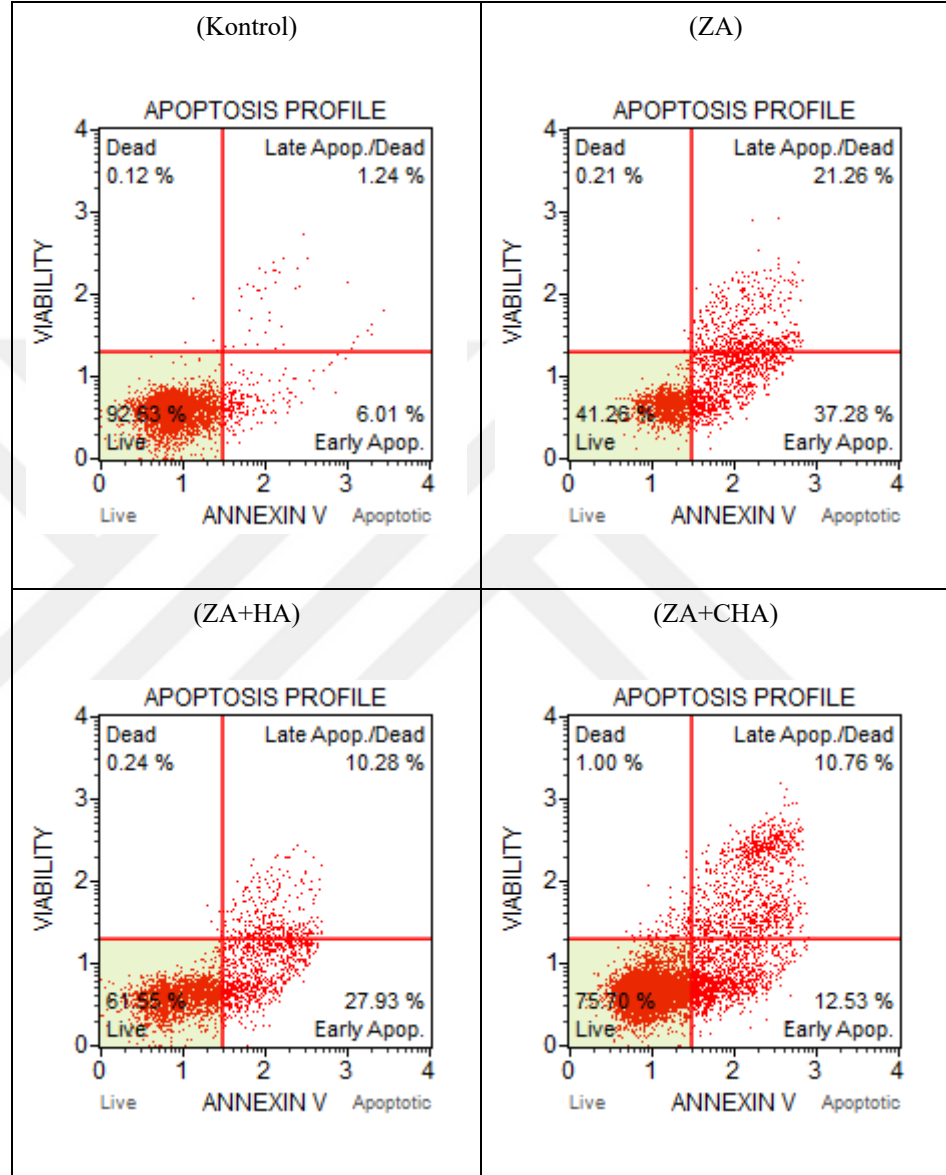
dağıtılmamış olması, ZA dağıtılırken daha yüksek miktarda eklenmiş olması veya hücreler tripsin ile kaldırılırken hücre kaybına maruz kalınması, Millipore cihazında ölçüm alırken hücre süspansiyonunun yoğun olması ve cihazda net okunamamış olması vb. nedenler kaynaklanmış olabilir ancak sonuçlar anlamlı ölçüde hatalı değildir ve zoledronik asitin doza bağlı apoptotik etkisi literatürde de kaynaktan kaynağa değişebilmektedir.



Şekil 4.14 ZA, ZA+HA ve ZA+CHA örneklerinin HaCaT hücreleri üzerinde 72. saatteki apoptozis sonuçları

ZA'nın HA ve CHA kombinasyonlarıyla kullanılması sitotoksite deneyinde de olduğu gibi 3 hücre hattında da ZA'nın apoptotik etkisini elimine edici sonuçlar

göstermiştir. Özellikle CHA'nın, ZA'nın tek başına kullanımına göre apoptotik etkisini ortalama %50 oranında elimine ettiği görülmektedir (Tablo 4.6). CHA'nın HA'ya göre olan ZA'lı kombinasyonlarına baktığımız zaman proliferasyona yardım ettiği ve hücre ölümünü azalttığı sonucuna varılabilmektedir.



Şekil 4.15 ZA, ZA+HA ve ZA+CHA örneklerinin HGF-1 hücreleri üzerinde 72. saatteki apoptozis sonuçları

Tablo 4.6 ZA, ZA+HA ve ZA+CHA örneklerinin Saos-2, HaCaT ve HGF-1 hücreleri üzerinde 72. saatteki % apoptozis değerleri

|               |         | Canlı | Erken Apoptoz | Geç Apoptoz | Ölü  | Toplam Apoptoz |
|---------------|---------|-------|---------------|-------------|------|----------------|
| <b>Saos-2</b> | Kontrol | 92,47 | 5,68          | 1,75        | 0,09 | 7,43           |
|               | ZA      | 54,9  | 21,83         | 21,91       | 1,36 | 43,74          |
|               | ZA+HA   | 71,6  | 14,49         | 13,03       | 0,88 | 27,52          |
|               | ZA+CHA  | 79,64 | 11,02         | 9,2         | 0,14 | 20,22          |
| <b>HaCaT</b>  | Kontrol | 93,39 | 5,15          | 1,28        | 0,18 | 6,43           |
|               | ZA      | 56,33 | 26,52         | 14,14       | 3,01 | 40,66          |
|               | ZA+HA   | 63,4  | 19,55         | 13,5        | 3,55 | 33,05          |
|               | ZA+CHA  | 75,7  | 12,53         | 10,76       | 1    | 23,29          |
| <b>HGF-1</b>  | Kontrol | 92,63 | 6,01          | 1,24        | 0,12 | 7,25           |
|               | ZA      | 41,26 | 37,28         | 21,26       | 0,21 | 58,54          |
|               | ZA+HA   | 61,55 | 27,93         | 10,28       | 0,24 | 38,21          |
|               | ZA+CHA  | 75,7  | 12,53         | 10,76       | 1    | 23,29          |

#### 4.2.3 Yara modeli çalışması sonuçları

Hücreler üzerinde yara modeli çalışması JuLI floresanlı hücre görüntüleme cihazı kullanılarak gerçekleştirilmiştir. Hücrelerin 0, 4, 24 ve 28. saatlerdeki görüntüleri alınmış ve Image J programı kullanılarak % kapanma oranları hesaplanmıştır.

HGF-1 hücreleri fibroblast yapıdaki hücreler olması nedeniyle yara modeli çalışmasında daha hızlı kapanma göstermiştir (Tablo 4.7). HaCaT hücreleri endotel yapıda hücreler olması nedeniyle HGF-1'den sonra kapanmaya yönelmiştir. Ancak Saos-2 hücreleri yara modeli için uygun bir hücre tipi değildir. Proliferatif etki ve hücre göçü etkisi göstermesine rağmen üst üste yığılmalar gözlenebilmekte ve yara çizgisi alanında streten dolayı kaynaklanabilecek ilerleme kaydedememe etkisinden dolayı ve yığılan hücrelerin yüzeyden kalkmasıyla sağlıklı sonuçlara ulaşmak zorlaşabilmektedir.

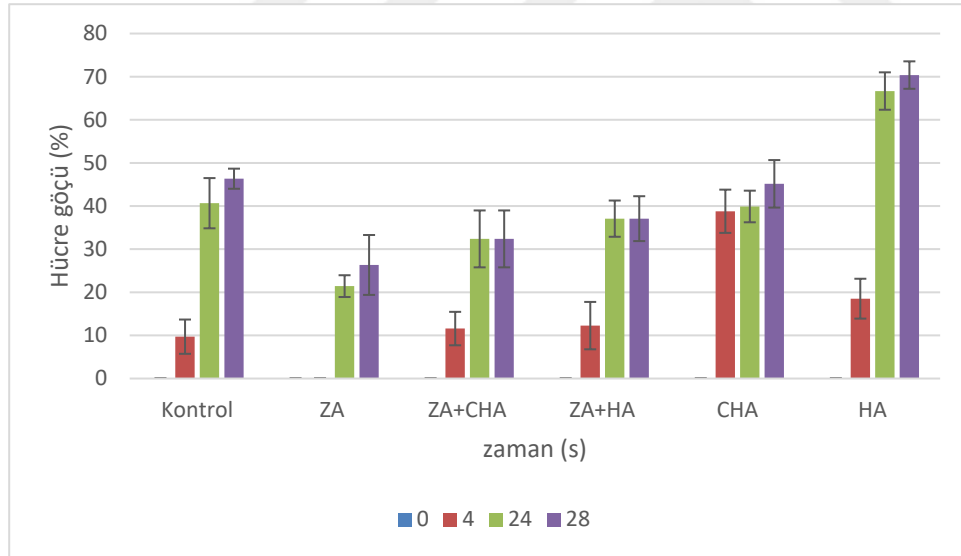
Zoledronik asitli yara modeli çalışmasında hücre göçü gerçekleşse dahi göç eden hücreler de apoptotik etkiye maruz kaldığı için yara kapanamamış ya da ilerleme kaydedilememiştir. Sadece HA ve CHA kullanılan çalışmada her üç hücre hattında da kontrole göre daha hızlı ilerleme kaydedilmiş ve HaCaT ile HGF-1'de kontrolden önce kapanma gözlenmiştir, kapanma olduğu an çalışma tamamlandığı ve karşılaştırma yapmak amacıyla aynı zaman dilimleri konulduğu için Saos-2'nin kapanma zamanı bu verilerde görülmemektedir, kapanması diğer hücrelere göre daha uzun sürmüştür ve kendi içinde kıyaslama yapacak kadar sağlıklı veriler elde edilememektedir ancak kapanma gözlenmiştir, kontrole göre ilerleme oranına bakıldığı zaman aynı şeyleri Saos-2 hücreleri için de söylemek zaten mümkündür.

HaCaT ve HGF-1 hücre hatlarında ZA+CHA ve ZA+HA kombinasyonlarına baktığımız zaman ZA+CHA'nın HA'ya göre daha hızlı hücre göçü gösterdiği görülmektedir ve bu sonuçlar da sitotoksosite ve apoptozis çalışmaları ile uyumludur. Ancak Saos-2'de tam tersi bir durum gözlenmektedir ve yukarıda da açıklandığı üzere kullanılan Saos-2 hücreleri yara modeline uygun değildir ve sağlıklı sonuçlar almayı zorlaştırmaktadır. Literatüre baktığımız zaman kitosanın Saos-2 hücreleri üzerinde, tümör hücreleri olması nedeniyle, çoğalmayı inhibe edici özellikleri olduğu da görülmektedir ancak bunun molekül ağırlığı ve doz ile şekillenebildiği ve sitotoksosite ve apoptoz deneylerinde de aynı nanoparçacık sistemi kullanıldığı ve aynı etki görülmediği için, bu ihtimal üzerinde durulmamaktadır (Abedian Z. et al., 2019).

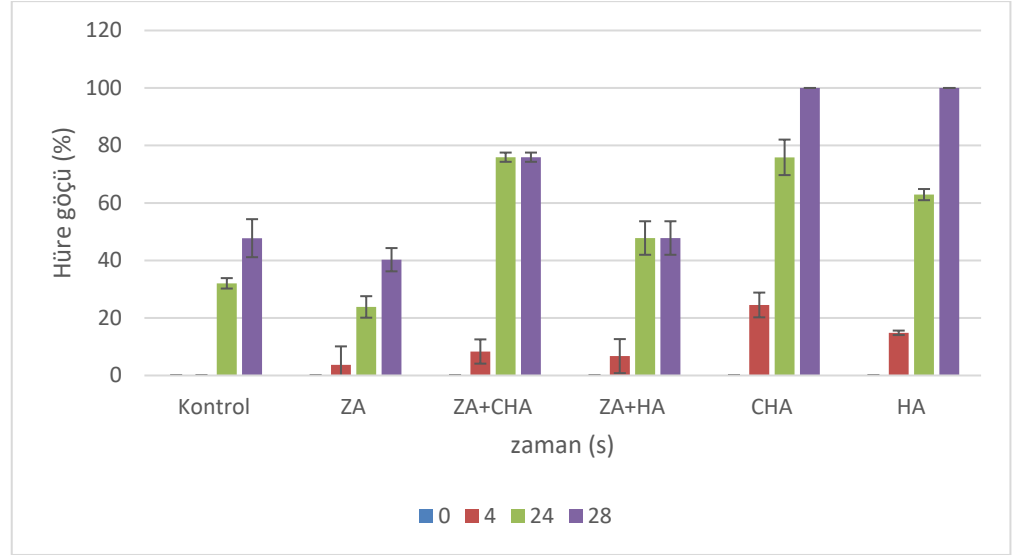
Yara iyileştirme sistemleri çok aşamalı prosedürlerden oluşmakta ve birçok faktörün etkileşimiyle gerçekleşmektedir. Kitosanın yapılan çalışmalar sonucu bu aşamaların hepsinde yer alması (antimikrobiyal etkisiyle inflamasyon aşamasında etkileri vb.) ve hyaluronik asitle beraber sentezlenmesiyle hücre adezyonu ve proliferasyonunda da aktif rol almasıyla yukarıdaki sonuçlarda da görüldüğü üzere yara modelinde başarılı sonuçlar vermektedir. İyonik jelatlama yöntemiyle üretilmesi de organik solvent eklenmesine gerek bırakmadığı ve daha basit bir prosedür olduğu için çok yönlü bir nanoparçacık sistemi ortaya çıkmaktadır (Vigani B. et al., 2019). ZA'nın inhibisyon etkisini elimine edici özellikler de göstererek yara modeline katkıda bulunmuştur.

Tablo 4.7 ZA, ZA+HA ve ZA+CHA, CHA ve HA örneklerinin Saos-2, HaCaT ve HGF-1 hücreleri üzerinde 0, 4, 24 ve 28. saatteki % hücre göçü değerleri

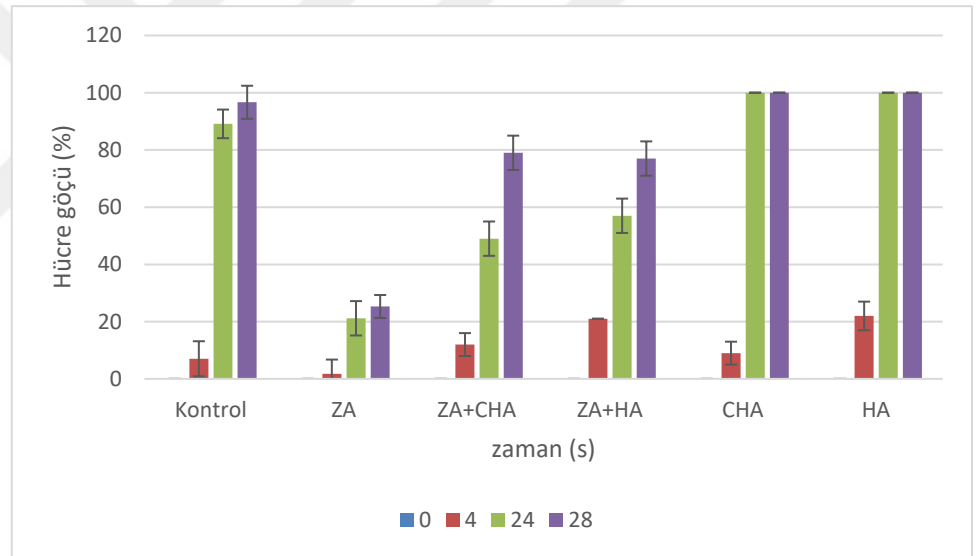
|               |    | Kontrol   | ZA         | ZA+CHA     | ZA+HA     | CHA       | HA        |
|---------------|----|-----------|------------|------------|-----------|-----------|-----------|
| <b>Saos-2</b> | 0  | 0         | 0          | 0          | 0         | 0         | 0         |
|               | 4  | 9,7±3,9   | 0          | 11,58±3,87 | 12,27±5,5 | 38,78±5,0 | 18,5±4,6  |
|               | 24 | 40,66±5,8 | 21,43±2,5  | 32,38±6,5  | 37,07±4,2 | 39,9±3,6  | 66,6±4,3  |
|               | 28 | 46,3±2,3  | 26,34±6,9  | 32,38±6,59 | 37,07±5,2 | 45,15±5,5 | 70,37±3,1 |
| <b>HaCaT</b>  | 0  | 0         | 0          | 0          | 0         | 0         | 0         |
|               | 4  | 0         | 3,7±6,4    | 8,3±4,2    | 6,7±5,9   | 24,5±4,3  | 14,8±0,7  |
|               | 24 | 32±1,8    | 23,8±3,7   | 75,9±1,6   | 47,8±5,8  | 75,8±6,1  | 62,9±1,9  |
|               | 28 | 47,75±6,6 | 40,27±4,04 | 75,9±1,6   | 47,8±5,8  | 100       | 100       |
| <b>HGF-1</b>  | 0  | 0         | 0          | 0          | 0         | 0         | 0         |
|               | 4  | 7±6       | 2±5        | 12±4       | 21        | 9±4       | 22±5      |
|               | 24 | 89±5      | 21±6       | 49±6       | 57±6      | 100       | 100       |
|               | 28 | 97±6      | 25±4       | 79±6       | 77±6      | 100       | 100       |



Şekil 4.16 Saos-2 hücreleri üzerinde ZA, ZA+CHA, ZA+HA, CHA ve HA örnekleri ile yara modeli çalışması sonuçları



Şekil 4.17 HaCaT hücreleri üzerinde ZA, ZA+CHA, ZA+HA, CHA ve HA örnekleri ile yara modeli çalışması sonuçları



Şekil 4.18 HGF-1 hücreleri üzerinde ZA, ZA+CHA, ZA+HA, CHA ve HA örnekleri ile yara modeli çalışması sonuçları

## 5. SONUÇ VE ÖNERİLER

Bu çalışmada yara iyileştirme prosesini hızlandırıcı etkisi ile bilinen hyaluronik asitin verimini arttırmak ve biyouyumlu kitosanı daha stabil hale getirmek amacıyla kitosan-hyaluronik asit nanopartikülleri sentezlenmiştir. Hyaluronik asitin kitosana yüklenme verimi %61,62 bulunmuştur, verimi arttırmak amacıyla sentez sırasında karıştırma hızı, ürünlerin konsantrasyonları ve pH değişimi ile bu oran arttırılabilir, bu çalışmada ürün stabilitesini sabit tutmak ve flokülasyondan kaçınmak amacıyla verim arttırma çalışmaları yapılmamış ve elde edilen verim oranı uygun bulunmuştur.

HA, CHA ve ZA molekülleri ile hücre kültürü çalışmaları yapılmıştır ve ZA'nın toksik etkisini CHA ve HA ile elimine etmek için kombinasyonlar halinde uygulanmıştır. ZA+CHA ve ZA+HA kombinasyonlarıyla uygulanan örnekler sitotoksisite, apoptozis ve yara modeli çalışmalarının üçünde de ZA'ya göre proliferasyon göstermiş ve ZA'nın inhibisyon etkisini elimini edici sonuçlar elde edilmiştir. Doza bağlı olarak, kullanılan dozlar dahilinde ve küçük molekül ağırlıklı kitosan ve hyaluronik asit molekülleri kullanıldığı için, zamana da bağlı olarak üç hücre hattında da proliferasyon gözlenmiştir. ZA'da da doza bağlı olarak apoptotik etki gözlenmiştir ve sonuçlar literatür ile uyumludur. HGF-1'in apoptozda elde edilen sitotoksisite sonuçlarına göre daha fazla toksik etkiye maruz kalması; ekilen hücre sayısında farklılıklar, apoptoz işleminde tripsine bağlı hücre kaybı ve hücre solüsyonu yoğunluğundan cihazda yaşanabilecek okuma hatalarından kaynaklanabileceği gibi, literatür ile uyumlu toksik etki aralığında olduğu için hatalı değildir, çok sayıda örnek ve kombinasyonları, hücre hattı ve zaman noktası kullanıldığı için tüm değişkenlerle lineer bir sonuç elde etmek mümkün olmadığından bazı sapmalar yaşanabilmektedir. Kullanılan Saos-2 hücre hattıyla yapılan yara modeli çalışmasında ZA+CHA örneğinin sitotoksisite ve apoptoz sonuçlarıyla uyumlu çıkmamasının nedeni, hücrelerin proliferasyondan dolayı üst üste binmesi, yüzeyden kalkması ve yara çizgisinin oluşturduğu stresten dolayı, bölgenin kapanma süresinin uzun sürmesinden kaynaklanmıştır ve yara modeli çalışmasına uygun olmadığı gözlemlenmiştir.

Tüm çalışmaların sonucunda; HA ve CHA moleküllerinden nanoparçacık sistemi oluşturulmuştur ve çene kemiği osteonekrozunun hastalarda ağız yaralarına neden olması ve bu yaraların da geç iyileşmesi nedeniyle yara iyileştirmede kullanılan iki doğal polimer biraraya getirilerek stabil bir nanoparçacık sistemi elde edilmiştir. Bifosfonat kaynaklı çene kemiği osteonekrozunun bu yan etkisi, güçlü bifosfonat ilaç grubundan zoledronik asit kullanılarak toksik ve apoptotik etkileri osteoblast, endotel ve fibroblast hücreleri olarak sırasıyla, Saos-2, HaCaT ve HGF-1 üzerinde incelenmiş ve bu etkileri minimize etmek için yara iyileştirme modeli oluşturmak üzere HA ve CHA örnekleri uygulanmıştır ve elde edilen sonuçlar ışığında bu nanoparçacık sisteminin BRONJ tedavisinde kullanabileceği imkânı ortaya çıkmıştır. İleri aşama kaydedebilmek için *in vitro* çalışmalar akabinde *in vivo* çalışmalar da yapılabilir.

## KAYNAKLAR DİZİNİ

- Abedian, Z., Moghadamnia, A. A., Zabihi, E., Pourbagher, R., Ghasemi, M., Nouri, H. R., ... & Jenabian, N.** (2019). Anticancer properties of chitosan against osteosarcoma, breast cancer and cervical cancer cell lines. *Caspian Journal of Internal Medicine*, 10(4), 439.
- Acil, Y., Möller, B., Niehoff, P., Rachko, K., Gassling, V., Wiltfang, J., & Simon, M. J. K.** (2012). The cytotoxic effects of three different bisphosphonates in-vitro on human gingival fibroblasts, osteoblasts and osteogenic sarcoma cells. *Journal of Cranio-Maxillofacial Surgery*, 40(8), e229-e235.
- Açil, Y., Arndt, M. L., Gülses, A., Wieker, H., Naujokat, H., Ayna, M., & Wiltfang, J.** (2018). Cytotoxic and inflammatory effects of alendronate and zolendronate on human osteoblasts, gingival fibroblasts and osteosarcoma cells. *Journal of Cranio-Maxillofacial Surgery*, 46(4), 538-546.
- Agarwal, M., Agarwal, M. K., Shrivastav, N., Pandey, S., Das, R., & Gaur, P.** (2018). Preparation of chitosan nanoparticles and their in-vitro characterization. *International Journal of Life-Sciences Scientific Research*, 4(2), 1713-1720.
- Akdeniz, S. S., Beyler, E., Korkmaz, Y., Yurtcu, E., Ates, U., Araz, K., ... & Torun, O. Y.** (2018). The effects of ozone application on genotoxic damage and wound healing in bisphosphonate-applied human gingival fibroblast cells. *Clinical oral investigations*, 22(2), 867-873.
- Anand, M., Sathyapriya, P., Maruthupandy, M., & Beevi, A. H.** (2018). Synthesis of chitosan nanoparticles by TPP and their potential mosquito larvicidal application. *Frontiers in Laboratory Medicine*, 2(2), 72-78.

## KAYNAKLAR DİZİNİ (devam)

- Anisha, B. S., Biswas, R., Chennazhi, K. P., & Jayakumar, R.** (2013). Chitosan-hyaluronic acid/nano silver composite sponges for drug resistant bacteria infected diabetic wounds. *International journal of biological macromolecules*, 62, 310-320.
- Anitua, E., Zalduendo, M., Troya, M., & Orive, G.** (2016). PRGF exerts a cytoprotective role in zoledronic acid-treated oral cells. *Clinical oral investigations*, 20(3), 513-521
- Anke J. Roelofs, ... Michael J. Rogers**, in *Principles of Bone Biology* (Third Edition), 2008.
- Antoni, D., Burckel, H., Josset, E., & Noel, G.** (2015). Three-dimensional cell culture: a breakthrough in vivo. *International journal of molecular sciences*, 16(3), 5517-5527.
- Aragon-Ching, J. B., Ning, Y. M., Chen, C. C., Latham, L., Guadagnini, J. P., Gulley, J. L., ... & Dahut, W. L.** (2009). Higher incidence of Osteonecrosis of the Jaw (ONJ) in patients with metastatic castration resistant prostate cancer treated with anti-angiogenic agents. *Cancer investigation*, 27(2), 221-226.
- Ardani, H. K., Imawan, C., Handayani, W., Djuhana, D., Harmoko, A., & Fauzia, V.** (2017, April). Enhancement of the stability of silver nanoparticles synthesized using aqueous extract of *Diospyros discolor* Willd. leaves using polyvinyl alcohol. In *IOP Conference Series: Materials Science and Engineering* (Vol. 188, No. 1, p. 012056). IOP Publishing.
- Bacsik, Z., Mink, J., & Keresztury, G.** (2004). FTIR spectroscopy of the atmosphere. I. Principles and methods. *Applied Spectroscopy Reviews*, 39(3), 295-363.

## KAYNAKLAR DİZİNİ (devam)

- Bagán, J., Blade, J., Cozar, J. M., Constela, M., García Sanz, R., Gómez Veiga, F., ... & Solsona, E.** (2007). Recommendations for the prevention, diagnosis, and treatment of osteonecrosis of the jaw (ONJ) in cancer patients treated with bisphosphonates. *Medicina Oral, Patología Oral y Cirugía Bucal (Internet)*, 12(4), 336-340.
- Bagan, J., Scully, C., Sabater, V., & Jimenez, Y.** (2009). Osteonecrosis of the jaws in patients treated with intravenous bisphosphonates (BRONJ): A concise update. *Oral oncology*, 45(7), 551-554.
- Basso, F. G., Pansani, T. N., Oliveira, C. F. D., Turrioni, A. P. S., Soares, D. G., Hebling, J., & Costa, C. A. D. S.** (2013). Cytotoxic effects of zoledronic acid on human epithelial cells and gingival fibroblasts. *Brazilian dental journal*, 24(6), 551-558.
- Basso, F. G., Turrioni, A. P. S., Hebling, J., & de Souza Costa, C. A.** (2013). Zoledronic acid decreases gene expression of vascular endothelial growth factor and basic fibroblast growth factor by human epithelial cells. *British Journal of Oral and Maxillofacial Surgery*, 51(8), 971-973.
- Bhattacharjee, S.** (2016). DLS and zeta potential—what they are and what they are not?. *Journal of controlled release*, 235, 337-351.
- Blecher, K., Martinez, L. R., Tuckman-Vernon, C., Nacharaju, P., Schairer, D., Chouake, J., ... & Friedman, A. J.** (2012). Nitric oxide-releasing nanoparticles accelerate wound healing in NOD-SCID mice. *Nanomedicine: Nanotechnology, Biology and Medicine*, 8(8), 1364-1371.
- Boeckel, D. G., Shinkai, R. S. A., Grossi, M. L., & Teixeira, E. R.** (2014). In vitro evaluation of cytotoxicity of hyaluronic acid as an extracellular matrix on OFCOL II cells by the MTT assay. *Oral surgery, oral medicine, oral pathology and oral radiology*, 117(6), e423-e428.

### KAYNAKLAR DİZİNİ (devam)

- Borsani, E., Bonazza, V., Buffoli, B., Nocini, P. F., Albanese, M., Zotti, F., ... & Rodella, L. F.** (2018). Beneficial Effects of Concentrated Growth Factors and Resveratrol on Human Osteoblasts In Vitro Treated with Bisphosphonates. *BioMed research international*, 2018.
- Broom, R., Du, H., Clemons, M., Eton, D., Dranitsaris, G., Simmons, C., ... & Cella, D.** (2009). Switching breast cancer patients with progressive bone metastases to third-generation bisphosphonates: measuring impact using the Functional Assessment of Cancer Therapy-Bone Pain. *Journal of pain and symptom management*, 38(2), 244-257.
- Butler, M.** (2004). Animal cell culture and technology. Taylor & Francis.
- Chiesa, E., Dorati, R., Conti, B., Modena, T., Cova, E., Meloni, F., & Genta, I.** (2018). Hyaluronic acid-decorated chitosan nanoparticles for CD44-targeted delivery of everolimus. *International journal of molecular sciences*, 19(8), 2310.
- Clézardin, P.** (2011). Bisphosphonates' antitumor activity: an unravelled side of a multifaceted drug class. *Bone*, 48(1), 71-79.
- Coleman, R.** (2020). Bisphosphonates and breast cancer—From cautious palliation to saving lives. *Bone*, 140, 115570.
- Cremers, S., Drake, M. T., Ebetino, F. H., Bilezikian, J. P., & Russell, R. G. G.** (2019). Pharmacology of bisphosphonates. *British journal of clinical pharmacology*, 85(6), 1052-1062.
- Dai, T., Tanaka, M., Huang, Y. Y., & Hamblin, M. R.** (2011). Chitosan preparations for wounds and burns: antimicrobial and wound-healing effects. *Expert review of anti-infective therapy*, 9(7), 857-879.

### KAYNAKLAR DİZİNİ (devam)

- Danaei, M., Dehghankhold, M., Ataei, S., Hasanzadeh Davarani, F., Javanmard, R., Dokhani, A., ... & Mozafari, M. R.** (2018). Impact of particle size and polydispersity index on the clinical applications of lipidic nanocarrier systems. *Pharmaceutics*, 10(2), 57.
- Dass, C. R., & Choong, P. F.** (2007). Zoledronic acid inhibits osteosarcoma growth in an orthotopic model. *Molecular cancer therapeutics*, 6(12), 3263-3270.
- Dima L. Diab, ... Paul D. Miller**, in *Osteoporosis* (Fourth Edition), 2013.
- Dodane, V., & Vilivalam, V. D.** (1998). Pharmaceutical applications of chitosan. *Pharmaceutical Science & Technology Today*, 1(6), 246-253.
- Drake, M. T., Clarke, B. L., & Khosla, S.** (2008, September). Bisphosphonates: mechanism of action and role in clinical practice. In *Mayo Clinic Proceedings* (Vol. 83, No. 9, pp. 1032-1045). Elsevier.
- Dunford, J. E., Thompson, K., Coxon, F. P., Luckman, S. P., Hahn, F. M., Poulter, C. D., ... & Rogers, M. J.** (2001). Structure-activity relationships for inhibition of farnesyl diphosphate synthase in vitro and inhibition of bone resorption in vivo by nitrogen-containing bisphosphonates. *Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics*, 296(2), 235-242.
- Ertaş, E. T., & Atıcı, M. Y.** (2016). Bifosfonatlar ve çene kemiğinde görülen osteonekroz. *Selcuk Dental Journal*, 2(2), 91-101.
- Fan, W., Yan, W., Xu, Z., & Ni, H.** (2012). Formation mechanism of monodisperse, low molecular weight chitosan nanoparticles by ionic gelation technique. *Colloids and surfaces B: Biointerfaces*, 90, 21-27.

### KAYNAKLAR DİZİNİ (devam)

- Fei Liu, X., Lin Guan, Y., Zhi Yang, D., Li, Z., & De Yao, K.** (2001). Antibacterial action of chitosan and carboxymethylated chitosan. *Journal of applied polymer science*, 79(7), 1324-1335.
- Fleisch, H. A., Russell, R. G. G., Bisaz, S., Mühlbauer, R. C., & Williams, D. A.** (1970). The inhibitory effect of phosphonates on the formation of calcium phosphate crystals in vitro and on aortic and kidney calcification in vivo. *European journal of clinical investigation*, 1(1), 12-18.
- Fleisch, H., Reszka, A., Rodan, G., & Rogers, M.** (2002). Bisphosphonates: mechanisms of action. *Principles of bone biology*, 1361-XLIII.
- Fliefel, R., Tröltzsch, M., Kühnisch, J., Ehrenfeld, M., & Otto, S.** (2015). Treatment strategies and outcomes of bisphosphonate-related osteonecrosis of the jaw (BRONJ) with characterization of patients: a systematic review. *International journal of oral and maxillofacial surgery*, 44(5), 568-585.
- Fliefel, R., Tröltzsch, M., Kühnisch, J., Ehrenfeld, M., & Otto, S.** (2015). Treatment strategies and outcomes of bisphosphonate-related osteonecrosis of the jaw (BRONJ) with characterization of patients: a systematic review. *International journal of oral and maxillofacial surgery*, 44(5), 568-585.
- Florencio-Silva, R., Sasso, G. R. D. S., Sasso-Cerri, E., Simões, M. J., & Cerri, P. S.** (2015). Biology of bone tissue: structure, function, and factors that influence bone cells. *BioMed research international*, 2015.
- Freiberger, J. J.** (2009). Utility of hyperbaric oxygen in treatment of bisphosphonate-related osteonecrosis of the jaws. *Journal of Oral and Maxillofacial Surgery*, 67(5), 96-106.

## KAYNAKLAR DİZİNİ (devam)

**Freiberger, J. J., Padilla-Burgos, R., Chhoeu, A. H., Kraft, K. H., Boneta, O., Moon, R. E., & Piantadosi, C. A.** (2007). Hyperbaric oxygen treatment and bisphosphonate-induced osteonecrosis of the jaw: a case series. *Journal of oral and maxillofacial surgery*, 65(7), 1321-1327.

**Gokila, S., Gomathi, T., Vijayalakshmi, K., Sukumaran, A., & Sudha, P. N.** (2018). Development of 3D scaffolds using nanochitosan/silk-fibroin/hyaluronic acid biomaterials for tissue engineering applications. *International journal of biological macromolecules*, 120, 876-885.

**H. Fleisch**, in Encyclopedia of Endocrine Diseases, 2004.

**Hirano, S., Seino, H., Akiyama, Y., & Nonaka, I.** (1990). Chitosan: a biocompatible material for oral and intravenous administrations. In *Progress in biomedical polymers* (pp. 283-290). Springer, Boston, MA.

**Hu, X., Neoh, K. G., Shi, Z., Kang, E. T., & Wang, W.** (2013). An in vitro assessment of fibroblast and osteoblast response to alendronate-modified titanium and the potential for decreasing fibrous encapsulation. *Tissue Engineering Part A*, 19(17-18), 1919-1930.

**Iacob, A. T., Drăgan, M., Ghețu, N., Pieptu, D., Vasile, C., Buron, F., ... & Profire, L.** (2018). Preparation, characterization and wound healing effects of new membranes based on chitosan, hyaluronic acid and arginine derivatives. *Polymers*, 10(6), 607.

**Kannan, M.** (2018). Scanning Electron Microscopy: Principle, Components and Applications. *A textbook on Fundamentals and Applications of Nanotechnology*, 81-92.

### KAYNAKLAR DİZİNİ (devam)

- Khan, A. A., Morrison, A., Kendler, D. L., Rizzoli, R., Hanley, D. A., Felsenberg, D., ... & Compston, J.** (2017). Case-based review of osteonecrosis of the jaw (ONJ) and application of the international recommendations for management from the international task force on ONJ. *Journal of clinical densitometry*, 20(1), 8-24.
- Khan, A., Morrison, A., Cheung, A., Hashem, W., & Compston, J.** (2016). Osteonecrosis of the jaw (ONJ): diagnosis and management in 2015. *Osteoporosis international*, 27(3), 853-859.
- Khan, I., Saeed, K., & Khan, I.** (2019). Nanoparticles: Properties, applications and toxicities. *Arabian journal of chemistry*, 12(7), 908-931.
- Komatsu, Y., Ibi, M., Chosa, N., Kyakumoto, S., Kamo, M., Shibata, T., ... & Ishisaki, A.** (2016). Zoledronic acid suppresses transforming growth factor- $\beta$ -induced fibrogenesis by human gingival fibroblasts. *International journal of molecular medicine*, 38(1), 139-147.
- Krausz, A. E., Adler, B. L., Cabral, V., Navati, M., Doerner, J., Charafeddine, R. A., ... & Friedman, A. J.** (2015). Curcumin-encapsulated nanoparticles as innovative antimicrobial and wound healing agent. *Nanomedicine: Nanotechnology, Biology and Medicine*, 11(1), 195-206.
- Kumar, D.** (2012). Co-functionalised gold nanoparticles for drug delivery applications (Doctoral dissertation, Ulster University).
- Kumar, M. R., Muzzarelli, R., Muzzarelli, C., Sashiwa, H., & Domb, A. J.** (2004). Chitosan chemistry and pharmaceutical perspectives. *Chemical reviews*, 104(12), 6017-6084.

### KAYNAKLAR DİZİNİ (devam)

- Leu, J. G., Chen, S. A., Chen, H. M., Wu, W. M., Hung, C. F., Yao, Y. D., ... & Liang, Y. J.** (2012). The effects of gold nanoparticles in wound healing with antioxidant epigallocatechin gallate and  $\alpha$ -lipoic acid. *Nanomedicine: Nanotechnology, Biology and Medicine*, 8(5), 767-775.
- Lim, J., Yeap, S. P., Che, H. X., & Low, S. C.** (2013). Characterization of magnetic nanoparticle by dynamic light scattering. *Nanoscale research letters*, 8(1), 1-14.
- Lin, J. H.** (1996). Bisphosphonates: a review of their pharmacokinetic properties. *Bone*, 18(2), 75-85.
- Litwiniuk, M., Krejner, A., Speyrer, M. S., Gauto, A. R., & Grzela, T.** (2016). Hyaluronic acid in inflammation and tissue regeneration. *Wounds*, 28(3), 78-88.
- Longaker, M. T., Chiu, E. S., Adzick, N. S., Stern, M. I. C. H. A. E. L., Harrison, M. R., & Stern, R. O. B. E. R. T.** (1991). Studies in fetal wound healing. V. A prolonged presence of hyaluronic acid characterizes fetal wound fluid. *Annals of surgery*, 213(4), 292.
- Longinotti, C.** (2014). The use of hyaluronic acid based dressings to treat burns: a review. *Burns & trauma*, 2(4), 162.
- Losi, P., Briganti, E., Errico, C., Lisella, A., Sanguinetti, E., Chiellini, F., & Soldani, G.** (2013). Fibrin-based scaffold incorporating VEGF-and bFGF-loaded nanoparticles stimulates wound healing in diabetic mice. *Acta biomaterialia*, 9(8), 7814-7821.
- Marturi, N.** (2013). Vision and visual servoing for nanomanipulation and nanocharacterization in scanning electron microscope (Doctoral dissertation, Université de Franche-Comté).

### KAYNAKLAR DİZİNİ (devam)

- McLeod, N. M., Moutasim, K. A., Brennan, P. A., Thomas, G., & Jenei, V.** (2014). In vitro effect of bisphosphonates on oral keratinocytes and fibroblasts. *Journal of Oral and Maxillofacial Surgery*, 72(3), 503-509.
- McNeil, S. E.** (2005). Nanotechnology for the biologist. *Journal of leukocyte biology*, 78(3), 585-594.
- Melo, M. D., & Obeid, G.** (2005). Osteonecrosis of the maxilla in a patient with a history of bisphosphonate therapy. *J Can Dent Assoc*, 71(2), 111-3.
- Modena, M. M., Rühle, B., Burg, T. P., & Wuttke, S.** (2019). Nanoparticle characterization: what to measure?. *Advanced Materials*, 31(32), 1901556.
- Mohamed, M. A., Jaafar, J., Ismail, A. F., Othman, M. H. D., & Rahman, M. A.** (2017). Fourier transform infrared (FTIR) spectroscopy. In *Membrane Characterization* (pp. 3-29). Elsevier.
- Mohandas, A., Anisha, B. S., Chennazhi, K. P., & Jayakumar, R.** (2015). Chitosan–hyaluronic acid/VEGF loaded fibrin nanoparticles composite sponges for enhancing angiogenesis in wounds. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*, 127, 105-113.
- Muzzarelli, R. A. A., & Muzzarelli, C.** (2005). Chitosan chemistry: relevance to the biomedical sciences. *Polysaccharides I*, 151-209.
- Naderi, N., Karponis, D., Mosahebi, A., & Seifalian, A. M.** (2018). Nanoparticles in wound healing; from hope to promise, from promise to routine. *Front. Biosci*, 23, 1038-1059.

## KAYNAKLAR DİZİNİ (devam)

- Nasti, A., Zaki, N. M., De Leonardis, P., Ungphaiboon, S., Sansongsak, P., Rimoli, M. G., & Tirelli, N.** (2009). Chitosan/TPP and chitosan/TPP-hyaluronic acid nanoparticles: systematic optimisation of the preparative process and preliminary biological evaluation. *Pharmaceutical research*, 26(8), 1918-1930.
- Nazeri, N., Avadi, M. R., Faramarzi, M. A., Safarian, S., Tavoosidana, G., Khoshayand, M. R., & Amani, A.** (2013). Effect of preparation parameters on ultra low molecular weight chitosan/hyaluronic acid nanoparticles. *International journal of biological macromolecules*, 62, 642-646.
- Necas, J. B. L. B. P., Bartosikova, L., Brauner, P., & Kolar, J. J. V. M.** (2008). Hyaluronic acid (hyaluronan): a review. *Veterinarni medicina*, 53(8), 397-411.
- Ogawa, K., Yui, T., & Okuyama, K.** (2004). Three D structures of chitosan. *International Journal of Biological Macromolecules*, 34(1-2), 1-8.
- Paladini, F., & Pollini, M.** (2019). Antimicrobial silver nanoparticles for wound healing application: progress and future trends. *Materials*, 12(16), 2540.
- Pansani, T. N., Basso, F. G., Turirioni, A. S., Kurachi, C., Hebling, J., & de Souza Costa, C. A.** (2014). Effects of low-level laser therapy on the proliferation and apoptosis of gingival fibroblasts treated with zoledronic acid. *International journal of oral and maxillofacial surgery*, 43(8), 1030-1034
- Papapoulos, S. E.** (1995). Pharmacodynamics of bisphosphonates in man. Chapter 15. Bisphosphonates on Bone. O. Bijvoet, et al. Eds.: Elsevier Science BV Amsterdam.
- Partha S. Sinha, Harold N. Rosen,** in Reference Module in Biomedical Sciences, 2019.

### KAYNAKLAR DİZİNİ (devam)

- Patel, V. R., & Agrawal, Y. K.** (2011). Nanosuspension: An approach to enhance solubility of drugs. *Journal of advanced pharmaceutical technology & research*, 2(2), 81.
- Pillai, C. K., Paul, W., & Sharma, C. P.** (2009). Chitin and chitosan polymers: Chemistry, solubility and fiber formation. *Progress in polymer science*, 34(7), 641-678.
- Pirnazar, P., Wolinsky, L., Nachnani, S., Haake, S., Pilloni, A., & Bernard, G. W.** (1999). Bacteriostatic effects of hyaluronic acid. *Journal of periodontology*, 70(4), 370-374.
- Plafki, C., Peters, P., Almeling, M., Welslau, W., & Busch, R.** (2000). Complications and side effects of hyperbaric oxygen therapy. *Aviation, space, and environmental medicine*, 71(2), 119-124.
- Price, R. D., Berry, M. G., & Navsaria, H. A.** (2007). Hyaluronic acid: the scientific and clinical evidence. *Journal of Plastic, Reconstructive & Aesthetic Surgery*, 60(10), 1110-1119.
- Price, R. D., Myers, S., Leigh, I. M., & Navsaria, H. A.** (2005). The role of hyaluronic acid in wound healing. *American journal of clinical dermatology*, 6(6), 393-402.
- Prosdocimi, M., & Bevilacqua, C.** (2012). Exogenous hyaluronic acid and wound healing: an updated vision. *Panminerva Medica*, 54(2), 129-135.
- Qi, L., Xu, Z., Jiang, X., Hu, C., & Zou, X.** (2004). Preparation and antibacterial activity of chitosan nanoparticles. *Carbohydrate research*, 339(16), 2693-2700.

## KAYNAKLAR DİZİNİ (devam)

- Rampino, A., Borgogna, M., Blasi, P., Bellich, B., & Cesàro, A.** (2013). Chitosan nanoparticles: preparation, size evolution and stability. *International journal of pharmaceutics*, 455(1-2), 219-228.
- Roco, M. C.** (2011). The long view of nanotechnology development: the National Nanotechnology Initiative at 10 years. In *Nanotechnology research directions for societal needs in 2020* (pp. 1-28). Springer, Dordrecht.
- Roehrs, H., Stocco, J. G., Pott, F., Blanc, G., Crozeta, K., Meier, M. J., & Dias, F. A.** (2016). Dressings and topical agents containing hyaluronic acid for chronic wound healing. *Cochrane Database of Systematic Reviews*, (5).
- Roelofs, A. J., Thompson, K., Gordon, S., & Rogers, M. J.** (2006). Molecular mechanisms of action of bisphosphonates: current status. *Clinical Cancer Research*, 12(20), 6222s-6230s.
- Rogers, M. J., Gordon, S., Benford, H. L., Coxon, F. P., Luckman, S. P., Monkkonen, J., & Frith, J. C.** (2000). Cellular and molecular mechanisms of action of bisphosphonates. *Cancer: Interdisciplinary International Journal of the American Cancer Society*, 88(S12), 2961-2978.
- Rogers, M. J., Watts, D. J., & Russell, R. G. G.** (1997). Overview of bisphosphonates. *Cancer: Interdisciplinary International Journal of the American Cancer Society*, 80(S8), 1652-1660.
- Russell, R. G. G.** (2007). Determinants of structure–function relationships among bisphosphonates. *Bone*, 40(5), S21-S25.
- Russell, R. G. G.** (2011). Bisphosphonates: the first 40 years. *Bone*, 49(1), 2-19.
- Russell, R. G. G., & Rogers, M. J.** (1999). Bisphosphonates: from the laboratory to the clinic and back again. *Bone*, 25(1), 97-106.

### KAYNAKLAR DİZİNİ (devam)

- Salata, O. V.** (2004). Applications of nanoparticles in biology and medicine. *Journal of nanobiotechnology*, 2(1), 1-6.
- Sanad, R. A. B., & Abdel-Bar, H. M.** (2017). Chitosan–hyaluronic acid composite sponge scaffold enriched with Andrographolide-loaded lipid nanoparticles for enhanced wound healing. *Carbohydrate polymers*, 173, 441-450.
- Sanchez, F., & Sobolev, K.** (2010). Nanotechnology in concrete—a review. *Construction and building materials*, 24(11), 2060-2071.
- Sayed Aly, M. N.** (2008). Intra-articular drug delivery: a fast growing approach. Recent patents on drug delivery & formulation, 2(3), 231-237.
- Sekhon, B. S.** (2010). Food nanotechnology—an overview. *Nanotechnology, science and applications*, 3, 1.
- Shane, E.** (2010). Evolving data about subtrochanteric fractures and bisphosphonates. *N Engl J Med*, 362(19), 1761-1771.
- Shinoda, H., Adamek, G., Felix, R., Fleisch, H., Schenk, R., & Hagan, P.** (1983). Structure-activity relationships of various bisphosphonates. *Calcified tissue international*, 35(1), 87-99.
- Shwetha, K., & Deveswaran, R.** (2019). Applications of Nanotechnology in Drug Delivery. *Journal of Dental and Orofacial Research*, 15(2), 95-99.
- Sietsema, W. K., Ebetino, F. H., Salvagno, A. M., & Bevan, J. A.** (1989). Antiresorptive dose-response relationships across three generations of bisphosphonates. *Drugs under experimental and clinical research*, 15(9), 389-396.

## KAYNAKLAR DİZİNİ (devam)

- Silverman, S. L., & Landesberg, R.** (2009). Osteonecrosis of the jaw and the role of bisphosphonates: a critical review. *The American journal of medicine*, 122(2), S33-S45.
- Smith, R., Russell, R. G. G., & Bishop, M.** (1971). Diphosphonates and Paget's disease of bone. *The Lancet*, 297(7706), 945-947.
- Stetefeld, J., McKenna, S. A., & Patel, T. R.** (2016). Dynamic light scattering: a practical guide and applications in biomedical sciences. *Biophysical reviews*, 8(4), 409-427.
- Strampel, W., Emkey, R., & Civitelli, R.** (2007). Safety considerations with bisphosphonates for the treatment of osteoporosis. *Drug safety*, 30(9), 755-763.
- Sullivan, D. J., Cruz-Romero, M., Collins, T., Cummins, E., Kerry, J. P., & Morris, M. A.** (2018). Synthesis of monodisperse chitosan nanoparticles. *Food hydrocolloids*, 83, 355-364.
- Taghipour-Sabzevar, V., Sharifi, T., Bagheri-Khoulenjani, S., Goodarzi, V., Kooshki, H., Halabian, R., & Moghaddam, M. M.** (2020). Targeted delivery of a short antimicrobial peptide against CD44-overexpressing tumor cells using hyaluronic acid-coated chitosan nanoparticles: An in vitro study. *Journal of Nanoparticle Research*, 22(5), 1-16.
- Tanaka, Y., Nagai, Y., Dohdoh, M., Oizumi, T., Ohki, A., Kuroishi, T., ... & Endo, Y.** (2013). In vitro cytotoxicity of zoledronate (nitrogen-containing bisphosphonate: NBP) and/or etidronate (non-NBP) in tumour cells and periodontal cells. *Archives of oral biology*, 58(6), 628-637.
- Tang, E. S. K., Huang, M., & Lim, L. Y.** (2003). Ultrasonication of chitosan and chitosan nanoparticles. *International Journal of Pharmaceutics*, 265(1-2), 103-114.

### KAYNAKLAR DİZİNİ (devam)

- Thakur, A., & Taranjit.** (2011, December). Preparation of Chitosan Nanoparticles: A Study of Influencing Factors. In AIP Conference Proceedings (Vol. 1393, No. 1, pp. 299-300). American Institute of Physics.
- Tian, J., Wong, K. K., Ho, C. M., Lok, C. N., Yu, W. Y., Che, C. M., ... & Tam, P. K.** (2007). Topical delivery of silver nanoparticles promotes wound healing. *ChemMedChem: Chemistry Enabling Drug Discovery*, 2(1), 129-136.
- Tipton, D. A., Seshul, B. A., & Dabbous, M. K.** (2011). Effect of bisphosphonates on human gingival fibroblast production of mediators of osteoclastogenesis: RANKL, osteoprotegerin and interleukin-6. *Journal of periodontal research*, 46(1), 39-47.
- Toussaintxxxasteriskyyy, N. D., Elder, G. J., & Kerr, P. G.** (2008). Bisphosphonates in Chronic Kidney Disease; Balancing Potential Benefits and Adverse Effects on Bone and Soft Tissue. *Clinical Journal of the American Society of Nephrology*.
- Van Acker, H. H., Anguille, S., Willemen, Y., Smits, E. L., & Van Tendeloo, V. F.** (2016). Bisphosphonates for cancer treatment: mechanisms of action and lessons from clinical trials. *Pharmacology & therapeutics*, 158, 24-40.
- Van Beek, E. R., Cohen, L. H., Leroy, I. M., Ebetino, F. H., Löwik, C. W. G. M., & Papapoulos, S. E.** (2003). Differentiating the mechanisms of antiresorptive action of nitrogen containing bisphosphonates. *Bone*, 33(5), 805-811.
- Van den Wyngaert, T., Claeys, T., Huizing, M. T., Vermorken, J. B., & Fossion, E.** (2009). Initial experience with conservative treatment in cancer patients with osteonecrosis of the jaw (ONJ) and predictors of outcome. *Annals of Oncology*, 20(2), 331-336.

## KAYNAKLAR DİZİNİ (devam)

- Vigani, B., Rossi, S., Sandri, G., Bonferoni, M. C., Caramella, C. M., & Ferrari, F.** (2019). Hyaluronic acid and chitosan-based nanosystems: A new dressing generation for wound care. *Expert opinion on drug delivery*, 16(7), 715-740.
- Voinchet, V., Vasseur, P., & Kern, J.** (2006). Efficacy and safety of hyaluronic acid in the management of acute wounds. *American journal of clinical dermatology*, 7(6), 353-357.
- Ward, P. D., Thibeault, S. L., & Gray, S. D.** (2002). Hyaluronic acid: its role in voice. *Journal of Voice*, 16(3), 303-309.
- Watts, N. B.** (1998). Treatment of osteoporosis with bisphosphonates. *Endocrinology and metabolism clinics of North America*, 27(2), 419-439.
- Weber, J. B. B., Camilotti, R. S., & Ponte, M. E.** (2016). Efficacy of laser therapy in the management of bisphosphonate-related osteonecrosis of the jaw (BRONJ): a systematic review. *Lasers in medical science*, 31(6), 1261-1272.
- Xu, Y., & Du, Y.** (2003). Effect of molecular structure of chitosan on protein delivery properties of chitosan nanoparticles. *International journal of pharmaceutics*, 250(1), 215-226.
- Zafar, S., Coates, D. E., Cullinan, M. P., Drummond, B. K., Milne, T., & Seymour, G. J.** (2014). Zoledronic acid and geranylgeraniol regulate cellular behaviour and angiogenic gene expression in human gingival fibroblasts. *Journal of oral pathology & medicine*, 43(9), 711-721.
- Zargar, V., Asghari, M., & Dashti, A.** (2015). A review on chitin and chitosan polymers: structure, chemistry, solubility, derivatives, and applications. *ChemBioEng Reviews*, 2(3), 204-226.

**KAYNAKLAR DİZİNİ (devam)**

**Zhou, W., & Wang, Z. L. (Eds.).** (2007). *Scanning microscopy for nanotechnology: techniques and applications*. Springer science & business media.

**Zhou, W., Apkarian, R., Wang, Z. L., & Joy, D.** (2006). Fundamentals of scanning electron microscopy (SEM). In *Scanning microscopy for nanotechnology* (pp. 1-40). Springer, New York, NY.

**Zhu, W., Bartos, P. J., & Porro, A.** (2004). Application of nanotechnology in construction. *Materials and Structures*, 37(9), 649-658.

## TEŞEKKÜR

Tez çalışmam süresince bilgi ve deneyimleriyle yol gösteren danışmanlarım Nükleer Bilimler Enstitüsü Öğretim Üyesi Doç. Dr. Emin İlker MEDİNE ve Diş Hekimliği Fakültesi Periodontoloji Anabilim Dalı Öğretim Üyesi Prof. Dr. Sema ÇINAR BECERİK'e, laboratuvar imkanlarından yararlandığım Nükleer Bilimler Enstitüsü'ne, tez konum ile ilgili bilgi ve deneyimlerini paylaşan Diş Hekimliği Fakültesi Ağız, Diş Ve Çene Cerrahisi Anabilim Dalı Öğretim Üyesi Doç. Dr. Banu ÖZVERİ KOYUNCU'ya, yardımlarını esirgemeyip desteğini her zaman hissettiren sevgili Ar. Gör. Dr. Özge KOZGUŞ GÜLDÜ'ye, yüksek lisans sürecim boyunca arkadaşlığını, desteğini hep hissettiğim, çalışmamda çokça emekleri bulunan sevgili ekip arkadaşlarıma, bu süreçte beni hiç yalnız bırakmayıp her zaman olduğu gibi yanımda olan, destekleyen çok değerli aileme minnettar olduğumu belirtmek isterim.

TGA-2019-21063 numaralı proje ile çalışmayı destekleyen Ege Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Koordinatörlüğü'ne teşekkürlerimizi sunuyoruz.

06 / 09 / 2022

İmzası

Gülistan ÖZDEMİR

**ÖZGEÇMİŞ**

**Adı Soyadı:** Gülistan ÖZDEMİR

**Öğrenim Durumu:**

Lise: Karşıyaka Behçet Uz Anadolu Lisesi (2017 - 2011)

Lisans: Ege Üniversitesi, Mühendislik Fakültesi, Biyomühendislik Bölümü (2012 - 2017)

Yüksek Lisans: Ege Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Biyomedikal Teknolojiler Anabilim Dalı (2018-2022)